

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

***Ogataea polymorpha* maltaas: valgu ja selle mutantide iseloomustamine ja mikroplaadipõhise aktiivsuse analüüsi meetodi väljatöötamine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kristina Põšnograjeva

Juhendajad
dots Tiina Alamäe, biol. kand.
Katrín Viigand, MSc
Karin Ernits, MSc

TARTU
2017

Infoleht

***Ogataea polymorpha* maltaas: valgu ja mutantide iseloomustamine ja mikroplaadipõhise aktiivsuse analüüsi meetodi väljatöötamine**

Pärmi *Ogataea polymorpha* maltaas MAL1 on α -glükosidaas, milles on optimeeritud kaks ensümaatilist aktiivsust, mille jaoks pagaripärmil on kahte tüüpi α -glükosidaasid – maltaasid ja isomaltaasid. MAL1 on laia substraadivaliku tõttu huvitav objekt α -glükosidaaside substraadispetsiifikat mõjutavate aminohapete uurimiseks. Lisaks suhkrute lõhustamisele võivad α -glükosidaasid neid ka transglükosüülida. Suhkrute transglükosüülimireaktsiooni produktid – oligosahhariidid – on sageli prebiootiliste või antikariogeensete omadustega. MAL1 võib oma laia substraadivaliku tõttu sünteesida huvitavaid oligosahhariide. Käesolevas töös uuriti MAL1 substraadispetsiifikat määravaid aminohappeid mutatsioonanalüüsi abil ning seati sisse meetodika, mille abil saab edaspidi sellealast uurimistööd teha odavamalt ja kiiremini. Samuti uuriti MAL1 transglükosüülimisvõimet ning -reaktsiooni produkte.

Märksõnad: *Ogataea polymorpha*, *Hansenula polymorpha*, α -glükosidaas, substraadivalik, transglükosüülimine

CERCS kood: P310 Proteiinid, ensümolooogia

***Ogataea polymorpha* maltase: characterization of the wild-type and mutant proteins and developing a microplate-based activity assay**

Baker's yeast possesses two types of α -glucosidases – maltases and isomaltases. Maltase MAL1 of the yeast *Ogataea polymorpha* is an α -glucosidase with activities of maltases and isomaltases well optimised in a single enzyme. Because of broad substrate selectivity of MAL1, it is an interesting object for studying amino acids that determine substrate selectivity of α -glucosidases. In addition to breaking down sugars, some α -glucosidases transglycosylate them. The products of transglycosylation reaction are oligosaccharides, which may possess prebiotic or anticariogenic properties. Due to its broad substrate specificity, MAL1 could synthesize interesting oligosaccharides. The aim of this work was to study amino acids that determine substrate specificity of α -glucosidases using site-directed mutagenesis and to develop a method for conducting resource- and time-saving maltase activity assays. Furthermore, we wanted to study whether MAL1 could transglycosylate.

Keywords: *Ogataea polymorpha*, *Hansenula polymorpha*, α -glucosidase, substrate specificity, transglycosylation

CERCS code: P310 Proteins, enzymology

Sisukord

| | |
|--|-----------|
| INFOLEHT | 2 |
| SISUKORD | 3 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS..... | 5 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 6 |
| 1.1. Maltaasid ja isomaltaasid kui α -glükosidaasid. Pärmide maltaasid ja isomaltaasid ning nende võrdlus bakterite ja inimese vastavate valkudega. | 6 |
| 1.2. Pärmide maltaaside ja isomaltaaside evolutsioon – ürgmaltaasi hüpotees..... | 9 |
| 1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ja <i>Bacillus thermoglucosidarius</i> 'e isomaltaaside muteerimine substraadivaliku muutmiseks | 11 |
| 1.4. <i>Ogataea polymorpha</i> maltaas MAL1 | 13 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 15 |
| 2.1. Töö eesmärgid | 15 |
| 2.2. Materjal ja meetodika..... | 15 |
| 2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid | 15 |
| 2.2.2. <i>Ogataea polymorpha</i> maltaasi mutantide konstrueerimine..... | 16 |
| 2.2.3. DNA eraldamine, transformatsioon bakterisse ja mutatsiooni kontrollimine .. | 17 |
| 2.2.4. Söötmed ja rakkude kasvatamine | 18 |
| 2.2.5. Rakuekstraktide valmistamine..... | 18 |
| 2.2.6. Maltaasi valkude puhastamine..... | 19 |
| 2.2.7. Maltaasi aktiivsuse määramine..... | 19 |
| 2.2.8. Transglükosüülimise uurimine, TLC ja HPLC..... | 20 |
| 2.2.9. Arvutipõhised meetodid | 21 |
| 2.3. Tulemused ja arutelu | 21 |
| 2.3.1. Maltaasi valkude võrdlemine ja muteerimiseks sobivate positsioonide otsimine | 21 |
| 2.3.2. MAL1 mutantide Gly259Ala ja Gly259Arg konstrueerimine ja kirjeldamine | 24 |
| 2.3.3. Mikroplaadipõhise meetodika väljatöötamine | 26 |
| 2.3.4. Transglükosüülimine | 29 |
| KOKKUVÕTE | 36 |
| SUMMARY | 37 |
| KASUTATUD KIRJANDUS..... | 38 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID | 43 |
| LISA 1..... | 44 |
| LISA 2..... | 45 |
| LISA 3..... | 46 |
| LIHTLITSENTS..... | 48 |

Kasutatud lühendid

α -MG – α -metüülglükosiid

Amp – ampitsilliin

ap – aluspaari

Bs – *Bacillus stearothermophilus* (*Geobacillus stearothermophilus*)

Bt – *Bacillus thermoglucosidasius* (*Geobacillus thermoglucosidasius*)

CAZy – *carbohydrate-active enzymes database*

Fru – fruktoos

GH – glükosiidi hüdrolaas

Glc – glükoos

HBG-III – *Honeybee α -glucosidase III*

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

IPTG – isopropüül- β -D-1-tiogalaktopüranosiid

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

K_m – Michaelis'e konstant (mM)

LB – Luria-Bertani (sööde)

MGA – maltaas-glükoamülaas

Op – *Ogataea polymorpha*

PNPG – *p*-nitrofenüül- α -D-glükopüranosiid

Sc – *Saccharomyces cerevisiae*

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SI – sukraas-isomaltaas

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

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

WT – metsiktüüpi (*wild type*)

Sissejuhatus

α -glükosidaasid on ensüümid, mis katalüüsivad α -glükosiidsideme hüdrolyüsi. Pärmil *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) on kahte tüüpi α -glükosidaase – maltaasid ja isomaltaasid. Maltaasid lagundavad maltoosi, sahharoosi, maltuloosi, turanoosi ja maltotrioosi. Isomaltaasid lagundavad isomaltoosi, palatinoosi, sahharoosi ja α -metüülglükosiidi. Vastavalt hüpoteesile oli nende eellane nn ürgmaltaas, mis lagundas nii maltaaside kui ka isomaltaaside substraate. Käesoleva töö uurimisobjektiks oli *Sc*'st evolutsiooniliselt vanema pärmi *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* (*Op*) maltaas MAL1. MAL1 substraadivalik on sarnane ennustatava maltaaside ja isomaltaaside eellasensüümiga – ta suudab samuti hüdrolyüsida kõiki eelpool loetletud substraate. Selle tõttu on ta huvitav objekt α -glükosidaaside substraadispetsiifikat mõjutavate positsioonide uurimiseks. Nimelt peaks saama MAL1 ensüümi muuta substraadivaliku poolest sarnasemaks nii maltaasidele ka isomaltaasidele.

Lisaks α -glükosiidsideme hüdrolyüsile on α -glükosidaasidel ka võime katalüüsida α -glükosiidsideme sünteesi ehk transglükosüülida. Seega saab α -glükosidaase kasutada ka oligosahhariidide tööstuslikuks sünteesiks. Oligosahhariidid pakuvad huvi farmaatsiatööstusele, kuna neil võivad olla prebiootilised või antikariogeensed omadused. *Op* maltaas on ka selles uurimisvaldkonnas huvitav objekt – laia substraadivaliku tõttu võib ta sünteesida huvitavaidprodukte.

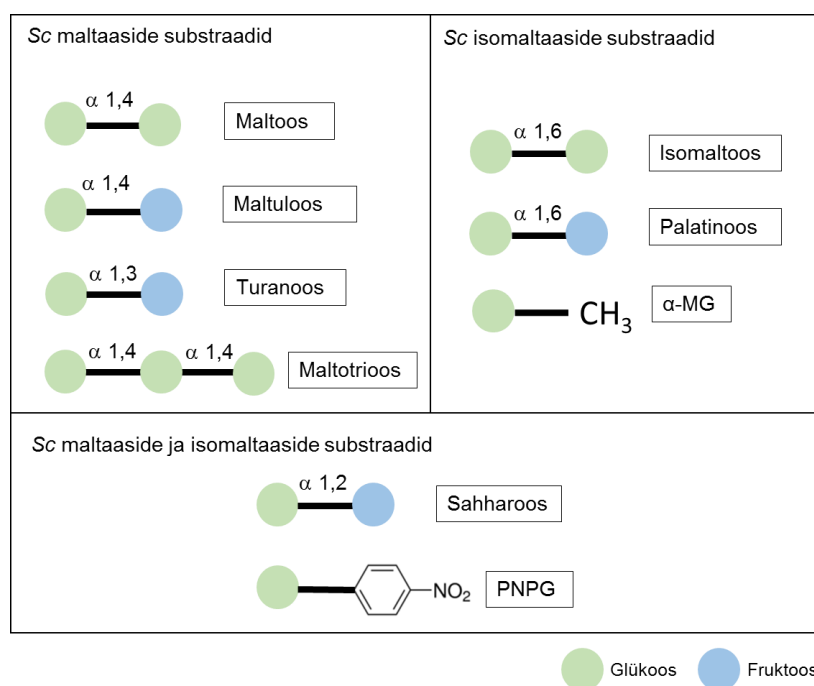
Käesoleva töö eesmärk oli uurida *Op* maltaasi MAL1 substraadispetsiifikat määravaid aminohappeid mutatsioonanalüüsi abil ning sisse seada meetoodika, mille abil saaks edaspidi sellealast analüüsi teha odavamalt ja kiiremini. Samuti oli eesmärgiks uurida *Op* maltaasi transglükosüülimisvõimet ning -reaktsiooni produkte.

Töö valmis Eesti Teadusagentuuri grantiprojekti GLTMR1050 (PUT1050) raames. Täna oma juhendajaid Tiina Alamäed, Katrin Viigandit ja Karin Ernitsat, kes aitasid käesolevat tööd koostada.

1. Kirjanduse ülevaade

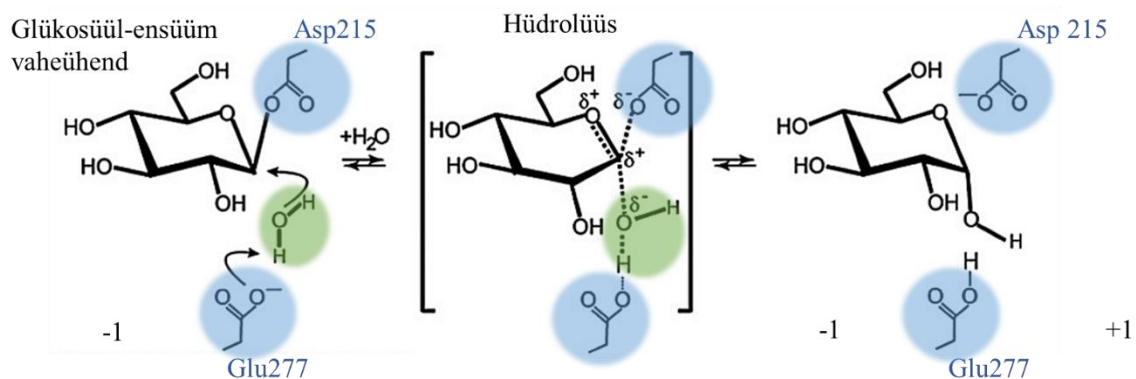
1.1. Maltaasid ja isomaltaasid kui α -glükosidaasid. Pärmide maltaasid ja isomaltaasid ning nende võrdlus bakterite ja inimese vastavate valkudega.

Glükosiidi hüdrolaasid (GH) on võtmeensüümid polü- ja oligomeersete süsivesikute metabolismis. Nad jagatakse CAZy (*Carbohydrate-active enzymes database*) klassifikatsiooni järgi 145 perekonnaks. α -glükosidaasid kuuluvad GH perekondadesse 13 ja 31 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>; Lombard jt., 2014). α -glükosidaase võib leida erinevatest elusorganismidest, alustades mikroorganismidest ning lõpetades imetajatega (Lombard jt., 2014). Nad katalüüsivad α -glükosiidsideme hüdrolyüsi, mille tagajärjel glükosiidi mitteredutseerivast otsast vabaneb α -D-glükoos (<http://www.cazy.org/GH13.html>). Maltaas (EC 3.2.1.20) ja isomaltaas (EC 3.2.1.10) on GH13 perekonna liikmed (Lombard jt., 2014). Need kaks ensüümi lagundavad di- ja oligosahhariide, kuid polisahhariide enamasti mitte (<http://www.cazy.org/GH13.html>). Maltaas ehk α -1,4-glükosidaas lõhustab eelistatult α -1,4 glükosiidsidet. *S. cerevisiae* (*Sc*) maltaaside substraatideks on maltoos, sahharoos, maltuloos, turanoos ja maltotriios. *Sc* isomaltaasid lagundavad isomaltoosi, palatinoosi, sahharoosi ja α -metüülglükosiidi (α -MG) (Voordeckers jt., 2012; Deng jt., 2014). Mõlemad ensüümid kasutavad substraadina ka kromogeerset α -glükosiidi PNPG (*p*-nitrofenüül- α -D-glükopüranosiid). Nimetatud suhkrute koostis ja sidemetüübid on skeemina esitatud joonisel 1. Pärmidel on nii maltaase kui ka isomaltaase. Näiteks pagaripärmi tüvel S288c on viis isomaltaasi (IMA1-IMA5) ja kaks maltaasi (MAL12 ja MAL32) (Teste jt., 2010; Voordeckers jt., 2012).



Joonis 1. *Sc* maltaaside ja isomaltaaside substraadid. Glükoos on tähistatud rohelse ringina, fruktoos sinisena. Välja on toodud sidemete tüübid. Joonise koostamisel kasutati joonist 1 artiklist Viigand jt., 2016 ja andmebaasi PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

α -glükosidaaside katalüüsis on võtmerollis happelised aminohapped, IMA1 valgul, mis ainsana pärmide maltaasidest ja isomaltaasidest on kristallitud, on nukleofiiliks Asp215 ja alus-hape katalüüsijaks Glu277 (Yamamoto jt., 2010). Maltaaside ja isomaltaaside substraatide (nt maltoosi või isomaltoosi) mitteredutseeriva otsa glükoosijääk seostub aktiivtsentri -1 alampiirkonda ja redutseeriva otsa glükoosijääk alampiirkonda +1, kusjuures seostumine +1 piirkonnas on nõrgem ja toimub peamiselt hüdrofoobsete interaktsioonide kaudu. Pärast seda, kui toimub substraadi glükosiidsideme lõhkumine seostumispositsioonide -1 ja +1 vahelt, moodustub glükosüül-ensüüm vaheühend – glükoosijääk jääb seotuks nukleofiiliga (Asp215 IMA1 puhul; joonis 2) (Yamamoto jt., 2010). Selle vaheühendi pärast konkureerivad nukleofiilid – vesi ja muud lahuses olevad ühendid. Kui α -glükosüüli jäägi aktseptoriks on vesi, toimub hüdrolyüsireaktsioon ja glükoos vabaneb keskkonda.



Joonis 2. Glükosüül-ensüüm vaheühendi moodustumine ja hüdrolyüsireaktsiooni toimumine *S. cerevisiae* IMA1 näitel (alusena kasutati joonist artiklist Yamamoto jt., 2010).

Lisaks α -glükosidaaside võimele hüdrolyüsida di- ja trisahhariide on mitmel neist ka transglükosüülimisvõime (Mangas-Sánchez ja Adlercreutz, 2015). Transglükosüülimisel toimib glükosüül-ensüüm vaheühendile nukleofiilina (aktseptorina) lahuses olev mono- või oligosahhariid ja produktina moodustub kas disahhariid või pikem oligosahhariid (Avigad, 1959; Mangas-Sánchez ja Adlercreutz, 2015).

Transglükosüülimist soodustab reeglina kõrge suhkru kontsentratsioon reaktsioonikeskkonnas (Mangas-Sánchez ja Adlercreutz, 2015). Transglükosüülimisel sünteesitud sidemed võivad erineda neist, mida konkreetne ensüüm ise suudab substraadis lagundada. Näiteks *Xanthophyllomyces dendrorhous* sünteesib maltoosist oligosahhariide, mida ise ei suuda hüdrolyüsida (Fernández-Arrojo jt., 2007). *Sc* maltaas transglükosüülib sahharoosi isomeletsitoosiks, kui substraadi kontsentratsioon on kõrge (Chiba jt., 1979). Samas näitasid Mangas-Sánchez ja Adlercreutz (2015), et näiteks maltoosist ei suutnud *Sc* maltaas transglükosüülimisprodukte moodustada. Nimetatud autorid kasutasid oma katsetes kõrgeima maltoosi kontsentratsioonina 325 mM maltoosi. Ka mõnel bakteri α -glükosidaasil on võime

suhkruid transglükosüülida, näiteks probiootilise bakteri *Bifidobacterium breve* UCC2003 α -glükosidaasidel Agl1 ja Agl2 (Pokusaeva jt., 2009). Meemesilase (*Apis mellifera*) α -glükosidaas HBG-III (*Honeybee α -glucosidase III*) on ka nii hüdrolyüsija kui ka transglükosüülaja (Ngiwsara jt., 2012). 85% mee suhkrutest on monosahhariidid – glükoos ja fruktoos (Doner, 1977). Need moodustuvad, kui meepõide sekreteeritud HBG-III hüdrolyüsib nektaris või mesikastes sisalduvaid suhkruid, peamiselt sahharoosi (Ngiwsara jt., 2012). Mees leiduvad oligosahhariidid tekivad transglükosüülimisreaktsiooni käigus, mida viib läbi meemesilase HBG-III (Ruiz-Matute jt., 2010). Sahharoosi transglükosüülimisel on peamine produkt erloos (Glc- α 1,4-Glc- β 1,2-Fru) ja maltoosi korral maltotriosis (Ngiwsara jt., 2012). *Aspergillus niger*'i α -glükosidaas moodustas maltoosist transglükosüülimisproduktina peamiselt panoosi (Glc- α 1,6-Glc- α 1,4-Glc), kuid tekkis ka isomaltoosi (Mangas-Sánchez ja Adlercreutz, 2015).

