

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

Mihkel Vaher

**Asp333, Phe381 ja Val385 olulisus *Pseudomonas syringae* pv.
tomato levaansukraasi Lsc3 katalüüsile**

Bakalaureusetöö

Juhendajad dots Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat

Karin Mardo, magister

teadur Triinu Visnapuu, PhD

TARTU 2013



SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Levaansukraasid ja neid sünteesivad bakterid	5
1.1.1 Levaansukraasi erinevad reaktsioonid, substraadispetsiifika ja sünteesitavad produktid	7
1.1.2 Levaansukraaside struktuur ja kristalliseeritud levaansukraasid	10
1.1.3 <i>Bacillus subtilis</i> 'e ja <i>Zymomonas mobilis</i> 'e levaansukraaside uurimine mutatsioonanalüüsiga	12
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 Mutatsioonide viimine <i>lsc3</i> geeni ja klonimine ekspresioonivektorisse	16
2.2.3 DNA transformatsioon, plasmidi eraldamine ja mutatsiooni kontrollimine.....	18
2.2.4 Levaansukraaside heteroloogiline ekspresioon ja rakuekstraktide tegemine	19
2.2.5 Valkude puhastamine ja valgu geelelektroforees.....	19
2.2.6 Levaansukraasi aktiivsuste määramine	20
2.2.7 Arvutipõhised meetodid: valgujärjestuste otsimine andmebaasidest ja joondamine. Valgustruktuuride andmebaas, struktuuride visualiseerimine ja analüüs.	21
2.3 Tulemused ja arutelu.....	23
2.3.1 Levaansukraaside valgujärjestuste joondamine ja sarnasuse hindamine	23
2.3.2 Aminohapete väljavalimine Lsc3 valgus nende suunatud asendamiseks	24
2.3.3. Mutantsete Lsc3 valkude süntees, puhastamine ja iseloomustamine.....	26
2.3.4. Kokkuvõtte Lsc3 mutantide omadustest ja hüpotees levaansukraasi töömehhanismi kohta.....	33
KOKKUVÕTE	36
SUMMARY	37
KIRJANDUSE LOETELU.....	38
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	42
LISA 1	43
LISA 2	44
LISA 3	45
LISA 4	48
LISA 5	50
LIHTLITSENTS	

KASUTATUD LÜHENDID

ah – aminohape

ap – aluspaar

Amp – ampitsilliin

CAZy – *Carbohydrate-Active enZYmes Database*

DP – polümeerisatsiooniaste (*Degree of Polymerization*)

FOS – fruktooligosahhariid

GH – glükosiidi hüdrolaas

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

K_m – Michaelis'e konstant (mM)

LB – Luria-Bertani (sööde)

LevU – *Zymomonas mobilis*'e levaansukraas

LsdA – *Gluconacetobacter diazotrophicus*'e levaansukraas

OD – optiline tihedus (*Optical Density*)

pv. – patovar (patogeenne alamliik)

PDB – *Protein Data Bank*

SacB – *Bacillus subtilis*'e levaansukraas

SDS-PAGE – Na-dodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeelelektroforees

TA – transfruktosüleeriv ehk polümeriseeriv aktiivsus

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

WT – metsiktüüpi (muteerimata) valk

SISSEJUHATUS

Suhkrute polümeerid on looduses väga laialdaselt levinud. Neid molekule kasutatakse nii ehituslikul eesmärgil (tselluloos ja kitiini) kui ka energiatalletamisel (tähtis ja glükogeen). Nende polümeeride sünteesiks on tarvilikud ensüümid, mis liidavad monomeerid pikkadeks suhkruahelateks.

Levaan on fruktaan ehk fruktoosijääkidest koosnev polümeer, mida sünteesivad peamiselt bakterid, kes kasutavad seda erinevatel eesmärkidel: varuainena, virulentsusfaktorina või rakku kaitsva kapsli moodustamiseks. Kogu levaanitekke reaktsiooni viib läbi sama ensüüm – levaansukraas. Polümeeri moodustamiseks vajalikuks tooraineks on sahharoos ning kasutades sellest vaid fruktoosijääki, jääb vabanenud glükoos bakterile energiaallikaks. Erinevalt paljudest teistest bakterivalkudest transporditakse levaansukraas rakust välja, mistõttu peab see ensüüm olema piisavalt vastupidav, et mitte väliskeskkonnas laguneda ja katalüütilist aktiivsust kaotada. Levaanil ning lühema-ahelalistel fruktooligosahhariididel on leitud mitmeid biotehnoloogilisi rakendusi. Näiteks toimivad fruktooligosahhariidid inimesele kasulike prebiootikumidena. Teades neid sünteesivate ensüümide ehituse ja funktsiooni seoseid, saaks välja töötada võimalikult odava ja efektiivse meetodi soovitud omadustega produktide saamiseks.