Maltoosil suudavad kasvada mitmed pärmid nagu *S. cerevisiae* (Needleman jt., 1978), *S. carlsbergensis* (Krakenaite ja Glemzha, 1983), *Schwanniomyces occidentalis* (Rose, 1995), *Klyuveromyces lactis* (Goffrini jt., 1995), *Candida albicans* (Kelly ja Kwon-Chung, 1992), *C. tsukubaensis* (Kinsella jt., 1991) ja *Ogataea (Hansenula) polymorpha* (Alamäe ja Liiv, 1998). Need pärmid hüdrolyüsivad maltoosi maltaasiga. Pärmide maltaasid hüdrolyüsivad lisaks maltoosile ka sahharoosi ning sahharoosi isegi kiiremini kui maltoosi. Selle põhjuseks võib olla see, et hüdrolyüsil moodustuv glükoos on tugevam maltaasi konkurentne inhibiitor kui fruktoos (Krakenaite ja Glemzha, 1983; Viigand jt., 2016). Siiski ei osale maltaas sahharoosi kasutamises näiteks pärmil *S. cerevisiae*, millel on rakukestaga seotud invertaas. Invertaasnegatiivsetel pärmidel nagu *Candida albicans* ja *O. polymorpha* osaleb maltaas nii sahharoosi kui ka maltoosi kasutamises (Geber jt., 1992; Alamäe ja Liiv, 1998). Maltoosil suudavad kasvada ka paljud bakterid. Näiteks *E. coli* suudab kasutada maltoosi süsinikuallikana, kuid pärmidele tüüpilist maltaasi tal ei ole. *E. coli*'s konverteeritakse rakku transporditud maltoos maltodekstriinideks ning nende hüdrolyüs toimub amüloomaltaasi, maltodekstriini fosforülaasi ja maltodekstriini glükosidaasi vahendusel (Boos ja Shuman, 1998). Mitmel bakteril, näiteks *Staphylococcus xylosum* (Egeter ja Brückner, 1995), *Bacillus subtilis* (Schönert jt., 1998), *B. stearothermophilus* ja *B. thermoglucosidarius* (Tsujiimoto jt., 2007) ja termofiilsel arhel *Sulfolobus solfataricus* (Rolfmeier ja Blum, 1995) on aga maltoosi kasutamiseks maltaas. Bakterite maltaaside afiinsus on reeglina maltoosile suurem kui PNPG'le, pärmide maltaasid on vastupidiselt PNPG'le tunduvalt afiinsemad kui maltoosile (Liiv jt., 2001 ja sealsed viited).

Inimesel on neli erinevat α -glükosidaasi, mis erinevad paiknemise, funktsiooni ja substraadispetsiifika poolest. Kaks rakuvälist α -glükosidaasi osalevad peensooles tähtselt

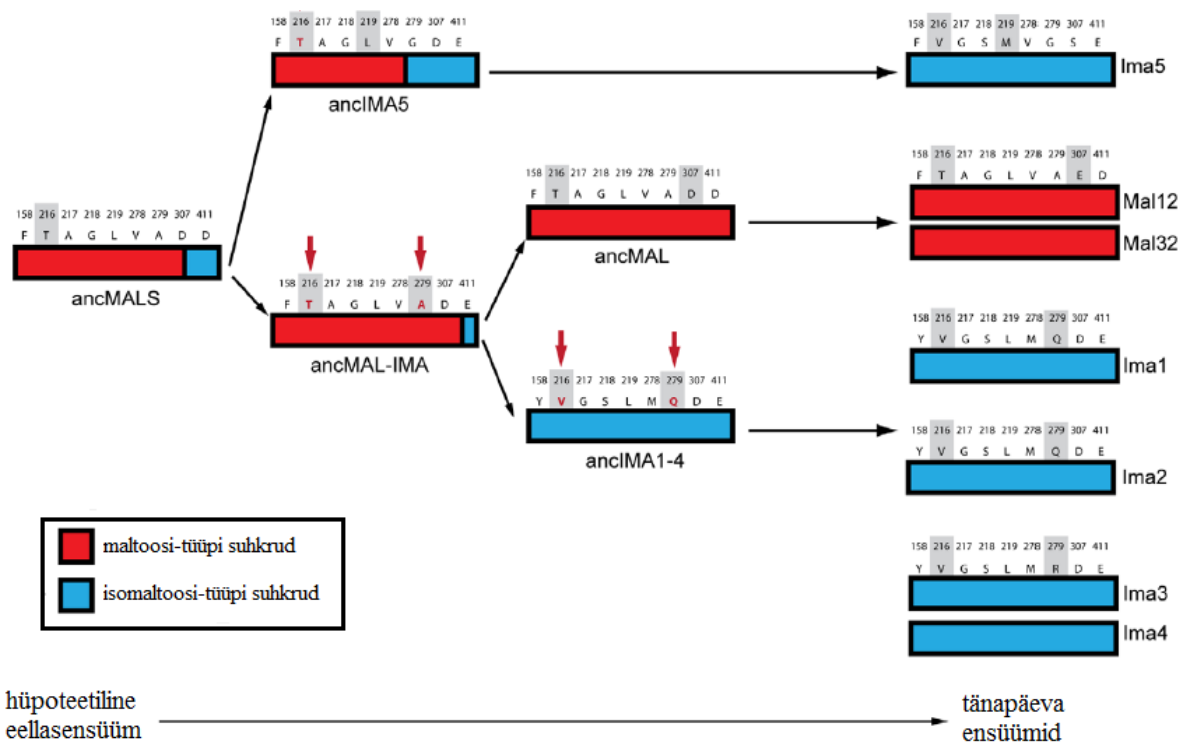
lagundamisel. Tärglise molekul koosneb hargnemata selgroost, kus glükosüüli jääkide vahel on α -1,4-glükosiidside, harud liituvad α -1,6-glükosiidsidemete kaudu (Damager jt., 2010). Inimesel algab tärglise lõhustamine sülje ja pankreaseenõre α -amülaasiga, mis hüdrolüüsib tärglise dekstriinideks. Seejärel hüdrolüüsivad peensoole limaskesta rakkudele ankurduvad α -glükosidaasid need glükosiks, mis imendub soolestikuvalendikust rakkudesse. Dekstriine hüdrolüüsivateks ensüümideks soole limaskestas on maltaas-glükoamülaas (MGA; EC 3.2.1.20 ja 3.2.1.3) ja sukraas-isomaltaas (SI; EC 3.2.148 ja 3.2.1.10). MGA hüdrolüüsib ahela lineaarseid piirkondi (α -1,4-glükosiidsidemeid) ja SI hargnemiskohti (α -1,6-glükosiidsidemeid). Seega täiendavad need kaks ensüümi üksteist tärglise lagundamisel (Nichols jt., 1998). Need kaks α -glükosidaasi ekspresseeruvad ka keelel, kus nad osalevad disahhariidide magusa maitse äratundmisel (Sukumaran jt., 2016). Inimesel on ka kaks rakusisest α -glükosidaasi. Üks neist on α -1,4-glükosiidsidemeid hüdrolüüsiv lüsoosomaalne α -glükosidaas. Ta osaleb lüsoosoomides glükogeeni lõhustamisel glükosiks. Selle ensüümi puudumine põhjustab Pompe haigust (Hers, 1963). Teine inimese rakusisene α -glükosidaas, glükosidaas II, reguleerib valkude transporti. See ensüüm hüdrolüüsib α -1,3-glükosiidsidemeid. Glükosidaas II paikneb endoplasmaatilise võrgustiku valendikus, kus trimmib glükoproteiinide oligosahhariidset osa ning tagab sellega glükoproteiinide õige rakusisese transpordi (Pelletier jt., 2000).

1.2. Pärmitse maltaaside ja isomaltaaside evolutsioon – ürgmaltaasi hüpotees

Voordeckers jt. publitseerisid 2012. aastal töö, mille eesmärgiks oli uurida geenide duplitseerumise rolli valkude evolutsioonis. Mudelsüsteemiks valiti pärmitse α -glükosidaasid (nimetatud ka MALS valkudeks ja maltaasideks). Selles töös kasutati ka ühe tänapäevase α -glükosidaasi, Sc isomaltaasil IMA1 kristallstruktuuri (Yamamoto jt., 2010), mis võimaldas ennustada aminohapete paiknemist aktiivtsentris nii muteeritud kui ka järjestuselt sarnastes valkudes. Duplitseerumiste ja mutatsioonide mõju ennustamiseks α -glükosidaaside evolutsiooni käigule kasutati mitmeid analüüsimeetodeid, rekonstrueeriti ja sünteesiti hüpoteetilised eellasensüümid, hinnati tänapäevaste ja rekonstrueeritud ensüümide substraadivalikut ja kineetikat ning modelleeriti nende seonduvusi substraadiga (Voordeckers jt., 2012).

Pärmitsest pärinevate 50 erineva α -glükosidaasi valgujärjestuste võrdlemise alusel konstrueeriti fülogeneesipuu. Selle põhjal püstitati hüpotees, et maltaasid ja isomaltaasid on arenenud ühisest eellasensüümist ancMALS, mis oli laia substraadivalikuga – lagundas mõõduka aktiivsusega

nii maltoosi- kui ka isomaltoosi-tüüpi suhkruid. Evolutsiooni käigus moodustusid sellest eellasvalgust kitsama substraadivalikuga spetsialiseerunud ensüümid: *Sc* puhul nimetatakse neid maltaasideks (tüvel S288c MAL12 ja MAL32) ja isomaltaasideks (tüvel S288c IMA1-5) (Voordeckers jt., 2012; joonis 3).



Joonis 3. Hüpotees laia substraadivalikuga eellasensüümi ancMalS evolutsiooni kohta seitsmeks tänapäevaseks *Sc* α -glükosidaasiks. Ensüümide substraadispetsiifika on kujutatud maltoosi- ja isomaltoosi-tüüpi suhkrute hüdrolüüsi aktiivsuste osakaaluna. Iga ensüümi puhul on välja toodud üheksa varieeruvat aminohappejääki substraadi seondumispirkonna lähedal, mis on olulised α -glükosidaaside substraadispetsiifikas (nummerdatud IMA1 järjestuse põhjal). Hallil taustal on need aminohappejäägid, mis on põhjustanud substraadispetsiifika muutust. Joonis on modifitseeritud artiklist Voordeckers jt., 2012.

Sc maltaaside ja isomaltaaside evolutsioon on heaks näiteks, kuidas pärast geeni duplitseerumist kaks geenikoopiat iseseisvalt divergeeruvad ning vastavad geeniproduktid spetsialiseeruvad peamiselt ühele mitmest funktsioonist, mis oli olemas eellasvalgul. Autorid paigutavad eespool kirjeldatud duplitseerumissündmused ajavahemikku 150-100 miljonit aastat tagasi. See langeb kokku ajaperioodiga, mil tekkisid ja levisid katteseemnetaimed. Uudsete süsinikuallikate teke lõi uue niši, toetades *MALS* geenide uute variantide teket (Voordeckers jt., 2012).

Kõigil pärmidel ei ole mitut α -glükosidaasi (*MALS* valku). Näiteks pärmil *Lodderomyces elongisporus* on vaid üks α -glükosidaas, seega ei ole evolutsiooni käigus selle geeni duplitseerumist toimunud. Selle α -glükosidaasi lai substraadivalik sarnaneb ürgmaltaasi omaga – ta hüdrolüüsib nii maltoosi- kui ka isomaltoosi-tüüpi suhkruid (Voordeckers jt., 2012). Ka pärmide *Ogataea polymorpha* (Viigand jt., 2016), *Lipomyces starkeyi* (Kelly jt., 1985) ja

Torulaspota pretoriensis (Oda jt., 1993) α -glükosidaasidel on lai substraadivalik, mis sarnaneb ürgmaltaasi omaga.

Pärmide maltaasi geenide koopiaarv on muutunud ka inimtegevuse tagajärjel. Tänapäeva tööstuslikud pärmitüved on arvatavasti evolutsioneerunud vaid paarist eellastüvest. Õlletööstuse pärmid on „kodustatud“, mille tõttu on nende genoom vaesunud, näiteks on kadunud sugulise paljunemise võime. Samas on tõhustunud virdesuhkrute kääritsemine. See on toimunud läbi *MAL* geenide duplikatsioonide ja mutatsioonide (Gallone jt., 2016). Õllevirde suhkrutest moodustab maltoos ~60%, maltotriios ~20% ning sahharoos, glükoos ning fruktoos moodustavad kokku ~20%. Õllepärmid on eriliselt head maltotriioosi kasutajad (Magalhães jt., 2016). Maltotriioosi efektiivne kasutamine korreleerub maltoosi transportervalgu *MAL11* alleeli *AGT1* olemasoluga pärmis. See alleel on olemas ainult õllepärmides, samas kui veinipärmidel puudub terve *MAL1* lookus (Gallone jt., 2016).

Inimese peensoole α -glükosidaasid, maltaas-glükoamülaas (*MGA*) ja sukraas-isomaltaas (*SI*), pärinevad samuti ühest ühisest eellasest. Eellasgeenis toimus kõigepealt tandemne geeniduplikatsioon, mille tulemusena on mõlemal tänapäevasel valgul kaks funktsionaalselt domääni – N-terminaalne ja C-terminaalne. Teise duplitseerumise tulemusena moodustus kaks geeni, mille substraadispetsiifika evolutsiooni käigus lahkes. *SI* ja *MGA* on kõikidel sekveneeritud genoomiga imetajatel sisemiselt duplitseerunud – järelikult leidis tandemduplikatsioon aset enne imetajate eraldumist eellasest. Lüsosomaalne α -glükosidaas on evolutsiooniliselt vanem, see ei ole duplitseerunud ühelgi sekveneeritud imetajal. Neljas inimese α -glükosidaasidest, glükosidaas II, on neist kolmest ülejäänust valgust evolutsiooniliselt kaugeim (Nichols jt., 2003).

1.3. *Saccharomyces cerevisiae* ja *Bacillus thermoglucosidasius*'e isomaltaaside muteerimine substraadivaliku muutmiseks

Maltaasi valgud ja neid kodeerivad geenid avastati varem (Krakenaite ja Glemzha, 1983; Needleman, 1991) kui isomaltaase kodeerivad geenid. *Sc* isomaltaasi valke kodeerivad geeniperekonda *IMA* kuuluvad geenid *IMA1-IMA5*. Need geenid avastati *S. cerevisiae* S288c genoomi fülogeneetilise analüüsi käigus (Naumoff ja Naumov, 2010) ning tõestati vastavate valkude funktsiooni uurimisega (Teste jt., 2010). *GH13* perekonna esindajatel, sh maltaasidel ja isomaltaasidel, on neli tugevasti konserveerunud regiooni (I, II, III, IV). Samuti on perekonnas konserveerunud katalüütilised aminohappejäägid (*IMA1* puhul Asp215, Glu277 ja Asp352) (Matsuura jt., 1984; Nakajima jt., 1986). *Sc*'l on isomaltaase kodeerivad geenid omavahel 66-100% ulatuses identsed ning maltaaside geenidega on nad 63-74% ulatuses

identsed (Teste jt., 2010). Maltaaside ja isomaltaaside erineva substraadivaliku põhjuste kindlakstegemiseks on ensüüme muteeritud ja analüüsitud.

Läbimurde α -glükosidaaside substraadispetsiifika uurimisel tegid Yamamoto ja teised (2004) – nad näitasid Val216 (IMA1 numeratsioon) olulisust isomaltoosi kasutamisel. *Sc* maltaasist ja isomaltaasist (IMA1) konstrueeriti fragmentide vahetamisel kimäärseid ensüüme ja tehti ka suunatud aminohappe asendusi IMA1 valgus. Fragmendis, mis sisaldab konserveerunud regiooni II (tabel 1), erinevad maltaasid ja isomaltaasid kuues positsioonis.

Tabel 1. *S. cerevisiae* maltaasi ja isomaltaasi IMA1 konserveerunud regiooni II võrdlus. Tabel on koostatud Yamamoto jt., 2004 andmetel. Katalüütiline nukleofiil on tähistatud sinisega. Punasega on tähistatud aminohapped, mis on maltaasil ja isomaltaasil erinevad.

| Ensüüm/positsioon | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Sc</i> maltaas | D | G | F | R | I | D | T | A | G |
| <i>Sc</i> isomaltaas IMA1 | D | G | F | R | I | D | V | G | S |

Kolmes positsioonis kuuest oli toimunud asendus sarnase aminohappega, seega võiksid erinevusi substraadispetsiifikas põhjustada ülejäänud kolm. Need kolm positsiooni on tähistatud tabelis 1 punase värviga. Isomaltaasi mutandid G217A ja S218G ei erinenud substraadivaliku poolest metsiktüüpi valgust. Samas, mutandil V216T lisandus võime hüdrolüüsida ka α -1,4-glükosiidsidemega substraati. Kui muteeriti lisaks V216T'le veel üks või kaks aminohappejääki positsioonides 217 ja/või 218 maltaasile sarnaseks, siis tõhustus maltoosi kasutamine ja alanes isomaltoosi kasutamine. Seega mängivad ensüümi substraadivalikus rolli kõik kolm positsiooni. Val216 paikneb IMA1 valgus katalüütilise nukleofiili Asp215 kõrval (Yamamoto jt., 2004).

Ka batsillide α -glükosidaase on uuritud substraadispetsiifika ja seda määravate aminohapete aspektist. Uurimisobjektideks on olnud *B. stearothermophilus*'e (*Bs*, ka *Geobacillus stearothermophilus*) ja *B. thermoglucosidasius*'e (*Bt*, *Geobacillus thermoglucosidasius*) α -glükosidaasid. *Bs* α -1,4-glükosidaas on väga spetsiifiline α -1,4-glükosiidsidemete hüdrolüüsija (Takii jt., 1992), samas kui *Bt* oligo-1,6-glükosidaas hüdrolüüsib spetsiifiliselt α -1,6-glükosiidsidemeid (Tsujimoto jt., 2007).

Valkude aminohappelistest joondustest võrdlusel valiti *Bt* oligo-1,6-glükosidaasil välja 8 positsiooni, mille aminohappejäägid asendati *Bs* α -1,4-glükosidaasi vastavate aminohappejääkidega. Kokku analüüsiti 20 erinevat muteeritud varianti *Bt* oligo-1,6-glükosidaasist ja leiti, et jällegi mõjutas substraadivalikut kõige enam konserveerunud regioon II, aga ka regioon III (joonis 4). Kõige suurem erinevus substraadispetsiifilisuses metsiktüüpi valgust tuvastati *Bt* oligo-1,6-glükosidaasi mutandil, millel 8 aminohapet oli asendatud vastavate *Bs* aminohapetega (*Bt* V101I/V200A/N202S/M203H/T257A/P258N/Y325F/Q331L

mutant), millest võib järeldada, et nende 8 positsiooni aminohapped mängivad rolli substraadivalikus. Samas oli selle mitmikmutandi katalüütiline efektiivsus märkimisväärselt langenud. Üksikmutantide analüüsil selgus, et substraadispetsiifikat mõjutasid kõige enam mutatsioonid V200A (vastab *Sc* IMA1 positsioonile 216) ja P258N (regioon III; joonis 4). Oluline on see, et need üksikmutatsioonid ei põhjustanud suurt langust katalüütilises efektiivsuses.



Joonis 4. Konserveerunud piirkonnad II ja III batsillide α -glükosidaasides.

BS1,4 – *Bs* α -1,4-glükosidaas; BT1,6 – *Bt* oligo-1,6-glükosidaas. Joonis koostati Tsujimoto jt., 2007 alusel.