Ensüümi struktuuri ja funktsiooni uurimiseks kasutatakse valgu lahendatud ruumilist struktuuri ja mutatsioonanalüüsi, millest viimane hõlmab endas aminohapete asendamist valgus ning mutantide omaduste ja katalüütilise aktiivsuse võrdlemist muteerimata valguga. Taimepatogeeni *Pseudomonas syringae* patovaril tomato DC3000 on kolm levaansukraasi, millest Lsc3 on *Escherichia coli*'s ekspresseerides kõige kõrgema katalüütilise aktiivsusega. Minu bakalaureusetöö eesmärgiks oli mutatsioonanalüüsiga uurida Lsc3 katalüütilise tsentri läheduses asuvaid C-terminaalsete aminohapete positsioone Asp333, Phe381, Val385, mille muteerimisel võiks muutuda valgu substraadispetsiifika ja produktide pikkus. Töö eesmärgid on detailsemalt toodud peatükis 2.1.

Töö valmis Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi Geneetika õppetoolis, Eesti Teadusagentuuri grantiprojekti GLOMR 9072 ning projekti Functional Food Ingredients (3.2.0701.12-0041; SLOMR12215T) raames. Tänaaksin oma juhendajaid Tiina Alamäe'd, Karin Mardo't ja Triinu Visnapuu'd, kes aitasid käesolevat tööd koostada. Tahaksid tänada ka kõiki TÜMRI töötajaid, kes aitasid töö valmimisele kaasa ning Heiki Vija't Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudist, kes analüüsis Lsc3 mutantide reaktsiooniprodukte kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Levaansukraasid ja neid sünteesivad bakterid

Levaansukraasid (EC 2.4.1.10) on bakteriaalsed ekstratsellulaarsed ensüümid, millel on nii hüdrolyüsiv kui ka polümeriseeriv aktiivsus. Ensüümi peamiseks substraadiks on sahharoos (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2) β -D-Fruf; GF; Joonis 1), kuid on näidatud ka rafinoosi (α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2) β -D-Fruf; GalGF) ja stahhüoosi (α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fruf; Gal₂GF) sobivust substraadina (Yanase *et al.*, 2002; van Hijum *et al.*, 2004; Seibel *et al.*, 2006; Visnapuu *et al.*, 2011). Kõigepealt seondub ensüüm doonoriga ning lagundab selles glükoosi- ja fruktoosijäägi vahelise sideme. Fruktoosijääk jääb ensüümiga seotuks. Polümerisatsioonireaktsiooni käigus kannab levaansukraas fruktoosijäägi sobivale aktseptormolekulile ning toimub transfruktosüülimine (Ozimek *et al.*, 2006; Meng ja Fütterer, 2008; Lammens *et al.*, 2009). Kuna aktseptormolekulidele võib fruktoosijääke liita korduvalt, siis on produktideks erineva pikkusega fruktaanid: lühikestest fruktooligosahhariididest (FOS-dest) kuni pika, miljonitest fruktoosi monomeeridest koosneva levaanini (Lammens *et al.*, 2009).

Levaanis on fruktoosijäägid omavahel seotud β (2 \rightarrow 6) sidemetega. Levaansukraaside gene leidub peamiselt bakterites aga ka mõnes arhes. Levaaniga sarnane ühend on inuliin, milles peaaegu koosneb β (2 \rightarrow 1) sidemetega seotud fruktoosi jääkidest. Inuliini sünteesivaid ensüüme on leitud nii bakteritel, taimedel kui ka seentel (<http://www.cazy.org>). Levaansukraase on leitud mitmetest bakterirühmadest nagu batsillid, pseudomonaadid jt gammaproteobakterid ning alfaproteobakterid (<http://www.cazy.org/GH68.html>). Levaansukraasid ja inulosukraasid on koos bakteriaalsete β -fruktofuranosidaaside ehk invertaasidega klassifitseeritud glükosiidi hüdrolaaside perekonda 68 (GH68). Perekonda GH68 kuuluvad ainult bakteriaalsed inulosukraasid. Taimset päritolu inuliini sünteesivad ensüümid on GH32 perekonna liikmed (<http://www.cazy.org>).

Bakteritele on levaansukraasid kasulikud erinevatel põhjustel ning seega toimub ensüümi sünteesi regulatsioon vastavalt bakteri eripärale. Näiteks biofilmi moodustava mullabakteri *Bacillus subtilis* levaansukraasi SacB ekspressiooni saab indutseerida sahharoosiga, mida levaansukraas on võimeline hüdrolyüsima ning fruktoosijääke polümeriseerima (Leloup *et al.*, 1999). Kui keskkonnas on palju sahharoosi, siis sünteesitakse levaani, mis võib nälja korral olla bakterile rakuväliseks varuaineks. Kuna levaansukraasi puhul on tegemist ekstratsellulaarse ensüümiga, siis võib see valk bakteri jaoks keskkonnas oleva sahharoosi

levaanina kokku koguda (Laue *et al.*, 2006). SacB viiakse rakust välja SecA raja abil ja tõusnud SecA tase põhjustab suurema levaansukraasi tootmise. Kõik see viitab SacB sünteesi rangele kontrollile (Leloup *et al.*, 1999). Levaanis sisalduva fruktoosi taaskasutamiseks on *B. subtilis*'el ekso-aktiivsusega levanaas SacC (Gay *et al.*, 1983; Wanker *et al.*, 1995), mille ekspressioon indutseerub madalal fruktoosi kontsentratsioonil (Martin *et al.*, 1989). Kui *B. subtilis*'e levanaas inaktiveeriti, siis täheldati kõrgema polümerisatsioonastmega fruktaanide teket, tõenäoliselt sellepärast, et levanaas ei saanud sel juhul levaaniahelaid lühendada (Shida *et al.*, 2002).

Etanoolkääritaja *Zymomonas mobilis* sünteesib sahharoosi olemasolul kolme ensüümi: rakusisest sukraasi, rakuvälist sukraasi ning levaansukraasi (LevU) (Sangiliyandi ja Gunasekaran, 2004). Sukraasid on invertaasse aktiivsusega ensüümid, mis hüdrolüüsivad sahharoosi. *Z. mobilis* sünteesib sahharoosist nii FOS-e kui ka levaani (Bekers *et al.*, 2002; Vigants *et al.*, 2013).

Roosõielistel (*Rosaceae*), kuhu kuuluvad näiteks õuna- ja pirnipuud, viljapuu-bakterpõletikku tekitava *Erwinia amylovora* levaansukraasi süntees on homoseriinlaktoonsete signaalmolekulide vahendusel reguleeritud hulgatunnetusega. Leiti, et bakterirakud, millesse oli viidud signaalmolekuli lagundava laktonaasi geen, sünteesisid vähem levaansukraasi (Molina *et al.*, 2005). Arvatakse, et *E. amylovora* patogeenne efekt tuleneb taime veevoolukanalite ummistumisest, milles osaleb levaan, aga ka teised bakteri eksopolüsahhariidid (Oh ja Beer, 2005).

Kuna levaan moodustab bakteriraku ümber limase kapsli, siis on uuritud levaani panust biofilmi tekkes. Üldiselt on jõutud järeldusele, et levaan ei ole biofilmi tekkeks hädavajalik, kuid võib mingil määral aidata kaasa selle struktuuri moodustumisele (Laue *et al.*, 2006; Velazquez-Hernandez *et al.*, 2011; Koczan *et al.*, 2009). Ka õhulämmastikku siduva suhkruroo endosümbiondi *Gluconacetobacter diazotrophicus*'l pole levaan biofilmi tekkeks otseselt vajalik, kuid osaleb biokile küpsemisel. Levaansukraasita rakud suutsid küll kinnituda, kuid jäid biokile tekitamises siiski levaansukraasiga bakteritele alla (Velazquez-Hernandez *et al.*, 2011).

Levaanil võib olla bakterite jaoks veel teisi funktsioone. Näiteks võib levaan moodustada rakke kaitsva ümbrise bakteriofaagide vastu (Paton, 1960) või peita patogeene taime kaitsesüsteemide eest nagu on pakutud välja *P. syringae* pv. *phaseolicola* puhul (Kasapis *et al.*, 1994). Lisaks kaitsele bioloogilise ohu eest võib levaan olla kasulik ka ebasoodsate keskkonnatingimuste näiteks kõrge osmootse rõhu või kuivamise korral (Paton, 1960). Kõrge