Järeldati, et V200 ja P258 osalevad *Bt* oligo-1,6-glükosidaasil isomaltoosi sidumisel, A200 ja N258 aga *Bs* α -1,4-glükosidaasis maltoosi sidumisel. *Bt* oligo-1,6-glükosidaas V200A hüdrolüüsis maltoosi ja isomaltoosi enam-vähem võrdselt hästi. Ka *Bt* oligo-1,6-glükosidaasi mutandil P258N oli maltoosi hüdrolüüsiv aktiivsus olemas, mis näitab, et ka III regioonis asuvad aminohappejäägid osalevad substraadispetsiifika kujundamisel. *Bt* V200A/P258N kaksikmutandil oli afiinsus maltoosile kõrgem kui isomaltoosile ning ta hüdrolüüsis maltoosi efektiivsemalt (Tsujimoto jt., 2007).

1.4. *Ogataea polymorpha* maltaas MAL1

Ogataea perekonda kuuluvad pärmid on metülotroofid – nad suudavad kasvada ühesüsinikulisel alkoholil – metanoolil. Vähemalt neli selle perekonna esindajat – *O. polymorpha* (*Op*) (Viigand jt., 2016), *O. parapolyomorpha* DL-1 (Ravin jt., 2013); *O. nakhonphanomensis* ja *O. thermomethanolica* (Limtong jt., 2008) – suudavad kasvada ka disahhariididel, nt maltoosil ja sahharoosil. Pärm *Ogataea* liike on isoleeritud mullast, riknenud apelsinimahlast, taimede lehtedelt ja eritistest, putukate soolestikust ja mujalt (Morais jt., 2004; Limtong jt., 2008 ja viited selles). Nendes elukohtades saavad pärmid kasutada metanooli, mis tekib pektiini ja ligniini lagunemisel (Nakagawa jt., 2005), kuid seal on ka substraate α -glükosidaasidele (Viigand jt., 2016). Meie grupis on uuritud disahhariidide metabolismi *Ogataea polymorpha*’l alates 1998. aastast. Oleme iseloomustanud kahte di- ja trisahhariidide metabolismiks vajalikku valku, mida kodeeritakse genoomses MAL lookuses. MAL1 kodeerib maltaasi ja MAL2 kodeerib α -glükosiidi transporterit. Lisaks on MAL lookuses veel kaks potentsiaalset MAL aktivaatori geeni. Geenide MAL1 ja MAL2 orientatsioon

genoomis on divergentne nagu ka paljude teiste pärmide vastavatel geenidel. Nende kahe geeni ekspressioon on koordineeritult reguleeritud ühiselt geenidevaheliselt promootoralalt – seda repressseerib glükoos ning indutseerib maltoos (Viigand jt., 2005). Kuna maltaasi ekspressiooni indutseerib rakusisene maltoos, sõltub see ka transporterite olemasolust (Viigand ja Alamäe, 2007).

Op on evolutsiooniliselt vanem kui *Sc* (Morel jt., 2015). Huvitaval kombel on *Op* maltaas sarnane hüpoteetilise laia substraadivalikuga ürgmaltaasiga, millest võisid areneda *Sc* tänapäevased maltaasid ja isomaltaasid (Viigand jt., 2016). Aastal 1998 näitasid Liiv jt., et *Op* maltaas suudab kasutada mitte ainult maltoosi ja sahharoosi, vaid ka isomaltoosi sünteetilist analoogi α -metüülglükosiidi, mida hüdrolyüsivad ka *Sc* isomaltaasid (Teste jt., 2010). Hiljem näidati (Viigand jt., 2016), et *Op* MAL1 valgul on ürgmaltaasiga (Voordeckers jt., 2012) väga sarnane lai substraadivalik. Neil kahel ensüümil on ka tugevalt konserveerunud aminohappejäägid neis positsioonides, mis on olulised α -glükosidaaside substraadispetsiifika määramisel (Voordeckers jt., 2012; Viigand jt., 2016). *Op* MAL1 on α -glükosidaas, millel on maltaasne ja isomaltaasne aktiivsus optimiseeritud ühes ensüümis. MAL1 suudab hüdrolyüsida järgmisi suhkruid (loetletud afiinsuse kahanemise järjekorras): palatinoosi, maltuloosi, maltotrioosi, sahharoosi, isomaltoosi, turanoosi, maltoosi, meletsitoosi, 1-kestoosi ja 6-kestoosi (Viigand jt., 2016). Seega, kuigi *Op* MAL1 on aastast 2001 nimetatud maltaasiks (Liiv jt., 2001), oleks selle õige nimetus maltaas-isomaltaas (Viigand jt., 2016).

MAL1 mutagenees võiks anda palju informatsiooni α -glükosidaaside substraadivalikut mõjutavate aminohappejääkide kohta, sest MAL1 on laia substraadispetsiifikaga ensüüm ning teda saab muteerida mõlemas suunas – et tõsta tema võimet hüdrolyüsida maltoosi-tüüpi või isomaltoosi-tüüpi substraate. Kui *Op* maltaasi geeni viidi sisse T200V mutatsioon (vastav positsioon *Sc* IMA1 valgus on 216), siis langes valgu võime hüdrolyüsida maltoosi-tüüpi suhkruid – maltoosi, sahharoosi, turanoosi, maltotrioosi ning meletsitoosi. Mutandi T200V mutandi afiinsus isomaltoosi-tüüpi suhkrutele alanes, K_{cat} (katalüütiline konstant) aga suurenes, nii et kokkuvõttes katalüütiline efektiivsus isomaltoosi-tüüpi suhkrutele oli mutandil praktiliselt sama mis metsiktüüpi valgul. Seega muutus T200V mutant sarnasemaks isomaltaasidele, sest tal alanes märgatavalt just maltoosi-tüüpi suhkrute kasutamine (Viigand jt., 2016). Järelikult on α -glükosidaasidel maltoosi-tüüpi substraadide kasutamiseks tõesti oluline, et positsioonis 216 (IMA1 järgi, *Op*'l 200) oleks treoniini jääk (Yamamoto jt., 2004; Viigand jt., 2016).

Kuna *Op* maltaasi valgu jaoks on ideaalseks substraadiks trisahhariid maltotrioos (kõrgeim katalüütiline efektiivsus ja tugev termostabiliseerimise võime), siis järeldati, et ensüümi substraadiga seondumise piirkond koosneb kolmest alampiirkonnast: -1, +1 ja +2. Glükoos seondub tõenäoliselt kõigi kolme alampiirkonnaga, seondumine -1 alampiirkonnas on

tõenäoliselt kõige tugevam, sest see on glükosispetsiifiline alamsait. Fruktoos seondub tõenäoliselt nõrgemini ja ainult +1 alampiirkonnaga (Viigand jt., 2016).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö põhieesmärk oli uurida pagaripärmist evolutsiooniliselt vanema pärm *Ogataea polymorpha* maltaasi MAL1 substraadispetsiifikat määravaid aminohappeid. Selleks analüüsisime pärmide α -glükosidaaside järjestusi ja otsustasime suunatud mutageneesiga teha kaks MAL1 mutanti. Veel soovisime sisse seada α -glükosidaaside substraadispetsiifika määramise mikroplaadi-metoodika ning testida, kas α -glükosidaaside substraadikasutuse määramiseks saab kasutada puhastatud valgu asemel valku üle-ekspresseeriva *E. coli* lüsaati. Sellised lahendused muudaksid edasise uurimistöö odavamaks ja kiiremaks. Samuti oli eesmärgiks uurida *Op* maltaasi valgu seni uurimata omadust – transglükosüülimisvõimet.

Töös püstitati järgmised ülesanded:

1. Võrrelda pärmide maltaaside ja isomaltaaside aminohappelisi järjestusi ja valida välja positsioonid *Op* MAL1 mutageniseerimiseks muutmaks selle substraadivalikut;
2. Konstrueerida *Op* MAL1 mutandid Gly259Ala ja Gly259Arg;
3. Ekspresseerida mutantseid maltaase Gly259Ala ja Gly259Arg *E. coli*'s, puhastada valgud ning iseloomustada nende katalüütilisi omadusi võrrelduna muteerimata valguga;
4. Töötada välja metoodika puhastatud maltaasi valkude kineetiliste parameetrite, sh substraadispetsiifilisuse määramiseks mikrotiiterplaadil;
5. Hinnata maltaasi valgu omadusi mikrotiiterplaadil, kasutades ensüümpreparaadina maltaasi üle-ekspresseeriva *E. coli* rakuekstrakti;
6. Uurida MAL1 valgu transglükosüülimisvõimet.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutati maltaaside ekspressiooniks *E. coli* tüve BL21(DE3) [hsdSgal (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1), mille genoomis on IPTG'ga (isopropüül- β -D-1-tiogalaktopüranosiid) indutseeritav T7 polümeraasi promootor (Studier ja Moffatt, 1986). Maltaasi geenide ekspresseerimiseks kasutati kõrge koopiarvuga pURI3 plasmidi (Rivas jt., 2007). Sellesse plasmidi oli varem kloneeritud *O. polymorpha* maltaasi geen *MAL1* ja maltaasi mutandi T200V

geeni (Viigand jt., 2016). Selles töös kloneriti pURI3 plasmidi kaks erinevat mutantset *MAL1* geeni. pURI3-MAL1Cter plasmiidilt ekspresseerides lisandub maltaasi valgu C-terminusesse His₆-järjestus, mis võimaldab valgu puhastamist Ni²⁺-afiinsuskromatograafia abil.

2.2.2. *Ogataea polymorpha* maltaasi mutantide konstrueerimine

Mutatsioonide sisseviimiseks *MAL1* geeni kasutati kohtsuunatud muteerimist megapraimeri meetodil (Wei jt., 2004; Visnapuu jt., 2011). Meetodika on põhjalikult kirjeldatud Mihkel Vaheri bakalaureusetöös (Vaher, 2013). Käesolevas töös on kasutatud vastavaid plasmiide ning praimereid, mis on esitatud tabelis 2. Halli taustaga on tabelis tähistatud koodon, mis vastab muudetavale aminohappele ning alla on joonitud nukleotiidid, mis tähistavad mutatsiooni asukohta. Praimeritel HPMAL1_PURICterm_Fw ja HPMAL1_PURICterm_Rev on alla joonitud pURI3 vektoriga komplementaarne osa ning kaldkirjas on *MAL1* geeni järjestusega komplementaarne osa. Praimeris HPMAL1_PURICterm_Fw on rasvases kirjas märgitud *MAL1* geeni startkoodon.

Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid ja praimerid.

| Plasmiid | Praimer | Praimeri järjestus | Viide/märkus |
|---------------------|-----------------------|--|-------------------|
| pURI3 | - | - | Rivas jt., 2007 |
| pURI3-MAL1Cter | - | - | Viigand jt., 2016 |
| pURI3-MAL1T200VCter | Thr200Val_Rev | 5'-GAGGCCGGCAACGTCGATTCTG-3' | Viigand jt., 2016 |
| pURI3-MAL1G259RCter | Gly259Arg_Rev | 5'-AGTGACGCACTTCTCCGACAGTC-3' | Käesolev töö |
| pURI3-MAL1G259ACter | Gly259Ala_Rev | 5'-AGTGAGCCACTTCTCCGACAGTC-3' | Käesolev töö |
| - | T7 | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' | - |
| - | HPMAL1_PURI Cterm_Fw | 5'- <u>TA</u> ACTTTAAGAAGGAGATATACAT <i>ATGACTATCGAGTCTCAAGAACCT</i> -3' | Viigand jt., 2016 |
| - | HPMAL1_PURI Cterm_Rev | 5'- <u>GCTATTAATGATGATGATGATGAT</u> <i>GATGACCTCGATCAGTCTACCTTC</i> -3' | Viigand jt., 2016 |
| - | MAL5 | 5'-CTGACTTGAAGTGGGAGAACC-3' | Kontrollpraimer |
| - | MAL9 | 5'-TTAGTCATACCAATCTCTTGACC-3' | Kontrollpraimer |

Megapraimer ehk mutatsiooni sisaldav PCR'i fragment sünteesiti kasutades matriitsina pURI3-MAL1Cter plasmidi (Viigand jt., 2016) ning muteerimispraimereid Gly259Arg_Rev ja Gly259Ala_Rev. Vastasahela sünteesiks kasutati praimerit T7 (tabel 2). Megapraimeri pikendamiseks PCR reaktsiooniga kasutati matriitsina plasmidi pURI3-MAL1Cter. Mutantse *MAL1* geeni ottesse 24-27 ap pikkused vektoriga komplementaarsete järjestuste

sünteesimiseks kasutati praimereid HPMAL1_PURICterm_Fw ja HPMAL1_PURICterm_Rev (tabel 2). Produkti olemasolu ja pikkust (1741 ap) kontrolliti 1% agarosgeelil ning see puhastati ZYMO RESEARCH (USA) DNA Clean & Concentrator™-5 komplektiga vastavalt tootjapoolsetele soovitudele. Järgnevalt kloneeriti mutantne *MAL1* geen pURI3 vektorisse. Saadi plasmiidid pURI3-MAL1G259RCter ja pURI3-MAL1G259ACter.

2.2.3. DNA eraldamine, transformatsioon bakterisse ja mutatsiooni kontrollimine

Transformeerimiseks kasutati kompetentseid *E. coli* BL21 (DE3) (Studier ja Moffatt, 1986) rakke. Mutantset maltaasi geeni kandev plasmiidne DNA viidi kompetentsetesse rakkudesse elektroporatsiooniga (Sharma ja Schimke, 1996) pingel 1.8 kV (GenePulser Xcell™; BIO-RAD, USA). Seejärel kasvatati rakke 1 h 1 ml LB vedelsöötmes 37°C loksutil, tsentrifuugiti 1 min 12 000 g ja plaaditi ampitsilliini (Amp) (0.15 mg/ml) sisaldavale selektiivsöötmele. Rakke kasvatati üleöö 37°C termostaadis. Transformantide kolooniad külvati ümber LB-Amp tardsöötmele ning igas ümberkülvatud koloonias kontrolliti *MAL1* geeni olemasolu PCR'ga, kasutades praimereid MAL5 ja MAL9 (tabel 2). PCR'i produkte kontrolliti 1% agarosgeelil, lisades proovidele eelnevalt 3 µl geelivärvi (0.05% broomfenoolsinine 50% glütseroolis). *MAL1* geeni sisaldavatel kolooniatel kontrolliti võimet toota funktsionaalset maltaasi valku. Selleks külvati kolooniad ümber LB-Amp tardsöötmele, mis sisaldas 0.5 mM IPTG'd ning rakke kasvatati üleöö toatemperatuuril. Maltaase aktiivsuse tuvastamiseks testiti *p*-nitrofenooli teket *p*-nitrofenüül- α -D-glükopüranosiidist (PNPG) (Zimmermann jt., 1977) temperatuuril 37°C. Reaktsioon viidi läbi Elisa plaadil ning inkubatsioonisegu sisaldas järgmisi komponente: 100 mM K-fosfaatpuhver (pH 6.5), 1 mM PNPG, rakuekstrakt ning 1% CTAB (tsetüültrimetüülammooniumbromiid). Reaktsioon algatati PNPG lisamisega, 10 min möödudes peatati reaktsioon 1 M naatriumkarbonaadi lisamisega ning hinnati õlgkollase värvuse teket. Kollase värvuse ilmumine kinnitas funktsionaalse maltaasi valgu olemasolu bakteris.

Mutatsiooni olemasolu *MAL1* geenis kontrolliti sekveneerimisega. Üleöö LB-Amp tassil kasvatatud rakud suspendeeriti 25 µl mQ vees, kuumutati 15 min temperatuuril 96°C, jahutati jääl ning fuugiti 2 min temperatuuril 4°C 16 100 g. Saadud suspensiooni kasutati PCR produkti amplifitseerimiseks praimeritega MAL5 ja MAL9 ning saadud produkt sekveneeriti. Sekveneerimiseks kasutati BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Kanada) komplekti ja modifitseeritud tootjapoolset protokollit. Esmalt tehti PCR, mille reaktsioonisegu sisaldas 1 µl bakterirakkudest eraldatud DNA-d, 1x Taq puhvrit (Naxo, Eesti), 6.25 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.05 U/µl Taq DNA polümeraasi ja mõlemat praimerit

0.5 pmol/ μ l. Praimeripaarina kasutati primereid MAL5 ja MAL9 (PCR produkt 655 ap). Järgnevalt toimus proovide ExoI-FastAP töötlus 15 min 37 °C, mille käigus FastAP (aluseline fosfataas; Thermo Scientific, USA) eemaldab DNA mõlemast otsast fosfaatrühmad ning ExoI (Thermo Scientific, USA) lagundab üheaheelalise DNA 3'→5' suunas. Ensüümid inaktiveeriti 15 min 80 °C. Edasi valmistati proovid sekveneerimiseks ette tootjapoolsete reaktiividega (0.7 μ l BigDye premiksi, 2 μ l 5x lahjenduspuhvit, 0.9 μ l 4 pmol/ μ l praimerit ja 1 μ l DNA-d; segu maht 10 μ l). Peale sünteesietappi sadestati DNA etanooliga. Ettevalmistatud proovid saadeti sekveneerimisele TÜMRI sekveneerimiskeskusesse. Saadud järjestusi võrreldi metsiktüüpi *MAL1* geeni järjestusega kasutades programmi BioEdit (Hall, 1999).

MAL1 geenis õiget mutatsiooni sisaldavad transformandid külvati 5 ml LB-Amp vedelsöötmesse, kasvatati loksutil temperatuuril 37°C üleöö ning rakkudest eraldati plasmiidne DNA Favor Prep™ Plasmid Extraction Mini Kit-iga (Favorgen Biotech Corp., Taiwan).

2.2.4. Söötmed ja rakkude kasvatamine

E. coli rakke kasvatati temperatuuril 37 °C kas tahkel või vedelas Luria-Bertani (LB) söötmes, kui ei ole märgitud teisiti. Vedelkultuure aereeriti loksutil (180 pööret/min). Transformantide kasvatamisel lisati söötmesse ampitsilliini (0.15 mg/ml).

Maltaasi metsiktüüpi ja mutantseid geene ekspresseeriti *E. coli* BL21 (DE3) tüves. Üleöö LB söötmes kasvanud inokulumi lahjendati 100x ning kasvatati kultuuri optilise tiheduseni $OD_{600}=0.4\dots0.6$. Maltaasi süntees indutseeriti 0.5 mM IPTG lisamisega ning rakke inkubeeriti üleöö temperatuuril 22 °C.

2.2.5. Rakuekstraktide valmistamine

Rakuekstraktide valmistamiseks sadestati bakterirakud tsentrifuugimisega (2400 g, 10 min, 4°C), suspendeeriti 10 ml sonikeerimispuhvis A (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl ja 10 mM imidasool; pH 6.0) ja purustati sonikeerimisega (Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer, USA). Purustatud rakkude suspensioon tsentrifuugiti (2400 g, 20 min, 4°C) ja supernatant filtreeriti läbi 0.2 μ m poorisuurusega filtri. Eraldatud rakulüsaati kasutati valgu puhastamiseks.

Rakulüsaadist maltaasi valgu katalüütiliste parameetrite määramiseks sadestati samuti bakterirakud tsentrifuugimisega (2400 g, 10 min, 4°C), seejärel pesti rakke mQ veega, suspendeeriti 10 ml 100 mM K-fosfaatpuhvis 0.1 mM EDTA'ga (etüleendiamiintetraatsetaat) (pH 6.5) ning purustati sonikeerimise teel. Purustatud rakkude suspensioon tsentrifuugiti (2400 g, 30 min, 4°C) ja supernatant filtreeriti läbi 0.2 μ m poorisuurusega filtri. Valgu kontsentratsioon rakulüsaadist määrati Lowry (1951) meetodil.

2.2.6. Maltaasi valkude puhastamine

Maltaasi valkude puhastamiseks rakulüsaatidest kasutati vedelikkromatograafia süsteemi ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) ja tootjapoolset metoodikat (programm: Affinity purification any His-Trap). Meetodi detailsem kirjeldus on esitatud artiklis Visnapuu jt. (2011). Fraktsioonid koguti ning analüüsiti denatureeriva 10% glütsiin polüakrüülamiidgeelelektrofooresiga (SDS-PAGE), et kontrollida maltaasi olemasolu fraktsioonides (Sambrook jt., 1989). Geelid voolutati toatemperatuuril ja pingel 10 V/cm Mini-PROTEAN Tetra süsteemiga (BIORAD, USA). Maltaasi asukohta geelil hinnati valkude suurusmarkeri Protein Ladder Blue Prestained (Naxo, Eesti) valkude liikumise alusel ning valku sisaldavad fraktsioonid ühendati.

Puhastatud valgud dialüüsiti 100 mM K-fosfaatpuhvrise (35 mM K₂HPO₄, 65 mM KH₂PO₄), pH 6.5, kuhu oli lisatud NaCl (lõppkontsentratsioon 0.3 M). Dialüüsimiseks kasutati 12-14 kDa poorisuurusega dialüüsimembraani ServaPor® (SERVA Electrophoresis GmbH, Saksamaa). Dialüüs toimus temperatuuril 4°C 24 h, puhvrit vahetati vähemalt kaks korda. Saadud lõpppreparaadis määrati valgusisaldus ja maltaasi aktiivsus PNPG'le ja sahharoosile (pt. 2.2.7), lisati EDTA (etüleendiamiintetraatsetaat) lõppkontsentratsiooniga 0.1 mM ning seda kasutati edaspidistes katsetes puhta valgupreparaadina.

Puhastatud valkude kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriliselt (OD₂₈₀) ekstinktsioonikoeffitsendi (ϵ) järgi mikroplaadil (NanoQuantPlate; Tecan Group Ltd., Šveits), kasutades Tecan infinite M200 PROT^M (Tecan Group Ltd., Šveits) mikroplaadilugejat. Andmed koguti Tecan'i control programmiga (Tecan Group Ltd., Šveits). Valgukontsentratsiooni arvutamiseks kasutati valemit $C = A / (\epsilon \times L)$, kus C on kontsentratsioon (mg/ml), A on optiline tihedus lainepikkusel 280 nm, ϵ on ekstinktsioonikoeffitsient ($\epsilon = 2.023 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ja L on lahuse kihi paksus. Ekstinktsioonikoeffitsendi väärtus arvutati ExPASy serveris (www.expasy.org).

2.2.7. Maltaasi aktiivsuse määramine

Mõõtes glükoosi vabanemist. Maltaasi substraatide hüdrolyüsimisel vabaneb enamikel juhtudel üks glükoosi molekul lõhustatud substraadi kohta, kuid näiteks maltoosi ja isomaltoosi puhul kaks.

Reaktsioon viidi läbi temperatuuril 37°C ja selle algkiirust mõõdeti glükoosi eraldumise järgi. Selleks kasutati Glucose Liquicolor'i reaktiivi (Human GmbH, Saksamaa). Reaktsioonisegu (1 ml) sisaldas puhastatud valgu sobivat lahjendust, 100 mM K-fosfaatpuhver (pH 6.5) ning substraadi kontsentratsioon vahemikus 5-1200 mM. Reaktsioon algatati valgu lisamisega

reaktsioonisegule. Vähemalt neljal erineval ajapunktil võeti reaktsioonisegust välja 50 μ l proovi, mis lisati 150 μ l Tris-HCl puhvrile (200 mM; pH 8.3) ja proove kuumutati reaktsiooni peatamiseks 5 min temperatuuril 96°C. Proovid jahutati jääl, neile lisati 800 μ l Glucose Liquicolor'i reaktiivi ja inkubeeriti 5 min 37°C, et tuvastada substraadi lõhustamisel eraldunud glükoosi. Glükoosi hulga määramiseks mõõdeti moodustunud roosaka produkti hulk spektrofotomeetris lainepikkusel 500 nm ning vastav glükoosi kogus leiti kaliibergraafikult. Eriaktiivsus väljendati substraadi lõhustamisel vabanenud glükoosi hulvana mikromoolides minutis mg valgu kohta (μ mol/mg*min ehk U/mg). K_m (Michaelis'e konstant) ja V_{max} (maksimaalne reaktsioonikiirus) 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. Valgu molekulmass arvutati ExPASy serveris (www.expasy.org). Katalüütiline efektiivsus ($1/M*min$) arvutati k_{cat} ja K_m jagatisena.

Mõõtes *p*-nitrofenooli vabanemist. Maltaasi kunstliku substraadi PNPG hüdrolyüsi mõõdeti nagu *p*-nitrofenooli vabanemise järgi (Zimmermann jt., 1977; Liiv jt., 2001). Reaktsioonisegu sisaldas 100 mM K-fosfaatpuhvril (pH 6.5), 0.1-20 mM PNPG'd ning sobivas kontsentratsioonis MAL1 valku. Reaktsioon algatati PNPG lisamisega ning peatati õlgkollase värvuse tekkimisel 1 M naatriumkarbonaadi lisamisega. Aeg fikseeriti ning moodustunud kollase produkti (*p*-nitrofenooli) hulk mõõdeti spektrofotomeetrial lainepikkusel 400 nm. Ensüümi eriaktiivsus väljendati ühikutes nmooli/mg*min ehk mU/mg. Kõik aktiivsused arvutati vähemalt kolme iseseisva katse põhjal.

2.2.8. Transglükosüülimise uurimine, TLC ja HPLC

Transglükosüülimise uurimiseks inkubeeriti reaktsioonisegu (sisaldas substraati, 0.001% Na-asiidi ja MAL1 valku lõppkontsentratsiooniga 9 μ g/ml 100 mM K-fosfaatpuhvril) 3-24 h temperatuuril 37°C. Seejärel kuumutati proovi ensüümi inaktiveerimiseks 5 min 96°C ning jahutati jääl. Reaktsiooniproduktide tuvastamiseks lahutati reaktsioonisegu õhukese kihi kromatograafiaga (*thin layer chromatography*; TLC) silikageelplaatidel (TLC ALUGRAM® Xtra SILGUR/UV254, Macherey-Nagel, Saksamaa). Plaadi kontsentreeriva osa stardijoonele kanti 1 μ l proovi ning seejärel plaat kuivatati. Markeritena kasutati 10 mM või 50 mM suhkrute lahuseid. TLC plaati voolutati segus kloroform:äädikhape:vesi (60:70:10) (Stingele jt., 1999) kaks korda plaadi ülemise servani, voolutuste vahel plaat kuivatati. Suhkrute tuvastamiseks värviti plaate aniliini reaktiiviga (1.2 g difenüülamiini (Serva), 1.2 g aniliinhüdrokloriidi (Reachim), 100 ml metanooli (Sigma-Aldrich), 10 ml orto-fosforhapet (Naxo)). Selle reaktiiviga värvub fruktoosijääke sisaldav produkt oranžiks, sahharoosi sisaldav pruuniks ning

glükoosi sisaldav siniseks (Jork jt., 1990). Fruktoosi sisaldavate suhkrute ilmutamiseks kasutati lahust, mis sisaldas 3% ureat ja 1 M fosforhapet veega küllastatud butanoolis ning plaati kuumutati ~10 min 120°C kuni suhkrulaikude värvumiseni (St. John jt., 1996). Redutseerivate suhkrute ilmutamiseks kasutati lahust, mis oli 1:1 segu 6 M NaOH lahusest vees ning 0.5% tetrasooliumsinise lahusest metanoolis. Plaati kuumutati temperatuuril 90°C suhkrulaikude värvumiseni (Jork jt., 1990).

Transglükosüülimisreaktsiooni puhul mõõdeti ka vaba fruktoosi ja glükoosi sisaldust proovides kasutades kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (*high performance liquid chromatography*; HPLC). Kasutati Acquity UPLC süsteemi (Waters, USA) koos Acquity ELS (Evaporative Light-Scattering) detektoriga. Metoodikat on põhjalikumalt kirjeldanud Mardo jt., 2014b. Vedelikkromatograafia ja esialgse andmeanalüüsi viis läbi meie töögrupi koostööpartner Heiki Vija (KBFI, Tallinn).

2.2.9. Arvutipõhised meetodid

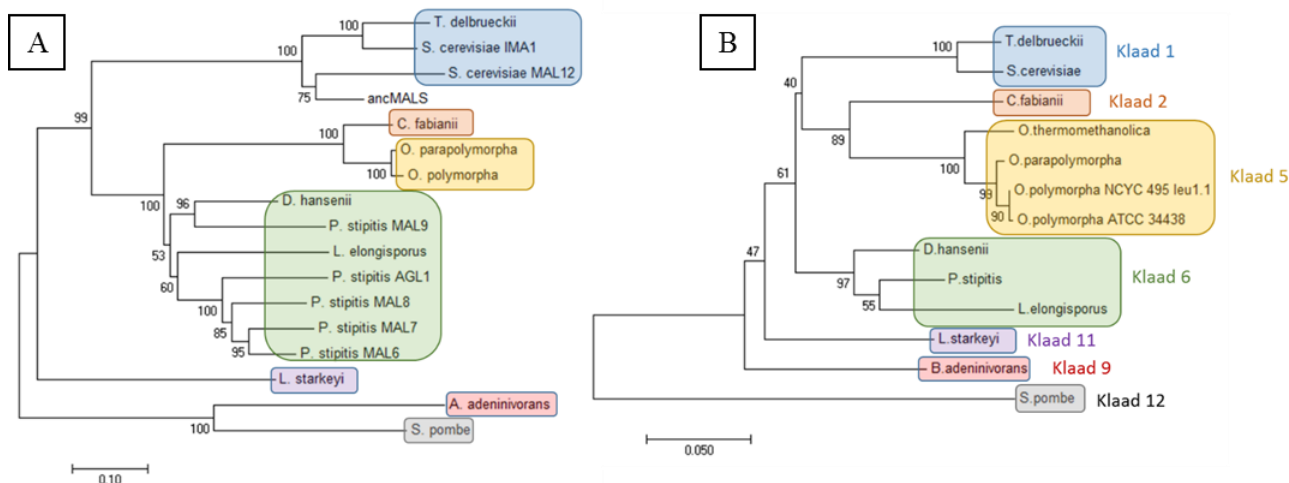
Maltaasi geeni muteerimiseks kasutatavate praimerite koostamiseks ja plasmiidide visualiseerimiseks kasutati programmi pDRAW32 ver. 1.1.107 (<http://www.acaclone.com/>). Nukleotiidsed järjestused on võetud Geenipangast (GenBank), valgujärjestused andmebaasist UniProtKB/Swiss-Prot. Nukleotiidsete ja valgujärjestuste tunnusnumbrid on välja toodud lisas 2. Nukleotiidsete ja aminohappeliste järjestuste joondused tehti programmi MEGA7 (Kumar jt., 2015) tööriistaga ClustalW (Larkin jt., 2007). Fülogeneesipuude koostamiseks kasutati programmi MEGA7 ning *Neighbour Joining* meetodit (Saitou ja Nei, 1987). Valkude puhul kasutati Dayhoff mudelit (Dayhoff jt., 1978) ja nukleotiidsed järjestused puhul Maximum Composite Likelihood mudelit (Tamura jt., 2004). *Bootstrap* analüüsi korduste arv oli 1000. Kõikide parameetrite puhul, mida pole mainitud, kasutati standardseid parameetreid. Valgujärjestuste identsuse väärtuste arvutamiseks kasutati samuti tööriistaga ClustalW tehtud joondust ning programmi BioEdit (Hall, 1999).

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Maltaasi valkude võrdlemine ja muteerimiseks sobivate positsioonide otsimine

Ogataea polymorpha on evolutsiooniliselt vanem pärm kui *Sc. Op* fülogeneesi uurimiseks joondati 13 pärmi ribosoomi suure subühiku rRNA (26S rRNA) geeni domeenide 1 ja 2 geenijärjestused. Seda geenilõiku kasutatakse sageli pärmide fülogeneesi uurimiseks, sest piirkond on piisavalt varieeruv liikide eristamiseks (Kurtzman jt., 2015). Saadud joonduse

alusel konstrueeritud puu on joonise 5 paneelil B. Pärmide maltaaside võrdlemiseks joondati 16 tänapäevase α -glükosidaasi ja ühe hüpoteetilise ürgmaltaasi ancMALS (Voordeckers jt., 2012) järjestused. Joonduse põhjal koostatud fülogeneesipuu on toodud joonisel 5 paneelil A. Fülogeneesipuu koostamisel kasutatud α -glükosidaaside omavahelised identsusprotsendid on lisas 1 (tabel 6).



Joonis 5. Paneelil A on esitatud pärmide α -glükosidaaside järjestuste alusel koostatud fülogeneesipuu. Fülogeneesipuu paneelil B on koostatud rRNA suure subühiku geeni domeenide 1 ja 2 (D1/D2) põhjal. Taustavärvidega on märgitud erinevatesse klaadidesse kuuluvad pärmiliigid (Kurtzman jt., 2015). Andmed pärmitüvede kohta ja järjestuste tunnusnumbrid on esitatud lisas 3 (tabelid 8 ja 9). Fülogeneesipuude sõlmedes on näidatud *bootstrap* väärtus protsendina (1000 korduse põhjal). Skaala näitab asenduste arvu ühe positsiooni kohta. Fülogeneesipuude koostamise meetodika on kirjeldatud peatükis 2.2.10.

Pärmide ja nende valkude paiknemine ja klasterdumine on kahel fülogeneesipuul sarnane. Seega võib oletada, et nende pärmide eellane omas α -glükosidaasi kodeerivat geeni ning seejärel evolutsioneerus geen edasi koos pärmiga. *Op* maltaas MAL1 on sarnaselt hüpoteetilisele ürgmaltaasile ancMALS laia substraadivalikuga. Seetõttu peaks saama *Op* maltaasi muteerida nii, et ensüümi substraadivalik muutuks sarnasemaks kas maltaaside või isomaltaaside substraadivaliku muustrile. See teeb *Op* maltaasi huvitavaks uurimisobjektiks α -glükosidaaside substraadispetsiifikat mõjutavate aminohappejääkide uurimiseks (Viigand jt., 2016).

Voordeckers jt. (2012) modelleerisid kristalliseeritud *Sc* IMA1 põhjal α -glükosidaasidel substraadi seondumispirkonna ja tõid välja 9 positsiooni, milles asuvad aminohappejäägid võiksid mõjutada substraadivalikut. Edaspidi nimetatakse käesolevas töös nendes üheksas positsioonis asuvat aminohappejääkide loetelu substraadivaliku logoks. Muteerimiseks sobivate positsioonide leidmiseks joondasime 22 erinevat α -glükosidaasi valku ning

koostasime igale valgule substraadivaliku logo (tabel 3). Seejärel hindasime, millistes logopositsioonides on selge erinevus maltaasidel ja isomaltaasidel.

Tabel 3. α -glükosidaaside substraadivaliku logod*. Päises on ära toodud ensüümi substraadispetsiifikat mõjutavate aminohapete positsioonid *Op* MAL1 valgus ning sulgudes on näidatud vastavad numbrid *Sc* IMA1'l.

| | 142 (158) | 200 (216) | 201 (217) | 202 (218) | 203 (219) | 258 (278) | 259 (279) | 287 (307) | 399 (411) |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>Op</i> maltaas | F | T | A | G | L | V | G | D | N |
| <i>Ls</i> α-glükosidaas | Y | T | V | N | K | L | S | H | E |
| ancMALS | F | T | A | G | L | V | G | D | E |
| ancMAL-IMA | F | T | A | G | L | V | A | D | E |
| ancIMA5 | F | T | A | G | L | V | G | D | E |
| <i>Sc</i> MAL12 | F | T | A | G | L | V | A | E | D |
| <i>Sc</i> MAL32 | F | T | A | G | L | V | A | E | D |
| <i>Gs</i> ekso-α-1,4-glükosidaas | I | A | I | S | H | A | N | G | A |
| ancMAL | F | T | A | G | L | V | A | D | D |
| <i>Sc</i> IMA1 | Y | V | G | S | L | M | Q | D | E |
| <i>Sc</i> IMA2 | Y | V | G | S | L | M | Q | D | E |
| <i>Sc</i> IMA3/4 | Y | V | G | S | L | M | R | D | E |
| <i>Sc</i> IMA5 | F | V | G | S | M | V | G | S | E |
| <i>Gt</i> oligo-1,6-glükosidaas | V | V | I | N | M | T | P | D | E |
| <i>Bc</i> oligo-1,6-glükosidaas | A | V | I | N | F | M | P | D | E |
| ancIMA1-4 | Y | V | G | S | L | M | Q | D | E |
| <i>Ps</i> MAL6 | Y | T | A | G | L | V | G | N | N |
| <i>Ps</i> MAL7 | F | T | A | G | L | V | G | T | N |
| <i>Ps</i> MAL8 | Y | T | A | G | L | V | G | E | N |
| <i>Ps</i> MAL9 | Y | T | A | G | M | V | G | E | N |
| <i>Ps</i> AGL1 | Y | T | A | G | L | V | G | W | N |
| <i>Aa</i> α-glükosidaas | Y | V | I | N | L | M | P | Q | E |

*Pärmide ja α -glükosidaaside täispikad nimed ja valkude tunnusnumbrid on välja toodud lisas 3. Peenemas kirjas on hüpoteetiliste eellasvalkude nimed. Rohelise taustaga on märgitud nende α -glükosidaaside substraadivaliku logod, millel on nii maltaasne kui ka isomaltaasne aktiivsus. Kollase taustaga on märgitud maltaasse aktiivsusega ensüümide ja sinisega isomaltaasse aktiivsusega ensüümide substraadivaliku logod. Hallil taustal on *P. stipitis*'e ja *A. adenivorans*'i genoomis kodeeritavate α -glükosidaaside logod. Neid ensüüme ei ole eksperimentaalselt uuritud.

Meie töögrupis on juba varem uuritud MAL1 mutanti, millel on positsioonis 200 (V216 IMA1 puhul) treoniini (T200) jääk asendatud valiiniga (V). Mutant T200V muutus substraadivalikult sarnasemaks isomaltaasidele (Viigand jt., 2016). Selles positsioonis asuva aminohappejäagi olulisust substraadispetsiifika määramisel *Sc* isomaltaasil on enne näidanud ka Yamamoto jt., 2004.