osmootne rõhk ja kuivamine on oma bioloogilise toime poolest sarnased. *G. diazotrophicus* elab suhkruroo apoplastis, kus sahharoosi kontsentratsioon võib küündida väärtuseni 350-876 mM (Dong *et al.*, 1997). Levaansukraasi ekspresseeriv bakter jäi ellu ka 300 mM NaCl keskkonnas (Hartmann *et al.*, 1991), samas kui LsdA-negatiivsed rakud surid kõrgel sahharoosi ja NaCl kontsentratsioonil. See näitab, et levaansukraasi olemasolu mängib olulist rolli raku siserõhu säilitamisel (Velazquez-Hernandez *et al.*, 2011). Bakter võib osmoosi ka enda tarbeks ära kasutada: näiteks *P. syringae*'l moodustab rakku ümbritsev levaan osmootse gradiendi toitaivate rakule lähemale toomiseks (Paton, 1960).

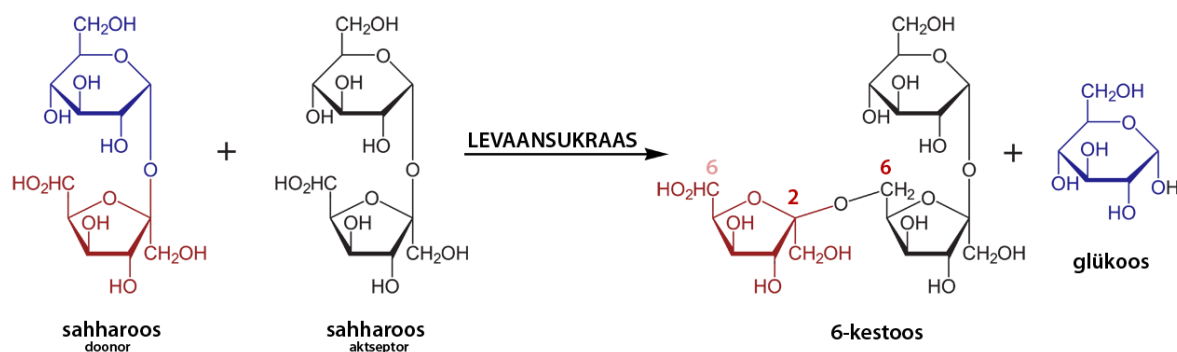
Bakteriaalsele levaanile võiks olla mitmeid kasutusalasid. Rottidega tehtud katsed näitavad, et toidulisandina levaani manustades saaks võidelda rasvumise vastu, sest levaan vähendab rasvhapete sünteesis osalevate ensüümide ekspressiooni. Tõenäoliselt stimuleerib levaan ka lipolüüsi (Kang *et al.*, 2005). Lisaks toidulisandile võib levaani kasutada ka meditsiinis. Kindla pikkusega levaaniahelatel on leitud vähivastane toime (Calazans *et al.*, 1997; Dahech *et al.*, 2012). Rairakhwada *et al.* (2007) näitasid, et levaanil on karpkalade immuunsüsteemi stimuleeriv toime, sest levaani tarbinud noortel kaladel vähenes patogeense *Aeromonas hydrophila*'ga nakatumine.

Praegusel hetkel müüvad levaani mitmed firmad, näiteks Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>; St. Louis, USA) RealBiotech (<http://www.realbio.com>; Chungnam, Korea) ja Advance (<http://www.advance.jp>; Tokyo, Jaapan). Pakutakse nii puhastatud levaani kui ka levaani sisaldavaid nahahooldusvahendeid ja laktobatsille stimuleerivaid prebiootikume ning levaani kasutavaid dieediprogramme.