Käesolevas töös valiti muteerimiseks välja *Op* maltaasi positsioon 259, mis vastab *Sc* IMA1 positsioonile 279 (tabel 3). Sellele vastavas positsioonis asuva aminohappejäagi otsustavat rolli

substraadispetsiifika määramisel on näidatud mitmes töös (Tsujimoto jt., 2007; Voordeckers jt., 2012). Käesoleva töö eesmärgiks oli vahetada *Op* MAL1 positsioonis 259 asuv aminohappejääk glütsiin (G) kasalaniini (A) või arginiini (R) vastu ning uurida mutantide substraadivaliku muutust võrreldes metsiktüüpi MAL1'ga. Positsioonis 259 asuva glütsiini vahetusalaniiniks teeb ensüümi valgujärjestuse sarnasemaks *Sc* maltaasidele ning ka hüpoteetilistele ürgmaltaasidele ancMALS (A279), ancMAL-IMA, ancMAL (Voordeckers jt., 2012). Glütsiini asendamine arginiiniga positsioonis 259 teeks MAL1 ensüümi sarnasemaks *Sc* isomaltaasidele IMA3 ja IMA4 (tabel 3). Hüpoteesiks oli, et nende mutantide substraadivalik võiks muutuda sarnasemaks vastavalt kas maltaasidele või isomaltaasidele.

2.3.2. MAL1 mutantide Gly259Ala ja Gly259Arg konstrueerimine ja kirjeldamine

Mutantsete valkude sünteesi võimaldavad geenikonstruktid tehti suunatud mutageneesil megapraimeri meetodil ja kioneeriti pURI3 plasmidi (Rivas jt., 2007). Seejärel viidi mutantseid MAL1 geene sisaldavad konstruktid *E. coli* BL21 (DE3) tüve kompetentsetesse rakkudesse ning maltaasi ekspressioon indutseeriti IPTG'ga (pt 2.2.4). Mutantsete valkude puhul ei märgatud madalamat ekspressioonitaset võrreldes metsiktüüpi maltaasiga. Maltaase ekspresseerivatest *E. coli* rakkudest tehti lüsaat ning mutantid valgud puhastati rakuekstraktist Ni²⁺-afiinsuskromatograafiaga (pt 2.2.5 ja 2.2.6), tulemuseks oli mutantse MAL1 valgu preparaati. Mutantsete MAL1 valkude substraatide kasutamise efektiivsust mõõdeti glükoosi vabanemise kiiruse järgi, kasutades selleks Glucose Liquicolor reaktiivi (pt 2.2.7). Substraatidena kasutati järgmisi suhkruid: maltoos, sahharoos, turanoos, maltotrioo, maltuloos, meleltsitoos, α -MG, isomaltoos ja palatinoos. Reaktsioon viidi läbi substraadi kahel erineval kontsentratsioonil – 50 mM ja 100 mM. Valkude kineetilisi parameetreid (K_m , V_{max} , k_{cat} , katalüütiline efektiivsus k_{cat}/K_m) ei olnud võimalik mõõta, kuna ensüümide aktiivsused enamiku substraatidega olid selleks liiga madalad. Mõlema mutandi katalüütiline aktiivsus langes võrreldes metsiktüüpi MAL1'ga (tabel 4) tohutult. Kõige kõrgem aktiivsus oli mõlemal mutandil maltotriooisiga, mis on ka metsiktüüpi MAL1 parimaks substraadiks (Viigand jt., 2016) – mutantidel säilis ~7% aktiivsusest võrreldes metsiktüüpi ensüümiga. Kuna mutantid olid väga väikese katalüütilise aktiivsusega, ei saa tuvastada nende substraadispetsiifika mustrit muutusi. Andmete põhjal saab järeldada, et MAL1 Gly259 asendaminealaniiniga või arginiiniga toob kaasa ensüümi väga suure katalüütilise efektiivsuse languse.

Tabel 4. MAL1 ja selle mutantide eriaktiivsused ($\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$) 100 mM substraatide kontsentratsioonil.

| | <i>Op</i> MAL1 | Gly259Arg | Gly259Ala |
|--------------|----------------|-----------|-----------|
| Maltoos | 107.38 | 1.86 | 2.18 |
| Sahharoos | 131.33 | 6.44 | 3.62 |
| Turanoos | 133.38 | 0.00 | 2.85 |
| Maltotriioos | 171.28 | 12.26 | 12.84 |
| Maltuloos | 26.76 | 0.00 | 0.15 |
| Meletsitoos | 27.34 | 1.65 | 0.39 |
| α -MG | 19.29 | 0.28 | 0.20 |
| Isomaltoos | 13.63 | 0.06 | 0.15 |
| Palatinoos | 21.10 | 0.36 | 0.32 |

Gly259Arg (G259R) mutandi puhul võib katalüütilise efektiivsuse langusele leida toetust kirjandusest. Antud mutatsioon oleks võinud MAL1 teha valgujärjestuselt sarnaseks *Sc* isomaltaasidele IMA3 ja IMA4. Isomaltaasidel IMA3/4 on aga võrreldes teiste *Sc* isomaltaasidega (IMA1, IMA2, IMA5) palju madalam katalüütiline aktiivsus (Teste jt., 2010). Samuti on konstrueeritud IMA3 mutant, kus positsioonis 279 asuv arginiin oli asendatud glutamiiniga. IMA3 Arg279Gln mutandil oli kõrgem katalüütiline aktiivsus kui metsiktüüpi IMA3'1 (Deng jt., 2014). Selle põhjal võib oletada, et ka MAL1 valgus ei sobi positsiooni 259 arginiin – asenduse tulemuseks on tugev katalüütilise aktiivsuse langus.

Gly259Ala (G259A) mutandi madala katalüütilise aktiivsuse võimalikele põhjustele kirjanduses vihjeid ei leitud, Voordeckers jt. (2012) avaldatud töös on hüpoteetilise ürgmaltaasi ancMALS põhjal saadud hoopis vastupidised tulemused. Kui rekonstrueeriti hüpoteetilist ürgmaltaasi, leiti, et peaaegu võrdse tõenäosusega võiks ürgmaltaasil ancMALS asuda positsioonis 279 kasalaniin (A) või glütsiin (G). Seega sünteesiti mõlemad ürgmaltaasi variandid – ancMALS (A279) ja ancMALS (G279). Kui mõlemal valgul mõõdeti katalüütilist efektiivsust erinevatel substraatidel, siis leiti, et variandil A279 on peaaegu kõikidel substraatidel katalüütiline efektiivsus suurem kui G279 variandil (Voordeckers jt. 2012). *Op* maltaasile mõjus asendus Gly259Ala vastupidi – aktiivsust tugevasti pärssivalt. Seega, kuigi hüpoteetiline ancMALS ning *Op* MAL1 on substraadispetsiifika ning substraadivaliku logo poolest väga sarnased, mõjub selline aminohappe asendus neile väga erinevalt. See võib tuleneda erinevustest ülejäänud valgujärjestuses, väljaspool tabelis 3 toodud aminohappeid. Võrreldes uuritavat maltaasi MAL1 teiste α -glükosidaaside valgujärjestustega ning selle põhjal mutandi substraadispetsiifika muutuse ennustamine võib õnnestuda, nagu juhtus Thr200Val

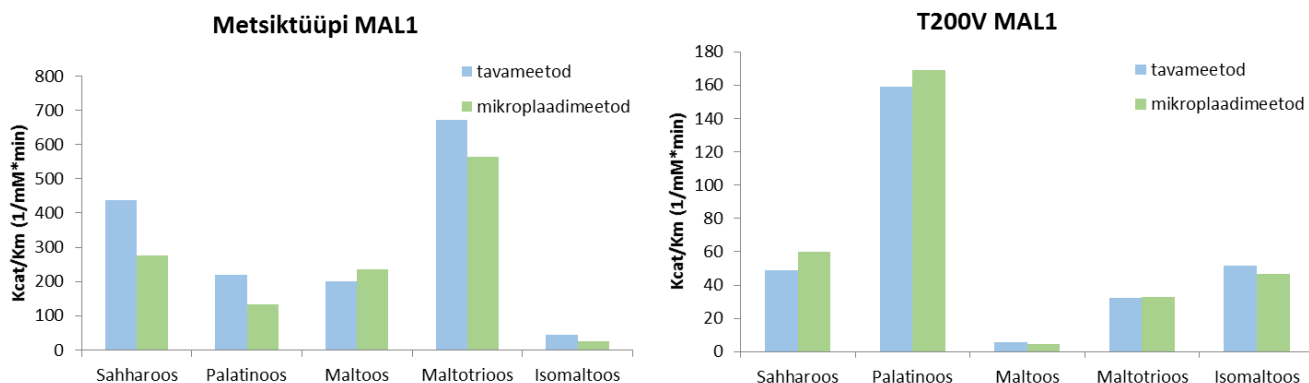
MAL1 mutandi puhul (Viigand jt., 2016), aga ei pruugi õnnestuda, nagu tuleb ilmsiks käesolevas töös. Mainime, et ka hüpoteetiliste elustatud ürgmaltaaside katalüütilised aktiivsused oli tohutult palju väiksemad, kui reaalsete α -glükosidaaside omad (Voordeckers jt., 2012; Viigand jt., 2016).

α -glükosidaaside substraadivalikut mõjutavate aminohapete edaspidist uurimist võiks jätkata, kasutades peatükis 2.3.1 toodud andmeid. Näiteks võiks konstrueerida ja uurida *Op* MAL1 mutante G259Q ja N399E.

2.3.3. Mikroplaadipõhise meetodika väljatöötamine

Paljud suhkrud, mida kasutati käesolevas töös substraatidena, on väga kallid. Näiteks 1 g isomaltoosi maksab 969 eurot, 10 mg nigeroose 143 eurot ja 1 mg kojibioosi peaaegu 200 eurot (<http://www.sigmaaldrich.com>). Seega on substraatide võimalikult säästlik kasutamine α -glükosidaaside substraadispetsiifika määramisel äärmiselt oluline. Meie uurimisgrupis on kasutatud maltaasi katalüütiliste parameetrite määramiseks reaktsiooni läbiviimist Eppendorfi tuubis (segu maht 1 ml) ning pärast on värvilise produkti hulka mõõdetud spektrofotomeetri küvetis (pt 2.2.7). Käesolevas töös kohandati aga meetodikat nii, et reaktsioonisegu mahtu sai vähendada 150 μ l'ni. Seega kulub uue meetodi puhul 85% vähem substraati.

Reaktsioonisegu komponente lisati samas vahekorras nagu ka 1 ml reaktsioonimahu korral, kuid reaktsioon viidi läbi 6.7 korda väiksema mahuga segus. Reaktsioonisegu mahus 150 μ l sisaldas puhastatud valgu sobivat lahjendust, 100 mM K-fosfaatpuhvrit (pH 6.5) ning substraati (kontsentratsioon vahemikus 5-1200 mM). Ajapunktil võeti reaktsioonisegust välja 20 μ l proovi, mis lisati 60 μ l Tris-HCl puhvrile ja proove kuumutati reaktsiooni peatamiseks 5 min temperatuuril 96°C ning jahutati jääl. Reaktsioonimahu vähendamise tegi võimalikuks see, et pärast Glucose Liquicolor reagenti lisamist mõõdeti roosaka värvuse teket mitte küvetis, vaid mikrotiiterplaadil (Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol; CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Saksamaa). Mikrotiiterplaadi kannukesse (200 μ l), kus igas kaevus oli 160 μ l Glucose Liquicolor'i reaktiivi, pipeteeriti 40 μ l läbikuumutatud ja jääl jahutatud reaktsioonisegu. Plaati inkubeeriti 10 min temperatuuril 37°C ning seejärel mõõdeti iga proovi neeldumist lainepikkusel 500 nm. Selleks kasutati mikroplaadi lugejat Tecan infinite M200 PROTm (Tecan Group Ltd., Šveits). Vabaneva glükoosi koguse arvutamiseks kasutati samal meetodil koostatud kaliibergraafikut.



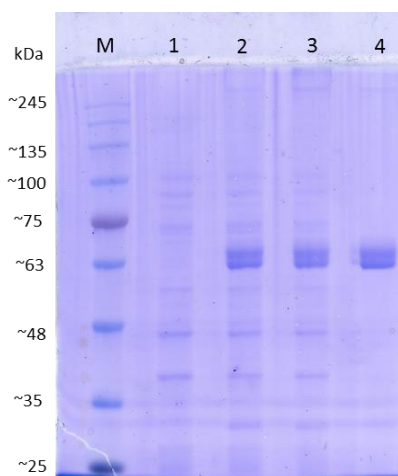
Joonis 6. MAL1 ja tema mutandi T200V katalüütiline efektiivsus, määratud puhastatud valguga tavameetodil (kirjeldatud peatükis 2.2.8) ja mikroplaadipõhisel meetodil. Joonisel esitatud tulemused on arvutatud 2 iseseisva korduskatse põhjal. Katalüütilise efektiivsuse leidmiseks kasutatud andmed koos standardhälvetega on esitatud lisas 2 (tabel 7).

Meetodi valideerimiseks valiti välja viis substraati: maltoos, maltotriioos ja sahharoos kui maltoosi-tüüpi suhkrud ning palatinoos ja isomaltoos kui isomatoosi-tüüpi suhkrud. Seega saab nende kasutamise alusel hinnata ensüümi substraadivaliku mustrit. Mõõdeti metsiktüüpi MAL1 ja mutandi T200V eriaktiivsused iga substraadiga vähemalt neljal erineval kontsentratsioonil ja arvutati nende andmete põhjal kineetilised parameetrid, nagu kirjeldatud peatükis 2.2.7. Tulemusi võrreldi varasemate andmetega, mis oli saadud reaktsiooni suures mahus läbi viies (Viigand jt., 2016; pt 2.2.7). Mikroplaadipõhist meetodikat kasutades saadud tulemused langesid hästi kokku tavameetodil mõõdetud tulemustega (joonis 6).

α -glükosidaaside muteerimisel on näidatud, et mutant võib olla väga madala katalüütilise aktiivsusega (Tsujimoto jt., 2007; käesolev töö) ning see takistab või teeb võimatuks mutandi substraadivaliku muutuse täpse hindamise. Sellist mutantset valku poleks mõtet puhastada, kui eesmärgiks on substraadivaliku muutuste hindamine. Seetõttu otsustasime uurida, kas α -glükosidaaside substaadispetsiifikat saab hinnata mikroplaadil, kasutades valgupreparaadina rekombinantse bakteri (*E. coli*) lüsaati. Seda meetodit on näiteks varem kasutatud batsillide α -glükosidaaside ja nende mutantide maltoosi ja isomaltoosi kasutamise hindamiseks (Tsujimoto jt., 2007).

Maltaaside substraadivaliku hindamiseks rakulüsaadist alustati *E. coli* BL21 rakkude transformeerimisest plasmiididega, mis sisaldasid *Op* metsiktüüpi *MAL1* geeni või *Op* T200V MAL1 mutantset valku kodeerivat geeni. Vastavad vektorid on pURI3-MAL1Cter ning pURI3-MAL1T200VCter. Negatiivse kontrollina kasutati *E. coli* BL21 rakke, mis olid transformeeritud tühja pURI3 vektoriga. Maltaasi valgu tootmine indutseeriti IPTG'ga, seega ei kasutatud ekspressioonil *MAL1* enda promootorit (pt 2.2.4). *E. coli* BL21 genoomis on LacUV5 promootor, mis IPTG lisamisel aktiveerib bakteris T7 polümeraasi sünteesi.

Kloneeritud geenile eelneb pURI3 vektoris T7 polümeraasi seondumisjärjestus (Rivas jt., 2007). Vektoriga transformeeritud rakud kasvatati (pt 2.2.4) ning valmistati rakulüsaadid (pt 2.2.5). Valkude kontsentratsioon lüsaadis mõõdeti Lowry meetodil (pt 2.2.5). Maltaasi valgu sisaldus rakulüsaadis kontrolliti SDS-geelil (pt 2.2.6; joonis 7).



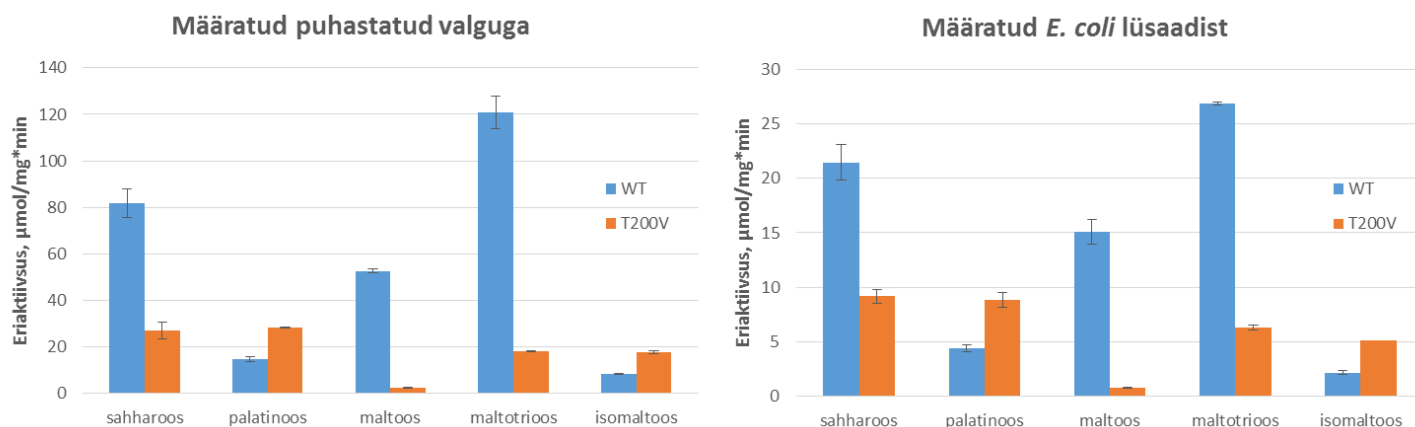
Joonis 7. *E. coli* rakulüsaadi valgud ja puhastatud *Op* MAL1 valk lahutatud SDS-poliakrüülamiidgeelil. M – suurusmarker (Protein Ladder Blue Prestained, Naxo), 1 – tühja pURI3 vektoriga transformeeritud *E. coli* rakulüsaat, 2 – pURI3-MAL1Cter vektoriga transformeeritud *E. coli* rakulüsaat, 3 – pURI3-MAL1T200VCter vektoriga (Viigand jt., 2016) transformeeritud *E. coli* rakulüsaat, 4 – puhastatud MAL1 valk. Geelile kanti 2 µl rakulüsaati või puhastatud valguproovi.

MAL1 valgu kalkuleeritud molekulmass on 63.5 kDa (Liiv jt., 2001). Huvitav on see, et *Op* maltaasi geenil *MAL1* on ka endal promooter, mis on äratuntav *E. coli*'s tänu sigma-70 valgu seostumisjärjestustele (Alamäe jt., 2003). Seetõttu on *MAL1* promootorit kasutatud näiteks bakteriaalse levaansukraasi üle-ekspresseerimiseks *E. coli*'s valgu puhastamise eesmärgil (Visnapuu jt., 2008).

Saadud rakulüsaati kasutati reaktsioonides puhastatud valguproovi asemel ning substraatide hüdrolüüsi mõõdeti mikroplaadi-meetodil. Tühja pURI3 vektoriga transformeeritud *E. coli* rakkude lüsaadil puudus kõikide testitud substraatide hüdrolüüsi võime. Kuigi *E. coli* suudab kasutada näiteks maltoosi süsinikuallikana, siis pärmidele tüüpilist maltaasi tal ei ole. Maltoosi metabolismil osalevad amülomaltaas, maltodekstriini fosforülaas ja maltodekstriini glükosidaas (Boos ja Shuman, 1998). Isegi kui *E. coli*'l oleks ensüümid käesolevas töös kasutatud substraatide hüdrolüüsimiseks, ei indutseeru nende süntees antud tingimustel kasvatades.