1.1.1 Levaansukraasi erinevad reaktsioonid, substraadispetsiifika ja sünteesitavad produktid

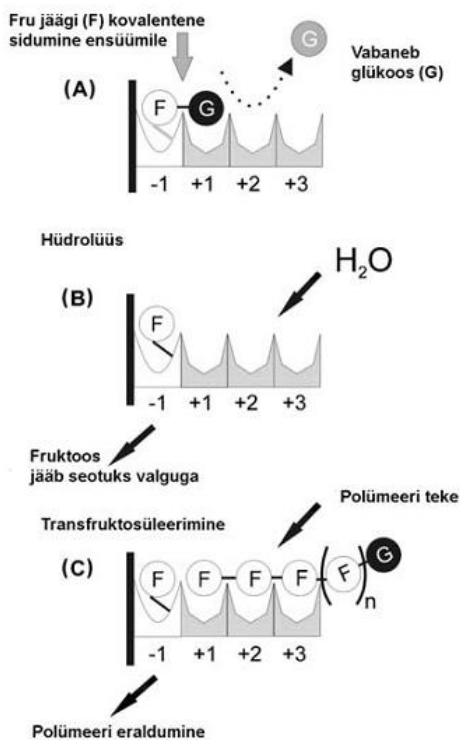
Levaansukraasi reaktsiooni esimese etapina toimub substraadi lõhustamine, mille tulemusena jääb katalüütilisse taskusse seotuks fruktoosijääk (Joonis 2A). Substraadi hüdrolyüsil vabanenud energiat kasutatakse ensüümiga seostunud fruktoosijäägi ning aktseptormolekuli vahele sideme loomiseks. Kui aktseptoriks on vesi, toimub hüdrolyüs (Joonis 2B), kuid fruktoosijäägi võib liita ka teisele sahharoosi molekulile (Joonis 1) või kasvavale fruktaaniahelale (Joonis 2C). Seega on levaansukraas sõltuvalt aktseptormolekulist võimeline läbi viima kahte erinevat tüüpi reaktsiooni. Kuna fruktaaniahela pikendamist alustatakse

sahharoosist, siis on ahela ühes otsas alati üks glükoosijääk (French *et al.*, 1993; van Hijum *et al.*, 2006; vt Joonised 1 ja 2C).



Joonis 1. Levaansukraasi katalüüsitud reaktsioon, kus nii fruktoosijäägi doonoriks kui aktseptoriks on sahharoos. Esmase transfruktosüülimisproduktina moodustub 6-kestoos ning vabaneb glükoos. Sünteesitud 6-kestoosis on märgitud tekkinud $\beta(2\rightarrow6)$ side.

Lisaks sahharoosile võib levaansukraas substraadina kasutada nii rafinoosi kui ka stahhüoosi, mis sisaldavad mõlemad sahharoosi osa (van Hijum *et al.*, 2006; Visnapuu *et al.*, 2011). Fruktoosijäägi aktseptorite spekter on levaansukraasidel tunduvalt laiem. Lisaks eelmainitud substraatidele võivad *P. syringae* pv. tomato levaansukraasile (Lsc3) olla fruktosüüli aktseptoriteks paljud teised molekulid nagu ksüloos, fukoos, arabinoos, riboos, sorbitool, ksülitool, ksülobioos, mannitool ja galakturoonhape (Visnapuu *et al.*, 2011).



Joonis 2. Levaansukraasi erinevad reaktsioonid. (A) Sahharoos seondub kovalentselt ensüümile nii, et fruktoosijääk jääb -1 ja glükoosijääk +1 piirkonda. Toimub sideme katkestamine ning vabaneb glükoos. Järgnevalt võib levaansukraas fruktosüüli üle kanda veele viies läbi hüdrolyüsi (B) või juba olemasolevale polümeerile, pikendades seda (C) (Ozimek *et al.*, 2006)

Levaansukraasi produktide pikkust mõjutavad suuresti reaktsioonitingimused. Sangiliyandi töögrupp (1999) näitas, et *Z. mobilis*'e levaansukraas kõrgemal temperatuuril (50°C) pigem hüdrolyüsib substraati, aga madalamal (30°C) toimub eelistatult polümerisatsioonireaktsioon. See võib tuleneda sellest, et kõrgemal temperatuuridel on sidemed suhkrujääkide vahel nõrgemad, muutes selletõttu hüdrolyüsi termodünaamiliselt polümerisatsioonist soodsamaks protsessiks. Polümeerset levaani toodetakse eelistatult madalamatel temperatuuridel, aga FOS-ide süntees toimub kõrgemal (Euzenat *et al.*, 1997). Polümerisatsiooni efektiivsust saab suurendada ka substraadi (sahharoosi) kontsentratsiooni tõstmisega. Kõrgemal substraadi kontsentratsioonil on ensüümi aktiivsentril lähedal rohkem substraadi molekule, mis suurendab tõenäosust, et ka aktseptorpiirkonda seostub sahharoos ning saab toimuda polümerisatsioonireaktsioon (Euzenat *et al.*, 1997; van Hijum *et al.*, 2006).