Meetodi valideerimiseks määrati metsiktüüpi MAL1 ja MAL1 mutandi T200V eriaktiivsused mikroplaadi-meetodil kasutades ensüümpreparaadina *E. coli* transformantide lüsaate. Ensüümi substraatidena kasutati 50 mM ja 100 mM sahharoosi, palatinoosi, maltoosi, maltotrioosi ja isomaltoosi. Joonisel 8 kõrvutati saadud andmed puhastatud valguga saadud tulemustega. Mõlemal juhul on aktiivsused määratud mikroplaadi-meetodil. Substraadivaliku muster on nii puhastatud valku kui ka *E. coli* lüsaati kasutades väga sarnane. Järelikult on võimalik α -glükosidaaside substraadivaliku hindamiseks vähemalt nende substraatide puhul kasutada puhastatud valgu asemel ka valku üle-ekspresseeriva *E. coli* lüsaati.

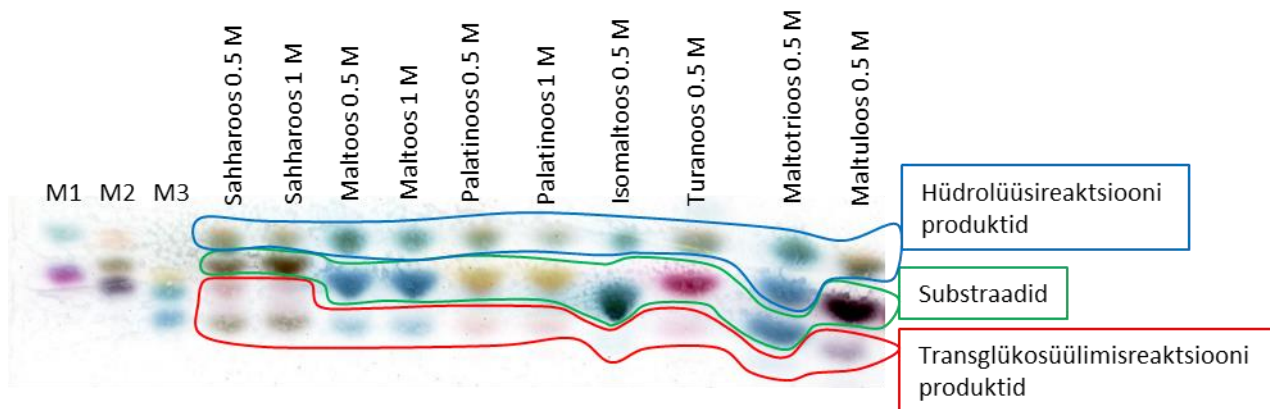
E. coli lüsaadist maltaasse aktiivsuse hindamisel normaliseeriti tulemused lüsaadi koguvalgule. Kuna lüsaadist määratud aktiivsused olid ca 3.4 korda madalamad (standardhälve jäi 15% piiresse), siis võiks maltaasi valk moodustada rekombinantse *E. coli* rakkude koguvalgust ligikaudu 30%.



Joonis 8. Metsiktüüpi MAL1 (WT) ja MAL1 T200V mutandi eriaktiivsus 50 mM substraatidel, mõõdetuna mikroplaadil, kasutades ensüümpreparaadina kas puhastatud valku või valku üle-ekspresseeriva *E. coli* rakulüsaati (pt 2.3.3).

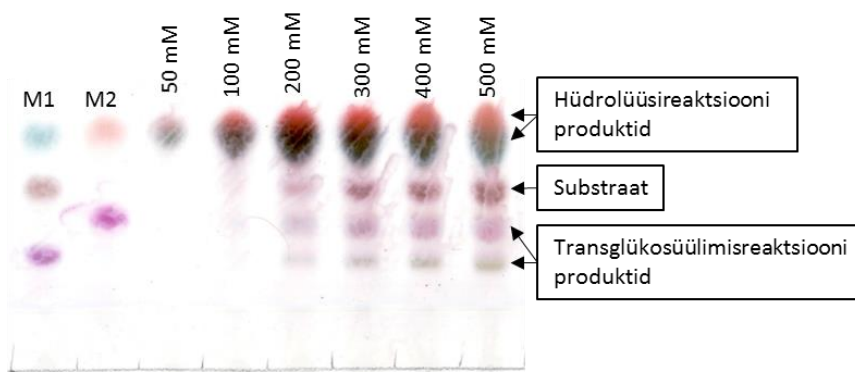
2.3.4. Transglükosüülimine

Paljudel α -glükosidaasidel on lisaks substraadi hüdrolyüsi võimele ka transglükosüülimisvõime (pt 1.1). Seda saab rakendada tööstuslikul oligosahhariidide sünteesil. Ensümaatilisel saab oligosahhariide toota kasutades kas glükosüüli transferaase või glükosiidi hüdrolaase. Viimaste kasutamisel on eeliseks, et suhkrud ei pea eelnevalt olema nukleosiidfosfaadiga või fosfaadiga aktiveeritud (Mangas-Sánchez ja Adlercreutz, 2015). *Op* MAL1 valgu transglükosüülimisvõimet pole varem uuritud. Selleks, et teada saada, kas *Op* maltaas transglükosüülib, inkubeeriti muteerimata ensüümi ja ka T200V mutanti 0.5 M ja 1 M substraadi lahuses 100 mM K-fosfaatpuhvril temperatuuril 37°C 24 tundi. Substraatidena kasutati sahharoosi, maltoosi, palatinoosi, isomaltoosi, turanoosi, maltuloosi ja maltotriioosi. Reaktsiooniprodukte analüüsiti õhukese kihi kromatograafiaga (pt 2.2.8). Kuna TLC plaadil olid selgesti eristatavad triibud, mis ei langenud kokku substraatide ega hüdrolyüsireaktsiooni produktide triipudega ning need olid väiksema liikuvusega, siis järeldame, et nii metsiktüüpi MAL1 kui ka T200V mutant transglükosüülivad. Nägime MAL1 puhul transglükosüülimist kõigi kasutatud substraatidega (joonis 9). T200V mutandil on metsiktüüpi ensüümiga võrreldes langenud maltoosi-tüüpi substraatide hüdrolyüsi aktiivsus (Viigand jt., 2016). TLC tulemusi visuaalselt hinnates võib öelda, et mutandil langes ka maltoosi-tüüpi substraatide polümeriseerimisvõime (tulemusi ei esitata).



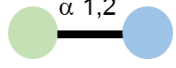

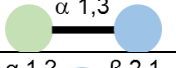


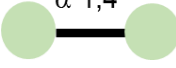


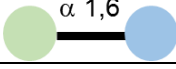

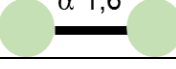

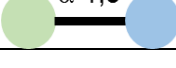

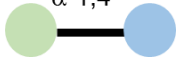




Joonis 9. MAL1 transglükosüülib. 0.5 M või 1 M suhkrutest 24. reaktsioonitunniks moodustunud produktide analüüs õhukese kihi kromatograafiaga (TLC). 1 μ l 4 x (1 M suhkur) või 2 x (0,5 M suhkur) MQ vees lahjendatud reaktsioonisegu kanti TLC plaadi stradijoonele. Esimesele kolmele rajale kanti markersuhkrud (1 μ l 50 mM lahust) M1 (ülalt alla): glükoos, maltoos, turanoos; M2 (ülalt alla): fruktoos, sahharoos, maltuloos; M3 (ülalt alla): palatinoos, isomaltoos, maltotriioos. Plaat värviti aniliini-reaktiiviga. Voolutamise ja ilmutamise tingimused on esitatud pt 2.2.8.

Järgmisena uurisime, kuidas substraadi kontsentratsioon mõjutab transglükosüülimist. Selleks inkubeeriti MAL1 ensüümi 100 mM K-fosfaatpuhvrts ning sahharoosi, palatinoosi või maltoosiga nende erinevatel kontsentratsioonidel vahemikus 50-500 mM. Joonisel 10 on esitatud sahharoosist saadud reaktsiooniproduktide TLC analüüs. Polümerisatsiooniproduktid olid TLC'ga tuvastatavad kõigi kolme kasutatud substraadi puhul alates 200 mM substraadi kontsentratsioonist ning 50 mM substraadi puhul toimus vaid hüdrolüüs.



Joonis 10. Metsiktüüpi MAL1 toimel sahharoosist (50-500 mM) 24. reaktsioonitunniks moodustunud produktide analüüs õhukese kihi kromatograafiaga (TLC). 1 μ l reaktsioonisegu kanti TLC plaadi stradijoonele. Esimesele kahele rajale kanti markersuhkrud (1 μ l 50 mM lahust) M1 (ülalt alla): glükoos, sahharoos, meletsitoos; M2 (ülalt alla): fruktoos, turanoos. Plaat värviti aniliini-reaktiiviga (pt 2.2.8).

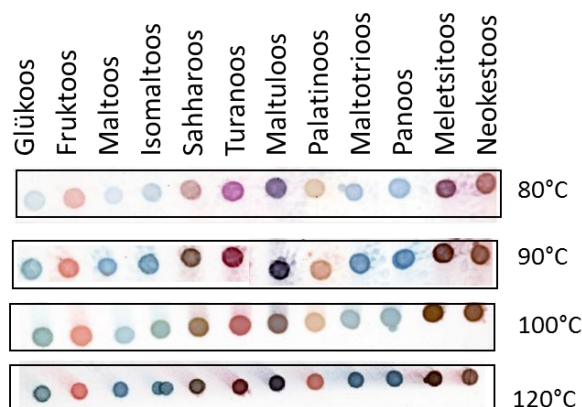
Tabel 5. *O. polymorpha* maltaasi transglükosüülimisreaktsiooni produktide kirjeldamine*

| Substraat | Substraadi joonis | Produktide arv | Produkti värv | Oletatav produkt |
|--------------|--|----------------|--|---|
| Sahharoos |  | 2 |  Roosa | Turanoos  |
| | | |  Roheline |  |
| Maltoos |  | 1 |  Sinine | Panoos  |
| Palatinoos |  | 1 |  Punakas | |
| Isomaltoos |  | 1 |  Sinine | |
| Turanoos |  | 1 |  Roosa | |
| Maltuloos |  | 2 |  Lilla | |
| | | |  Roosakas | |
| Maltotrioois |  | 1 |  Sinine | |

*Transglükosüülimisreaktsioon viidi läbi tabelis esitatud substraatidega. Tabelis on kirjas TLC'ga tuvastatav transglükosüülimisproduktide arv ja nende värvus aniliini-reaktiiviga värvides (pt 2.2.8). Viimases tulbas on mõnede substraatide puhul välja pakutud oletatav polümerisatsiooniprodukt. Suhkrute skeemidel tähistab roheline ring glükoosi molekuli ning sinine ring fruktoosi molekuli.

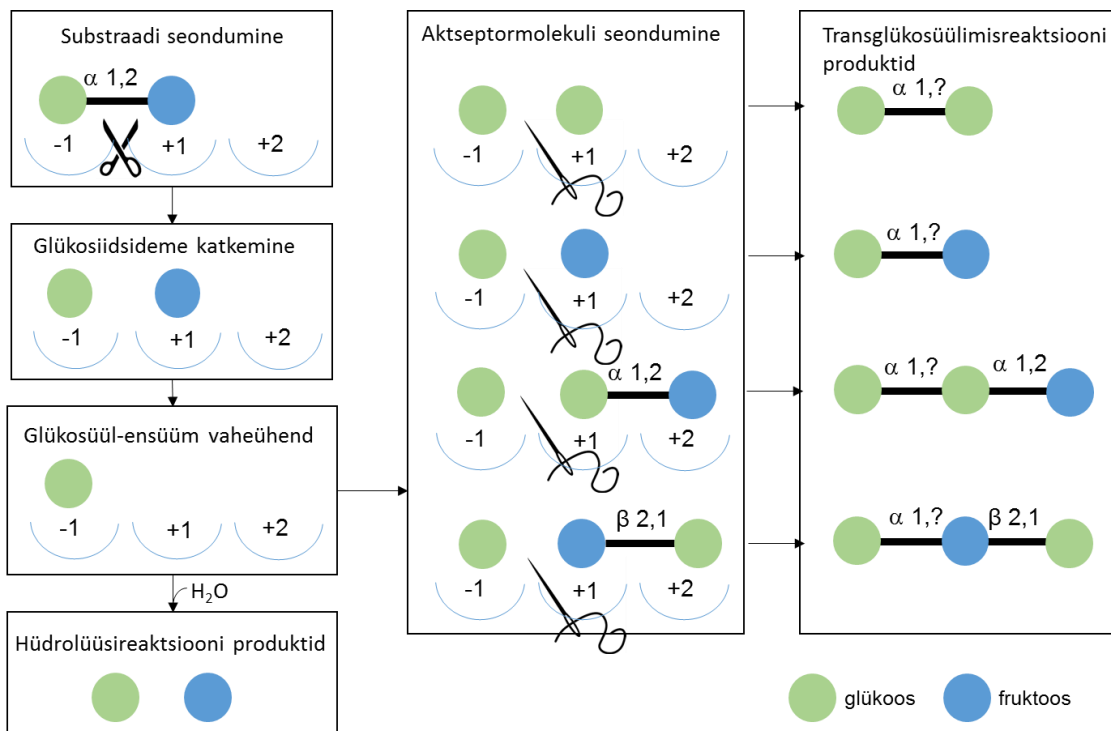
MAL1 hüdrolyüsib mitut erinevat α -glükosiidsidet. Seega on tõenäoliselt samuti võimeline sünteesima erinevaid α -glükosiidsidemeid. Samuti on täheldatud, et α -glükosidaasid võivad sünteesida sidemeid, mida ise ei hüdrolyüsi (Fernández-Arrojo jt., 2007). Seega on keeruline kindlaks teha, milliseid α -glükosiidsidemeid MAL1 sünteesib ning millised ühendid reaktsiooni tulemusena tekivad. *O. polymorpha* maltaasi transglükosüülimisreaktsiooni produkte on kirjeldatud tabelis 5. Polümerisatsiooniprodukte on võimalik tuvastada ühendi jooksukauguse järgi ning värvumise järgi erinevate reaktiividega, võrreldes produkti vastavaid omadusi olemasolevate markerite omadega. Kõige informatiivsem reagent MAL1 polümerisatsiooniproduktide tuvastamisel oli aniliini-reaktiiv (pt 2.2.8). Publitseeritud meetodika soovib selle reagentiga värvitud TLC plaati kuumutada temperatuuril 85-120°C 10-15 min jooksul (Jork jt., 1990). Meie uurisime, milline oleks optimaalne temperatuur aniliini-reaktiiviga värvitud TLC plaadi ilmutamiseks, et suhkruid oleks võimalik paremini eristada. Kõiki meie laboris olemasolevaid substraate kasutades tehti TLC plaadile 100 mM suhkrulahuste täpid mahus 1 μ l, lasti kuivada, kasteti aniliini-reaktiivi ning plaati kuumutati 5

min jooksul temperatuuridel 80°C, 90°C, 100°C või 120°C. Joonisel 11 on näha, et ilmutades plaati madalamatel temperatuuridel olid erinevused substraatide vahel värvumise järgi palju suuremad, kui kõrgemal temperatuuril ilmutades, mil värvid olid tumedamad ning halvemini eristatavad. Näiteks temperatuuril 120°C ilmutades värvub palatinoos pruunikalt, temperatuuril 80°C ilmutades on aga teistest suhkrutest selgelt eristuv helekollane. Turanoos värvub temperatuuril 120°C ilmutades samuti pruunikalt, temperatuuril 80°C ilmutades aga lillakasroosalt. Seega edasisel TLC plaatide ilmutamisel pärast aniliini-reaktiiviga värvimist kuumutati plaate 5 min temperatuuril 80-90°C.



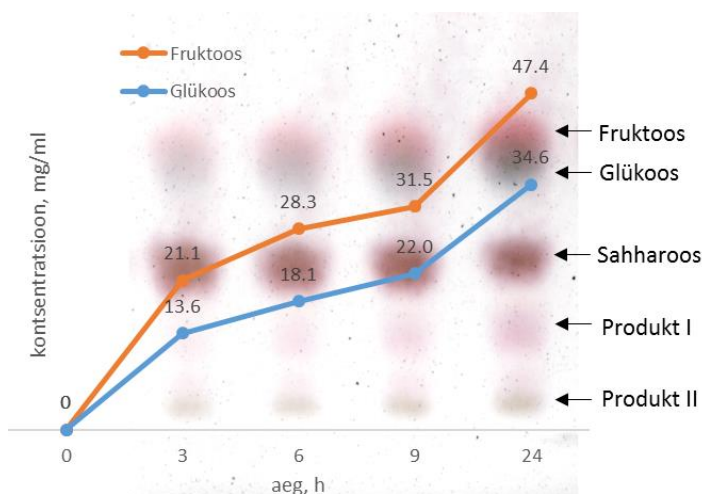
Joonis 11. Erinevatel temperatuuridel (120°C, 100°C, 90°C, 80°C) 5 min aniliini reaktiiviga (pt 2.2.8) ilmutatud plaadid. Plaadile kanti 12 erinevat suhkrut (1 µl 100 mM lahust).

Maltaasiga sahharoosist sünteesitavaid produkte uuriti põhjalikumalt. Skemaatiline MAL1 hüdrolyüsi- ja transglükosüülimisreaktsiooni seletus ning võimalikud sahharoosist moodustuvad produktid on toodud joonisel 12. Aniliini-reaktiiviga TLC plaadil värvides värvub üks transglükosüülimisprodukt roosalt (edaspidi produkt I) ja teine roheliselt (edaspidi produkt II). Produkt I liikus TLC analüüsil kohakuti disahhariididega (maltuloos, turanoos, isomaltoos), produkt II kohakuti trisahhariididega (maltotriooos, meletsitoos) (joonised 9 ja 10). Seega on produkt I tõenäoliselt disahhariid ning produkt II trisahhariid. Sahharoosi polümerisatsioonireaktsiooni produktide analüüsimiseks värviti TLC plaati ka ureat sisaldava reaktiiviga (pt 2.2.8), millega värvuvad ainult fruktoosi sisaldavad suhkrud. Urea-reaktiiviga värvusid mõlemad produktid, järelikult nad sisaldavad mõlemad fruktoosi (joonis 14). Samuti värviti sahharoosi polümerisatsioonireaktsiooni produkte tetrasooliumsinist sisaldava reaktiiviga (pt 2.2.8), millega värvuvad ainult redutseerivad suhkrud. Produkt I värvus tetrasooliumsinisega, järelikult on redutseeriv. Produkt II ei värvunud, järelikult on mitteredutseeriv (tulemusi ei esitata).



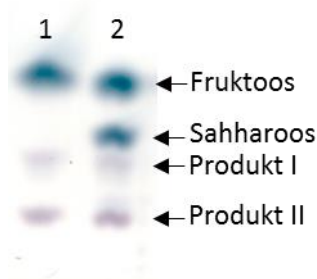
Joonis 12. Skemaatiline MAL1 hüdrolüüsi- ja transglükosüülimisreaktsiooni seletus. Näidatud on MAL1 seandumispiirkonna kolm alampiirkonda: -1, +1 ja +2. -1 alampiirkonda saab seonduda vaid oligosahhariidi mitteredutseeriva otsa glükoosijääk (Yamamoto jt., 2010; Viigand jt., 2016). Glükosiidsideme katkemine ning süntees toimub -1 ja +1 seostumiskoha vahelt. Skeemi tegemisel kasutati alusena joonist 1 artiklist Viigand jt., 2016.