Veel mõjutab produktide pikkust ja ensüümi aktiivsust keskkonna soolsus. *B. subtilis*'e levaansukraasil põhjustas 0,8 M fosfaat vaid väikese molekulmassiga levaani tootmist. Samas lahjemal kontsentratsioonil (0,08 M) toodeti nii väikese kui suure molekulmassiga fruktaane (Tanaka *et al.*, 1980). Leiti, et naatriumi- ja kaaliumisoolade juuresolekul sünteesib *Z. mobilis* rohkem fruktooligosahhariidide, mis võivad omakorda käituda osmoprotektoritena (Bekers *et al.*, 2002). Lisaks tõstab 0,4 M NaCl sisaldus keskkonnas *Z. mobilis*'e levaansukraasi levaani tootmist 1,2 korda. Sarnane efekt võib olla ka kaaliumisooladel. See võib viidata asjaolule, et need soolad aktiveerivad otseselt levaansukraasi (Vigants *et al.*, 1998). Grampositiivse bakteri *Leuconostoc mesenteroides*'e levaansukraasi mõjutasid aga raskemetallid vastupidiselt: 1 mM Hg²⁺ või Ag⁺ sisaldus keskkonnas inhibeeris ensüümi aktiivsust peaaegu täielikult (Kang *et al.*, 2005).

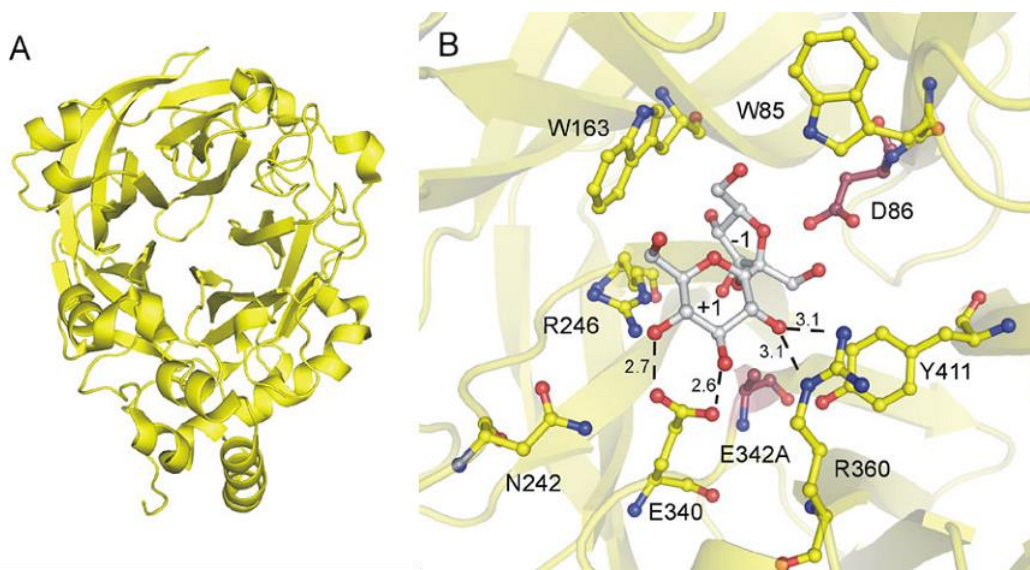
Soolad pole ainsad ained, mis produktide sünteesi mõjutavad. *Z. mobilis*, kes toodab etanooli nii sahharoosist kui ka glükoosist ja fruktoosist. Kui seda bakterit kasvatada sahharoosil, siis puutub tema rakuväline levaansukraas LevU kokku etanooliga. Puhastatud LevU puhul märgati, et kõrgemal etanooli kontsentratsioonil suurenes tema polümeriseerimisvõime. See efekt oli eriti selgelt nähtav madalamatel temperatuuridel (Vigants *et al.*, 2013). *B. subtilis*'e levaansukraasiga tehtud katsed näitasid sarnast tendentsi - 40% etanooli lisamisel reaktsioonikeskkonda kasvas kõrge molekulmassiga levaani hulk (Tanaka *et al.*, 1980).

Z. mobilis'e levaani tootmisega on tehtud teisigi katseid. Näiteks võrreldi levaansukraasi produktide spektrit erinevatel levaansukraasi preparaatidel: a) levaansukraasil, mis immobiliseeriti magnetiidile ja b) toluueeniga permeabiliseeritud rakkudel. Leiti, et immobiliseeritud levaansukraasid ja permeabiliseeritud rakud toodavad lühema ahelaga

levaani võrreldes vaba ensüümiga. See võib olla tingitud sellest, et nii töödeldud ensüümid ja kui ka rakud seovad pikemaid polümeere nõrgemini, tehes nende pikendamise raskemaks (Jang *et al.*, 2001). Üldist järeldust siit siiski teha ei saa, sest näiteks *B. subtilis*'e levaansukraasi immobiliseerimisel hüdroksüapatiidile hoopiski suurenes kõrge molekulmassiga levaani teke (Chambert ja Petit-Glatron, 1993).