Uuriti ka polümerisatsioonireaktsiooni kulgu ajas 24 tunni jooksul. Selleks viidi läbi maltaasi reaktsioon 500 mM sahharoosiga ja reaktsiooni käigus moodustuva vaba glükoosi ja fruktoosi hulka mõõdeti kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga (HPLC) (pt 2.2.8). Proovid võeti reaktsioonisegust ajahetkedel 3 h, 6 h, 9 h ja 24 h. Tulemused on esitatud joonisel 13. Vaba fruktoosi hulk oli proovides suurem kui vaba glükoosi hulk. Järelikult polümeriseeritakse glükoosi rohkem kui fruktoosi. Reaktsioonisegus on kaks ühendit, mis kindlasti sisaldavad ühte glükoosi ja ühte fruktoosi jääki (sahharoos ja produkt I). Järelikult peab produkt II sisaldama glükoosi rohkem kui fruktoosi. Seega produkt II on trisahhariid, mis koosneb kahest glükoosist ja ühest fruktoosist.



Joonis 13. Vaba fruktoosi ning glükoosi hulk (mg/ml) transglükosüülimisreaktsiooni proovides, kus MAL1 ensüümi substraadiks oli 500 mM sahharoos. Analüüsitud on ajapunktidel 3 h, 6 h, 9 h ja 24 h võetud proove ja suhkrute sisaldus on mõõdetud HPLC'ga. Graafiku taustaks on samade proovide TLC analüüs. Plaat värviti aniliini-reaktiiviga (pt 2.2.8).

Meie analüüs lubab oletada, et produkt I on turanoos (Glc- α 1,3-Fru). Seda näitab produkt I ja turanoosi sarnane liikumiskaugus TLC analüüsil (joonis 10), värvus aniliiniga värvides (joonised 9 ja 11), produkt I redutseerivad omadused ja HPLC analüüs. HPLC analüüsil väljus produkt II kolonnist samal ajal kui tõendainena kasutatud 6-kestoos (andmeid ei esitata). Siiski ei saa produkt II olla üks kestoosidest: 1-kestoos (Glc- α 1,2-Fru- β 1,2-Fru), 6-kestoos (Glc- α 1,2-Fru- β 6,2-Fru) või neokestoos (Fru- β 2,6-Glc- α 1,2-Fru), sest kõik need suhkrud koosnevad kahest fruktoosi molekulist ja ühest glükoosi molekulist. Samuti värvuvad kestoosid aniliini reaktiiviga värvides pruuniks (joonis 11), produkt II aga roheliselt. Samuti ei saa produkt II olla meletsitoos (Glc- α 1,3-Fru- β 2,1-Glc), mis küll koosneb kahest glükoosi molekulist ja ühest fruktoosi molekulist, kuid värvub aniliini reaktiiviga roosalt. Püstitati hüpotees, et produktiks võiks olla erloos ehk maltosüül- β -fruktofuranosiid (Glc- α 1,4-Glc- β 1,2-Fru). Selle hüpoteesi testimiseks töödeldi produkt II sisaldavat reaktsioonisegu invertaasi ehk β -fruktofuranosidaasiga, mis erloosis lagundaks β -2,1 glükosiidsideme fruktoosi ja glükoosi vahelt ning reaktsiooniproduktidena tekiksid maltoos ning fruktoos. Maltaasi polümerisatsioonireaktsiooni proovile lisati 10 U/ml invertaasi McIlvane'i puhvris (200 mM Na₂HPO₄ ja 100 mM sidrunhape MQ vees, pH 6.0), inkubeeriti temperatuuril 37°C, 20 h möödudes reaktsioon peatati, kuumutades proovi 5 min temperatuuril 96°C. Invertaasiga töödeldud segus olevad ühendid lahutati TLC abil. Reaktsioonisegus olev sahharoos oli hüdrolüüsunud, kuid produkt II ei olnud (joonis 14). Järelikult pole polümerisatsiooniprodukt II erloos.



Joonis 14. Produktid I ja II ei lagune invertaasiga. Reaktsioonisegu, milles MAL1 substraadiks oli 500 mM sahharoos, töödeldi invertaasiga (10 U/ml) ning segu komponendid lahutati TLC abil. Plaati värviti urea-fosforhappe reaktiiviga, millega glükoos ei värvu (pt 2.2.8). Rajal 2 on invertaasiga töötlemata proov, rajal 1 aga invertaasiga töödeldud proov.

Kuna produkt II on mitteredutseeriv suhkur ning invertaas seda ei hüdrolüüsinud, oletame, et fruktoosi jääk peab produktis II paiknema kahe glükoosi jäägi vahel. See produkt võib olla näiteks isomeletsitoos (Glc- α 1,6-Fru- β 2,1-Glc). Isomeletsitoosi ja theandroosi (Glc- α 1,6-Glc- β 1,2-Fru) teket sahharoosist on näidatud pagaripärmi maltaasil (Chiba jt., 1979) ja ka *Bacillus* sp. SAM 1606 α -glükosidaasil (Inohara-Ochiai jt., 2000). Viimasel ensüümil on näidatud, et valgu muteerimine võib nende produktide vahekorda muuta. Mutandil Gly273Pro suurenes isomeletsitoosi ja vähenes theandroosi osakaal. Samuti on näidatud, et suhkru rohekas värvus aniliini reaktiiviga värvides võib viidata sellele, et suhkrus on α -1,6-glükosiidside, nagu on isomeletsitoosis (Schwimmer ja Bevenue, 1955; Lund ja Wyatt, 1973). Isomeletsitoos on

prebiootiliste omadustega suhkur, kuna see on substraadiks bifidobakteritele jämesooles. Isomeletsitoos ei soodusta kaariese teket ning on sahharoosiga võrreldes madalama kalorsusega. Seega on olemas huvi isomeletsitoosi kasutamiseks toidulisandina ning otsitakse efektiivseid viise selle oligosahhariidi tootmiseks (Görl jt., 2011).

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida pärmi *Ogataea polymorpha* maltaasi MAL1 substraadispetsiifikat määravaid aminohappeid suunatud mutageneesi abil ja kohandada olemasolevaid meetodikaid, et saaks edaspidist selle-alast uurimistööd teha odavamalt ja kiiremini. Samuti oli eesmärgiks uurida *Op* maltaasi valgu võimet substraati transglükosüülida ning selle reaktsiooniprodukte.

Võrreldi erinevaid pärmi ja bakterite α -glükosidaase ning nende hüpoteetiliste eellasvalkude järjestusi, et otsustada, millised aminohapped võiksid määrata α -glükosidaaside substraadivalikut. Muteerimiseks valiti välja *Ogataea polymorpha* maltaasi MAL1 aminohape Gly259, konstrueeriti ja ekspresseeriti MAL1 mutandid Gly259Ala ja Gly259Arg. Asendus Gly259Ala muutis MAL1 aminohappelise järjestuse sarnasemaks *Sc* maltaasidele, asendus Gly259Arg aga *Sc* isomaltaasidele 3 ja 4. Püstitati hüpotees, et vastavalt muutub ka mutantide substraadivalik. Mõlemal mutandil oli aga väga tugevalt langenud üldine katalüütiline efektiivsus, mis ei võimaldanud substraadivaliku muutust hinnata. Järelikult antud positsioonis glütsiini asendaminealaniini või arginiiniga ei sobi MAL1 valgule. Selleks, et α -glükosidaaside aktiivsust ja substraadivaliku mustrit saaks edaspidi määrata odavamalt ja kiiremini, muudeti olemasolevat meetodikat – vähendati reaktsioonimahtu ning kasutati glükoosi hulga mõõtmisteks mikrotiiterplaati ja mikroplaadi lugejat. Seetõttu vähenes substraadi kulu 85% võrra. Seda meetodit arendati edasi, et oleks võimalik substraadispetsiifikat enne valkude puhastamist hinnata mikroplaadil α -glükosidaasi üle-ekspresseeriva *E.coli* rakuekstraktist.

Lisaks suhkrute hüdrolyüsisele võivad mõned α -glükosidaasid substraate ka transglükosüülida. Käesoleva töö raames testiti *Op* MAL1 transglükosüülimisvõimet ning selle reaktsiooniprodukte. MAL1 transglükosüülis kõiki seitset testitud substraati, lähemalt otsustati uurida sahharoosist sünteesitudprodukte. Läbiviidud eksperimentide põhjal võib teha järelduse, et sahharoosist tekib MAL1 toimel disahhariid turanoos ning trisahhariid, mille täpset identiteeti ei suudetud kindlaks teha, kuid me teame, et see on trisahhariid, värvub aniliini-reaktiiviga roheliselt, on mitteredutseeriv suhkur, mis kooneb kahest glükoosist ning nende vahel paiknevast fruktoosist. Nende teadmiste ning kirjanduses leiduva info toel võib hüpoteesida, et see produkt on isomeletsitoos. Isomeletsitoosil on prebiotilised omadused, see on mittekariogeenne suhkur ning madalama kalorsusega kui sahharoos. Seega pakub tööstusele huvi uute isomeletsitoosi sünteesimise võimaluste leidmine ning olemasolevate arendamine.

***Ogataea polymorpha* maltase: characterization of the wild-type and mutant proteins and developing a microplate-based activity assay**

Kristina Põšnograjeva

Summary

α -glucosidases are enzymes that catalyse the hydrolysis of α -glucosidic bonds. *S. cerevisiae* (*Sc*) possesses two types of α -glucosidases – maltases and isomaltases, which break down different sugars. Maltase MAL1 of yeast *Ogataea polymorpha* is an α -glucosidase with activities of *Sc* maltases and isomaltases well optimised in a single enzyme. Because of broad substrate selectivity of MAL1, its substrate selection pattern could be changed to be more similar to that of maltases or isomaltases. This makes MAL1 an interesting object for studying amino acids that determine substrate selectivity of α -glucosidases, which was the aim of this work. We compared α -glucosidase sequences from yeasts, bacteria and hypothetical ancestors of α -glucosidases to choose positions to study using mutational assay. We constructed two mutants of MAL1 – Gly259Ala and Gly259Arg – expressed the proteins in *E. coli* and studied their substrate specificity. Mutation Gly259Ala made MAL1 amino acid sequence more similar to that of *Sc* maltases and Gly259Arg more similar to *Sc* isomaltases 3 and 4. We expected to see the change in substrate selectivity pattern of the mutants, but it could not be observed because both mutations caused a tremendous decrease in overall activity of the enzyme. It means that alanine nor arginine are suitable for MAL1 enzyme in position 259. Also, a time- and money-saving method was developed to conduct α -glucosidase activity assays. This was achieved by using microplates instead of a cuvette to measure the amount of glucose released in reaction, which allowed to decrease the reaction volume and use 85% less substrate. Also we confirmed, that substrate selectivity of α -glucosidases can be evaluated using lysate of maltase-overexpressing *E. coli* instead of purified protein, which saves time.

In addition to breaking down sugars, some α -glucosidases can also transglycosylate and thus produce oligosaccharides. We tested transglycosylation ability of *Op* MAL1 and showed that it could transglycosylate all seven of the tested substrates. We then analysed more closely the oligosaccharides produced from sucrose and determined that products of the reaction could include oligosaccharides that have prebiotic and anticarcinogenic properties.

Kasutatud kirjandus

- Alamäe, T., and Liiv, L. (1998). Glucose repression of maltase and methanol-oxidizing enzymes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and study of regulatory mutants. *Folia Microbiol* 43: 443–452.
- Alamäe, T., Pärn, P., Viigand, K., and Karp, H. (2003). Regulation of the *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter in *H. polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 4: 165–173.
- Avigad, G. (1959). Synthesis of glucosylfructoses by the action of a yeast α -glucosidase. *Biochem J* 73: 587–590.
- Boos, W., and Shuman, H. (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 204–229.
- Chiba, S., Murata, M., Matsusaka, K., and Shimomura, T. (1979). A new trisaccharide, 6F- α -d-glucosyl-sucrose, synthesized by transglycosylation reaction of brewer's yeast α -glucosidase. *Agric Biol Chem* 43: 775–779.
- Damager, I., Engelsens, S. B., Blennow, A., Møller, B. L., and Motawia, M. S. (2010). First principles insight into the α -glucan structures of starch: their synthesis, conformation, and hydration. *Chem Rev* 110: 2049–2080.
- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., and Orcutt, B. C. 1978. A model of Evolutionary Change in Proteins, p. 345-352. *In*: Dayhoff, M. O. (ed.) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5., National Biomedical Research Foundation, Washington, DC.
- Deng, X., Petitjean, M., Teste, M.-A., Kooli, W., Tranier, S., François, J. M., and Parrou, J.-L. (2014). Similarities and differences in the biochemical and enzymological properties of the four isomaltases from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Open Bio* 4: 200–212.
- Doner, L. W. (1977). The sugars of honey—a review. *J Sci Food Agric* 28: 443–456.
- Egeter, O., and Brückner, R. (1995). Characterization of a genetic locus essential for maltose – maltotriose utilization in *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* 177: 2408–2415.
- Fernández-Arrojo, L., Marín, D., Gómez De Segura, A., Linde, D., Alcalde, M., Gutiérrez-Alonso, P., Ghazi, I., Plou, F. J., Fernández-Lobato, M., and Ballesteros, A. (2007). Transformation of maltose into prebiotic isomaltooligosaccharides by a novel α -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Process Biochem* 42: 1530–1536.
- Gallone, B. *et al.* (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell* 166: 1397–1410.
- Geber, A., Williamson, P. R., Rex, J. H., Sweeney, E. C., and Bennett, J. E. (1992). Cloning and characterization of a *Candida albicans* maltase gene involved in sucrose utilization. *J Bacteriol* 174: 6992–6996.
- Goffrini, P., Ficarelli, A., and Ferrero, I. (1995). Hexokinase activity is affected in mutants of *Kluyveromyces lactis* resistant to glucose repression. *Microbiology* 141: 441–447.

- Görl, J., Timm, M., Seibel, J. (2011). Mechanism-oriented redesign of an isomaltulose synthase to an isomelezitose synthase by site-directed mutagenesis. *ChemBioChem* 13:149-156.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hers, H. G. (1963). α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease). *Biochem J* 86: 11-16.
- Inohara-Ochiai, M., Okada, M., Nakayama, T., Hemmi, H., Ueda, T., Iwashita, T., Kan, Y., Shibano, Y., Ashikari, T., and Nishino, T. (2000). An active-site mutation causes enhanced reactivity and altered regiospecificity of transglucosylation catalyzed by the *Bacillus* sp. SAM1606 α -glucosidase. *J Biosci Bioeng* 89: 431–437.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., and Wimmer, H. 1990. Physical and chemical detection methods. p. 179-185; 219-223. *In* Ebel, H. F. (ed.) *Thin-layer chromatography: reagents and detection methods*, vol. 1a., VCH, Weinheim.
- Kelly, C. T., Moriarty, M. E., and Fogarty, W. M. (1985). Thermostable extracellular α -amylase and α -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. *Appl Microbiol Biotechnol* 22: 352–358.
- Kelly, R., and Kwon-Chung, K. J. (1992). A zinc finger protein from *Candida albicans* is involved in sucrose utilization. *J Bacteriol* 174: 222–232.
- Kinsella, B. T., Larkin, A., Bolton, M., and Cantwell, A. (1991). Molecular cloning and characterization of a *Candida tsukabaensis* α -glucosidase gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 20: 45–52.
- Krakenaite, R. P., and Glemzha, A. A. (1983). Some properties of two forms of α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*-II. *Biochemistry* 48: 62–68.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874
- Kurtzman, C. P., Mateo, R. Q., Kolecka, A., Theelen, B., Robert, V., and Boekhout, T. (2015). Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. *FEMS Yeast Res* 15, fov050.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., ... Higgins, D. G.. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- Liiv, L., Pärn, P., and Alamäe, T. (2001). Cloning of maltase gene from a methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Gene* 265: 77–85.
- Limtong, S., Srisuk, N., Yongmanitchai, W., Yurimoto, H., and Nakase, T. (2008). *Ogataea chonburiensis* sp. nov. and *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov., thermotolerant, methylotrophic yeast species isolated in Thailand, and transfer of *Pichia siamensis* and *Pichia thermomethanolica* to the genus *Ogataea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 302–307.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42: 490–495.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Lund, B. M., and Wyatt, G. M. (1973). The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. *Microbiology* 78: 331–336.
- Magalhães, F., Vidgren, V., Ruohonen, L., and Gibson, B. (2016). Maltose and maltotriose utilisation by group I strains of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *FEMS Yeast Res* 16: fow053.
- Mangas-Sánchez, J., and Adlercreutz, P. (2015). Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. *J Mol Catal B: Enzym* 122: 51-55.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Elmi, T., and Alamäe, T. (2014b). Mutational analysis of conserved regions harboring catalytic triad residues of the levansucrase protein encoded by the *lsc-3* gene (*lsc3*) of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Biotechnol Appl Biochem* 61: 11–22.
- Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., and Kakudo, M. (1984). Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem* 95: 697–702.
- Morais, P. B., Teixeira, L. C. R. S., Bowles, J. M., Lachance, M.-A., and Rosa, C. A. (2004). *Ogataea falcaomoraisii* sp. nov., a sporogenous methylotrophic yeast from tree exudates. *FEMS Yeast Res* 5: 81–85.
- Morel, G., Lieven, S., Swennen, D., ... Casaregola, S. (2015). Differential gene retention as an evolutionary mechanism to generate biodiversity and adaptation in yeasts. *Sci Rep* 5: 10.1038
- Nakagawa, T., Yamada, K., and Fujimura, S. (2005). Pectin utilization by the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Microbiology* 151: 2047–2052.
- Nakajima, R., Imanaka, T., and Aiba, S. (1986). Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Appl Microbiol Biotechnol* 23: 355–360.
- Naumoff, D. G., and Naumov, G. I. (2010). Discovery of a novel family of α -glucosidase IMA genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Dokl Biochem Biophys* 432: 114–116.
- Needleman, R. (1991). Control of maltase synthesis in yeast. *Mol Microbiol* 5: 2079–2084.
- Needleman, R. B., Federoff, H. J., Eccleshall, T. R., Buchferer, B., and Marmur, J. (1978). Purification and Characterization of an α -glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochemistry* 17: 4657–4661.
- Ngiwsara, L., Iwai, G., Tagami, T., Sato, N., Nakai, H., Okuyama, M., Mori, H., and Kimura, A. (2012). Amino acids in conserved region II are crucial to substrate specificity, reaction velocity, and regioselectivity in the transglucosylation of honeybee GH-13 α -glucosidases. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 1967–1974.
- Nichols, B. L., Avery, S., Sen, P., Swallow, D. M., Hahn, D., and Sterchi, E. (2003). The maltase-glucoamylase gene: common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. *Proc Natl Acad Sci* 100: 1432–1437.