1.1.2 Levaansukraaside struktuur ja kristalliseeritud levaansukraasid

Fruktaansukraasidele (levaansukraasidele ja inulosukraasidele) on omane viielabalise β -propelleri kuju, kus propelleri iga laba koosneb neljast antiparalleelsest β -ahelast, mis ümbritsevad negatiivselt laetud tasku põhjas asuvat aktiivtsentrit (Joonis 3A) (Meng ja Fütterer, 2003). Katalüüsi läbiviimiseks on tähtsaimad kaks aspartaati ja üks glutamaat, mille asukohad on täielikult konserveerunud kõigis fruktaansukraasides, moodustades katalüütilise kolmiku (Meng ja Fütterer, 2003; Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Strube *et al.*, 2011; Lisa 3). Joonisel 3B on näidatud *B. subtilis*'e levaansukraasi aktiivtsentrisse kuuluvad aminohapped (Meng ja Fütterer, 2003; Lammens *et al.*, 2009).



Joonis 3. *B. subtilis*'e levaansukraas SacB (A) ning selle aktiivtsenter lähemalt koos sahharoosiga (B). Punaselt on märgitud katalüütilise kolmiku aminohapped (Asp86, Asp247 (joonisel märkimata), Glu342). Sahharoosiga kristalliseerimiseks on Glu342 muteeritudalaniiniks. Joonis pärineb artiklist Lammens *et al.* (2009). Substraadiga seostumise tasku alapiirkonna -1 moodustavad Trp85, Asp86, Trp163, Arg246 ja Asp247, alapiirkonna +1 aga moodustavad Arg246, Glu340, Glu342 ja Arg360 (Ozimek *et al.*, 2006). Asn242 võiks kuuluda +2 alapiirkonda (Homann *et al.*, 2007).

Ensüümi substraadi sidumise tasku võib jagada alapiirkondadeks, kus -1 piirkond on väga spetsiifiline ja seob suure afiinsusega ainult fruktoosijääki. +1 alapiirkonda võivad aga

seostuda nii doonorina toimiva sahharoosi (või rafinoosi) glükoosijääk kui ka aktseptorina toimiva sahharoosi fruktoosijääk (Meng ja Fütterer, 2008; vt Jooniseid 2 ja 3). +1 alapiirkonna lödvem substraadispetsiifilisus lubab piirkonda seostuda ka mittetraditsioonilistel aktseptoritel, mille tagajärjel sünteesitakse lisaks „tavalistele“ fruktooligosahhariididele ka heterooligofruktaane (Visnapuu *et al.*, 2011). Alapiirkondade paigutus ja kuju konkreetsetes ensüümis määravad ära, milline produkt sünteesitakse. Näiteks levaansukraasides ja inulosukraasides peaks vastavalt $\beta(2\rightarrow6)$ või $\beta(2\rightarrow1)$ sideme moodustumiseks olema aktseptormolekuli fruktoosijääk erinevalt orienteeritud (Pijning *et al.*, 2011). Mutatsioonid +1 ja +2 alapiirkondades mõjutasid näiteks *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB polümeriseerimise ja hüdrolüüsamise suhet, kuid mitte sideme tüüpi produktides (Chambert ja Petit-Glatron, 1991). Sarnaseid tulemusi on saadud ka inulosukraaside puhul, millest võib järeldada, et +1 ja +2 alapiirkonnad ei määra tekkiva sideme spetsiifikat (Pijning *et al.*, 2011).

Tabel 1. Kristalliseeritud bakteriaalsed fruktosüüli transferaasid, mis kuuluvad GH68 perekonda. Andmed pärinevad PDB andmekogust (<http://www.pdb.org>; Berman *et al.*, 2003).