- Nichols, B. L., Eldering, J., Avery, S., Hahn, D., Quaroni, A., and Sterchi, E. (1998). Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning homology to sucrase-isomaltase. *J Biol Chem* 273: 3076–3081.
- Oda, Y., Iwamoto, H., Hiromi, K., and Tonomura, K. (1993). Purification and characterization of α -glucosidase from *Torulaspota pretoriensis* YK-1. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1902–1905.
- Pelletier, M. F., Marcil, A., Sevigny, G., Jakob, C. A., Tessier, D. C., Chevet, E., Menard, R., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (2000). The heterodimeric structure of glucosidase II is required for its activity, solubility, and localization in vivo. *Glycobiology* 10: 815–827.
- Pokusaeva, K., O’Connell-Motherway, M., Zomer, A., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D. (2009). Characterization of two novel alpha-glucosidases from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* 75: 1135–1143.
- Ravin, N. V., Eldarov, M. A., Kadnikov, V. V., ... Skryabin, K. G. (2013). Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* 14: 837.
- Rivas, B. de las, Curiel, J. A., Miguel Mancheño, J., and Muñoz, R. (2007). Expression vectors for enzyme restriction- and ligation-independent cloning for producing recombinant His-fusion proteins. *Biotechnol Prog* 23: 680–686.
- Rolfsmeier, M., and Blum, P. (1995). Purification and characterization of a maltase from the extremely thermophilic crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* 177: 482–485.
- Rose, M. (1995). Molecular and biochemical characterization of the hexokinase from the starch-utilizing yeast *Schwanniomyces occidentalis*. *Curr Genet* 27: 330–338.
- Ruiz-Matute, A. I., Brokl, M., Soria, A. C., Sanz, M. L., and Martínez-Castro, I. (2010). Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chem* 120: 637–642.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, p. A8.40-4. *In* J. Argentine, N. Irwin *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schönert, S., Buder, T., and Dahl, M. (1998). Identification and enzymatic characterization of the maltose-inducible α -glucosidase MalL (Sucrase-Isomaltase-Maltase) of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180: 2574–2578.
- Schwimmer, S., and Bevenue, A. (1955). Reagent for differentiation of 1,4- and 1,6- linked glucosaccharides. *Science* 123: 543–544.
- Sharma, R. C., and Schimke, R. T. (1996). Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* 20: 42–44.
- St. John, J. A., Bonnett, G. D., and 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.

- Stingele, F., Newell, J. W., and Neeser, J.-R. (1999). Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J Bacteriol* 181: 6354–6360.
- Studier, F. W., and 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.
- Sukumaran, S. K., Yee, K. K., Iwata, S., ... Margolskee, R. F. (2016). Taste cell-expressed α -glucosidase enzymes contribute to gustatory responses to disaccharides. *Proc Natl Acad Sci* 113: 6035–6040.
- Takii, Y., Daimon, K., and Suzuki, Y. (1992). Cloning and expression of a thermostable exo-alpha-1,4-glucosidase gene from *Bacillus stearothermophilus* ATCC12016 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 243–247.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11030–11035.
- Teste, M.-A., Francois, J. M., and Parrou, J.-L. (2010). Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the IMA family. *J Biol Chem* 285: 26815–26824.
- Tsujimoto, Y., Tanaka, H., Takemura, R., Yokogawa, T., Shimonaka, A., Matsui, H., Kashiwabara, S., Watanabe, K., and Suzuki, Y. (2007). Molecular determinants of substrate recognition in thermostable alpha-glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 13. *J Biochem* 142: 87–93.
- Vaher, M. (2013). Asp333, Phe381 ja Val385 olulisus *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 katalüüsile. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Viigand, K., and Alamäe, T. (2007). Further study of the *Hansenula polymorpha* MAL locus: characterization of the α -glucoside permease encoded by the HpMAL2 gene. *FEMS Yeast Res* 7: 1134–1144.
- Viigand, K., Tammus, K., and Alamäe, T. (2005). Clustering of MAL genes in *Hansenula polymorpha*: cloning of the maltose permease gene and expression from the divergent intergenic region between the maltose permease and maltase genes. *FEMS Yeast Res* 5: 1019–1028.
- Viigand, K., Visnapuu, T., Mardo, K., Aasamets, A., and Alamäe, T. (2016). Maltase protein of *Ogataea (Hansenula) polymorpha* is a counterpart to the resurrected ancestor protein ancMALS of yeast maltases and isomaltases. *Yeast* 33: 415–432.
- Visnapuu, T., Mäe, A., and 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., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A. D., Vigants, A., and 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.
- Voordeckers, K., Brown, C. A., Vanneste, K., van der Zande, E., Voet, A., Maere, S., and Verstrepen, K. J. (2012). Reconstruction of ancestral metabolic enzymes reveals molecular

mechanisms underlying evolutionary innovation through gene duplication. PLoS Biol 10: e1001446.

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

Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., and Osaki, S. (2010). Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose: Crystal structure of isomaltase. FEBS J 277: 4205–4214.

Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y., and Tabata, S. (2004). Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate specificity of α -glucosidase. Eur J Biochem 271: 3414–3420.

Zimmermann, F. K., Kaufmann, I., Rasenberger, H., and Haußmann, P. (1977). Genetics of carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: genes involved in the derepression process. MGG 151: 95–103.

Kasutatud veebiaadressid

ExPASy Bioinformatics Resource Portal: <http://www.cazy.org/>

Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com>

UniProt: <http://www.uniprot.org>

Pubchem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

pDRAW32 DNA analysis software: <http://www.acaclone.com/>

Lisa 1

Tabel 6. Pärmide α -glükosidaaside aminohappeliste järjestuste identsuste tabel. Identsus on esitatud protsendina. Valgujärjestuste identsuse arvutamiseks kasutati tööriistaga ClustalW tehtud joondust ning programmi BioEdit (Hall, 1999). Värvuse tugevuse aste näitab identsuse määra.

| | <i>T. delbrueckii</i> | <i>S. cerevisiae</i> IMA1 | <i>S. cerevisiae</i> MAL12 | ancMALS | <i>C. fabianii</i> | <i>O. parapolyomorpha</i> | <i>O. polymorpha</i> | <i>D. hansenii</i> | <i>P. stipitis</i> MAL9 | <i>L. elongisporus</i> | <i>P. stipitis</i> AGL1 | <i>P. stipitis</i> MAL8 | <i>P. stipitis</i> MAL7 | <i>P. stipitis</i> MAL6 | <i>L. starkeyi</i> | <i>A. adenivorans</i> | <i>S. pombe</i> |
|----------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|---------|--------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|
| <i>T. delbrueckii</i> | 100 | 81 | 68 | 74 | 40 | 41 | 41 | 49 | 46 | 46 | 47 | 47 | 46 | 47 | 44 | 38 | 37 |
| <i>S. cerevisiae</i> IMA1 | 81 | 100 | 72 | 78 | 43 | 44 | 44 | 51 | 49 | 48 | 49 | 50 | 48 | 50 | 45 | 40 | 38 |
| <i>S. cerevisiae</i> MAL12 | 68 | 72 | 100 | 81 | 44 | 43 | 43 | 49 | 49 | 46 | 49 | 48 | 49 | 49 | 44 | 40 | 38 |
| ancMALS | 74 | 78 | 81 | 100 | 47 | 47 | 47 | 52 | 50 | 51 | 51 | 52 | 53 | 53 | 46 | 41 | 41 |
| <i>C. fabianii</i> | 40 | 43 | 44 | 47 | 100 | 86 | 85 | 61 | 57 | 57 | 59 | 59 | 58 | 58 | 47 | 41 | 40 |
| <i>O. parapolyomorpha</i> | 41 | 44 | 43 | 47 | 86 | 100 | 98 | 59 | 58 | 56 | 59 | 60 | 59 | 60 | 46 | 39 | 40 |
| <i>O. polymorpha</i> | 41 | 44 | 43 | 47 | 85 | 98 | 100 | 59 | 57 | 56 | 59 | 59 | 59 | 59 | 46 | 39 | 40 |
| <i>D. hansenii</i> | 49 | 51 | 49 | 52 | 61 | 59 | 59 | 100 | 73 | 67 | 69 | 71 | 70 | 71 | 54 | 41 | 45 |
| <i>P. stipitis</i> MAL9 | 46 | 49 | 49 | 50 | 57 | 58 | 57 | 73 | 100 | 64 | 66 | 67 | 68 | 68 | 52 | 42 | 43 |
| <i>L. elongisporus</i> | 46 | 48 | 46 | 51 | 57 | 56 | 56 | 67 | 64 | 100 | 65 | 68 | 67 | 69 | 49 | 40 | 42 |
| <i>P. stipitis</i> AGL1 | 47 | 49 | 49 | 51 | 59 | 59 | 59 | 69 | 66 | 65 | 100 | 77 | 76 | 79 | 52 | 40 | 42 |
| <i>P. stipitis</i> MAL8 | 47 | 50 | 48 | 52 | 59 | 60 | 59 | 71 | 67 | 68 | 77 | 100 | 79 | 83 | 51 | 42 | 43 |
| <i>P. stipitis</i> MAL7 | 46 | 48 | 49 | 53 | 58 | 59 | 59 | 70 | 68 | 67 | 76 | 79 | 100 | 85 | 52 | 40 | 42 |
| <i>P. stipitis</i> MAL6 | 47 | 50 | 49 | 53 | 58 | 60 | 59 | 71 | 68 | 69 | 79 | 83 | 85 | 100 | 52 | 42 | 44 |
| <i>L. starkeyi</i> | 44 | 45 | 44 | 46 | 47 | 46 | 46 | 54 | 52 | 49 | 52 | 51 | 52 | 52 | 100 | 44 | 46 |
| <i>A. adenivorans</i> | 38 | 40 | 40 | 41 | 41 | 39 | 39 | 41 | 42 | 40 | 40 | 42 | 40 | 42 | 44 | 100 | 57 |
| <i>S. pombe</i> | 37 | 38 | 38 | 41 | 40 | 40 | 40 | 45 | 43 | 42 | 42 | 43 | 42 | 44 | 46 | 57 | 100 |

Lisa 2

Tabel 7. Katalüütilise efektiivsuse leidmiseks kasutatud andmed (K_m ja V_{max}) ning nende standardhälbed. Tabelis esitatud tulemused on arvutatud vähemalt kahe iseseisva korduskatse põhjal. Suhkrute puhul, mille hüdroolüüsil tekib kaks glükoosi molekuli (maltoos ja isomaltoos), on tulemused jagatud kahega.

| Substraat | V_{max} (U/mg) | V_{max} standardhälve (U/mg) | K_m (mM) | K_m standardhälve (mM) | K_{cat}/K_m (1/mM*min) |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------------------|------------|--------------------------------|-----------------------------|
| WT MAL1 (Viigand jt., 2016) | | | | | |
| Sahharoos | 166 | 6.3 | 25.1 | 2.4 | 437.6 |
| Palatinoos | 22.6 | 0.4 | 6.8 | 0.4 | 219.9 |
| Maltoos | 157.1 | 4.5 | 51.8 | 3.7 | 200.7 |
| Maltotrioo | 205.5 | 5.7 | 20.2 | 1.7 | 673.2 |
| Isomaltoos | 18 | 1.1 | 27.3 | 2.3 | 43.6 |
| WT MAL1 (käesolev töö) | | | | | |
| Sahharoos | 128.5 | 4.4 | 30.8 | 2.6 | 276.1 |
| Palatinoos | 17.8 | 0.31 | 8.8 | 0.57 | 133.8 |
| Maltoos | 182.1 | 8.9 | 51 | 9.92 | 236.3 |
| Maltotrioo | 218.3 | 13.6 | 25.6 | 3.4 | 564.3 |
| Isomaltoos | 15.6 | 0.88 | 41 | 5.3 | 25.2 |
| T200V MAL1 (Viigand jt., 2016) | | | | | |
| Sahharoos | 77.4 | 10.7 | 104.8 | 10.1 | 48.9 |
| Palatinoos | 36.3 | 0.8 | 15.1 | 0.97 | 159.1 |
| Maltoos | 31.8 | 1.0 | 375.9 | 26.1 | 5.6 |
| Maltotrioo | 67.0 | 2.3 | 137.9 | 8.8 | 32.2 |
| Isomaltoos | 31.8 | 1.6 | 40.8 | 4 | 51.5 |
| T200V MAL1 (käesolev töö) | | | | | |
| Sahharoos | 70.3 | 1.2 | 77.8 | 3.2 | 59.8 |
| Palatinoos | 43.2 | 1.3 | 16.9 | 1.6 | 169.1 |
| Maltoos | 27.4 | 1.4 | 395.4 | 55.9 | 4.6 |
| Maltotrioo | 72.3 | 2.6 | 146.4 | 9.9 | 32.7 |
| Isomaltoos | 33.8 | 1.1 | 47.7 | 3.3 | 46.9 |

Lisa 3

Tabel 8. α -glükosidaaside fülogeneesipuu ning substraadivaliku logode koostamiseks kasutatud valkude ja vastavate pärmide tunnusnumbrid andmebaasides ja kultuurikollektsioonides. Tärniga märgitud ensüümid on geenijärjestuse põhjal ennustatud, neid ei ole katseliselt uuritud.

| Lühend | Pärmi liik, tüvi ja ensüüm | UniProtKB tunnusnumber/allikas |
|---------------------------------|--|--|
| <i>A. adenivorans</i> /Aa | <i>Arxula (Blastobotrys) adenivorans</i> CBS8244 α -glükosidaas * | A0A060T069 |
| <i>S. pombe</i> | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972 h- ATCC24843 α -glükosidaas | Q9P6J3 |
| <i>S. cerevisiae</i> /Sc MAL12 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c ATCC204508 maltaas MAL12 | P53341 |
| <i>S. cerevisiae</i> /Sc MAL32 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c ATCC204508 maltaas MAL32 | NP_009858.3 |
| ancMALS | hüpoteetiline ürgmaltaas | Voordeckers jt., 2012 |
| ancMAL | hüpoteetiline ürgmaltaas | Voordeckers jt., 2012 |
| ancMAL-IMA | hüpoteetiline ürgmaltaas | Voordeckers jt., 2012 |
| ancIMA1-4 | hüpoteetiline ürgmaltaas | Voordeckers jt., 2012 |
| ancIMA5 | hüpoteetiline ürgmaltaas | Voordeckers jt., 2012 |
| <i>T. delbrueckii</i> | <i>Torulaspora delbrueckii</i> CBS1146 isomaltaas* | Q5J9B3 |
| <i>L. starkeyi</i> /Ls | <i>Lipomyces starkeyi</i> CBS1807 (NRRLY-11557) α -glükosidaas* | Protein ID: 3262; scaffold_6:175313-177164 |
| <i>O. polymorpha</i> /Op | <i>Ogataea (Hansenula) polymorpha</i> CBS4732 α -glükosidaas MAL1 | Q9P8G8 |
| <i>L. elongisporus</i> | <i>Lodderomyces elongisporus</i> CBS2605 (NRRL YB-4239) α -glükosidaas | A5DVH3 |
| <i>P. stipitis</i> /Ps AGL1 | <i>Pichia (Scheffersomyces) stipitis</i> CBS6054 α -glükosidaas AGL1* | A3LWN5 |
| <i>P. stipitis</i> /Ps MAL8 | <i>Pichia (Scheffersomyces) stipitis</i> CBS6056 maltaas MAL8* | A3LXA2 |
| <i>P. stipitis</i> /Ps MAL7 | <i>Pichia (Scheffersomyces) stipitis</i> CBS6057 maltaas MAL7* | A3LUP5 |
| <i>P. stipitis</i> /Ps MAL6 | <i>Pichia (Scheffersomyces) stipitis</i> CBS6055 maltaas MAL6* | A3LNM1 |
| <i>P. stipitis</i> /Ps MAL9 | <i>Pichia (Scheffersomyces) stipitis</i> CBS6054 maltaas MAL9* | A3GIC0 |
| <i>D. hansenii</i> | <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 (NRRLY-7426) α -glükosidaas* | Q6BXY6 |
| <i>C. fabianii</i> | <i>Cyberlindnera fabianii</i> CBS 5640 α -glükosidaas | ONH65016.1 |
| <i>S. cerevisiae</i> /Sc IMA1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c ATCC 204508 isomaltaas IMA1 | NP_011803.3 |
| <i>S. cerevisiae</i> /Sc IMA2 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c ATCC 204508 isomaltaas IMA2 | NP_014485.1 |
| <i>S. cerevisiae</i> /Sc IMA3/4 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c ATCC 204508 isomaltaas IMA3/4 | NP_012096.1 |
| <i>S. cerevisiae</i> /Sc IMA5 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c ATCC 204508 isomaltaas IMA5 | NP_012319.1 |
| <i>O. parapolyomorpha</i> | <i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1 α -glükosidaas | XP_013932394.1 |
| <i>Gt</i> | <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> ATCC 43742 oligo-1,6-glükosidaas | P29094.1 |
| <i>Bc</i> | <i>Bacillus cereus</i> BGSC 6E1 oligo-1,6-glükosidaas | WP_000415200.1 |
| <i>Gs</i> | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 12016 ekso- α -1,4-glükosidaas | BAA12704.1 |

Tabel 9. Pärmide fülogeneesipuu koostamiseks kasutatud 26SrRNA geeni domeenide 1 ja 2 geenijärjestuste tunnusnumbrid Geenipangas (GenBank)

| Lühend | Pärmi liik ja tüvi | Geenipanga tunnusnumber |
|--------------------------------------|---|-----------------------------|
| <i>O. polymorpha</i> ATCC 34438 | <i>Ogataea polymorpha</i> NRRL Y-5445 (CBS 4732) | NG_042510.1 |
| <i>O. polymorpha</i> NCYC 495 leu1.1 | <i>Ogataea polymorpha</i> NCYC 495 leu1.1 | NW017264704.1:642986-643542 |
| <i>O. thermomethanolica</i> | <i>Ogataea thermomethanolica</i> CBS 10098 | KY108717.1 |
| <i>D. hansenii</i> | <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS 767 | KY107531.1:25-586 |
| <i>O. parapolyomorpha</i> | <i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1 | NC_027866.1:301224-301780 |
| <i>C. fabianii</i> | <i>Cyberlindnera fabianii</i> CBS 12545 | KY108792.1:25-584 |
| <i>P. stipitis</i> | <i>Pichia (Scheffersomyces) stipitis</i> CBS 6054 | CP000487.1:1708586-1709148 |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c | NR_132209.1:65-624 |
| <i>T. delbrueckii</i> | <i>Torulaspora delbrueckii</i> CBS 1146 | KY109850.1:27-587 |
| <i>A. adeninivorans</i> | <i>Arxula (Blastobotrys) adeninivorans</i> CBS 7370 | KY106200.1:29-601 |
| <i>L. elongisporus</i> | <i>Lodderomyces elongisporus</i> | U45763.1 |
| <i>L. starkeyi</i> | <i>Lipomyces starkeyi</i> | U45824.1 |
| <i>S. pombe</i> | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | CU329672.1:8878-9477 |

Lihlitsents

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristina Põšnograjeva (12.07.1995),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose
Ogataea polymorpha maltaas: valgu ja selle mutantide iseloomustamine ja mikroplaadipõhise
aktiivsuse analüüsi meetodi väljatöötamine,

mille juhendajad on Tiina Alamäe, Katrin Viigand ja Karin Ernits,

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

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

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

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

Tartus, 29.05.2017