Tüüp	Ensüümi tähistus	Päritolu	PDB ID	Ligand	Viide
Levaansukraas	SacB	<i>B. subtilis</i> subsp. subtilis tüvi 168	1OYG	-	Meng ja Fütterer, 2003
			1PT2	sahharoos	Meng ja Fütterer, 2003
			3BYN	rafinoos	Meng ja Fütterer, 2008
Levaansukraas	LsdA	<i>G. diazotrophicus</i> SRT4	1W18	-	Martinez-Fleites <i>et al.</i> , 2005
Levaansukraas	SacB	<i>B. megaterium</i>	3OM2	-	Strube <i>et al.</i> , 2011
Inulosukraas	InuJ	<i>L. johnsonii</i> NCC533	2YFR	-	Pijning <i>et al.</i> , 2011
			2YFS	sahharoos	Pijning <i>et al.</i> , 2011
			2YFT	1-kestoos	Pijning <i>et al.</i> , 2011
β -frukto-furanosidaas*	ArFFase	<i>Arthrobacter</i> sp. K-1	3VSR	-	Tonozuka <i>et al.</i> , 2012
			3VSS	fruktoos	Tonozuka <i>et al.</i> , 2012

*Struktuurilt ja funktsioonilt väga sarnane levaansukraasidega (Tonozuka *et al.*, 2012).

Inulosukraasid sünteesivad pigem lühemaid FOS-e võrreldes levaansukraaside sünteesitud peamiselt pikkade fruktaanidega. Näiteks *Lactobacillus reuteri* 121 inulosukraas sünteesis fruktooligosahhariide, mille DP (*Degree of Polymerization* – polümerisatsiooniate) oli kuni 15, aga sama bakteri levaansukraas sünteesis põhiliselt levaani. Ahela pikendamine nõuab ensüümilt protsessiivsust – pika aktseptormolekuli tugevat ja püsivat seostumist ensüümile, ilmselt +2, +3 ja kaugematesse alapiirkondadesse, et polümerisatsiooni läbi viia. Kirjanduses on diskuteeritud, et mõõtmelalt väike sahharoosi molekul võiks pääseda levaansukraasi

seostumistasku -1 ja +1 alapiirkondadesse polümeerse aktseptori seondumist mõjutamata ning fruktoosijäägi saaks juba seostunud aktseptorile koheselt üle kanda (Ozimek *et al.*, 2006).

Praeguseks on lahendatud kolme levaansukraasi, ühe inulosukraasi ja mitme β -fruktofuranosidaasi struktuurid (vt Tabel 1). *B. subtilis*'e levaansukraas SacB oli esimene GH68 perekonda kuuluv ensüüm, mille ruumiline struktuur, katalüütiline nukleofiil ning stereokeemia kindlaks määrati (Meng ja Fütterer, 2003). SacB valku on kristalliseeritud ka koos ligandidega – sahharoosi ja rafinoosiga (Meng ja Fütterer, 2003, 2008). Kristallstruktuuride andmeid saab kasutada nende valkude struktuuri ennustamisel, mis võiksid olla kristalliseeritud valkudele lähedase struktuuriga. Meie grupis on *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi (Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo, 2011) ja *Arthrobacter* sp. K-1 β -fruktofuranosidaasi (Mardo *et al.*, ilmumas) kristallstruktuuri kasutatud *P. syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 struktuuri modelleerimiseks. Mudelite analüüsi koos valgujärjestuse joondusega saab kasutada piirkondade ja positsioonide väljavalimiseks mutatsioonanalüüsiks ning ka juba tehtud valgumutantide omaduste interpreteerimiseks.

1.1.3 *Bacillus subtilis*'e ja *Zymomonas mobilis*'e levaansukraaside uurimine mutatsioonanalüüsiga

Suur osa andmeid levaansukraaside struktuuri ja funktsiooni seoste kohta on saadud mutatsioonanalüüsiga. Selleks asendatakse üks või mitu aminohapet ensüümis tavaliseltalaniini ja vahel ka mõne teise soovitud omadustega aminohappega ning jälgitakse valgumomaduste muutusi. Isegi kristallstruktuuri olemasolul on vaja täiendavalt teha mutatsioonanalüüsi, et määratleda aminohapete rolli valgus. Mutatsioone tehakse tavaliselt kohtsuunatult, kuid huvitavaid tulemusi on saadud ka juhuslikku mutageneesi kasutades. Mutatsioonanalüüsi on palju tehtud *B. subtilis*'e ja *Z. mobilis*'e levaansukraasidel.

Levaansukraaside, fruktosüüli transferaaside ja β -fruktofuranosidaaside hulgas on konserveerunud RDP-motiiv (vt ka Lisa 3), mille aspartaadile on pakutud välja reaktsiooni vaheprodukti stabiliseerimise funktsiooni. Yanase töögrupp (2002) otsustas *Z. mobilis*'e levaansukraasis (LevU) kohtsuunatult asendada happelisi aminohappeid, mis on joonduste järgi levaansukraasides konserveerunud. RDP-motiivis paikneva Asp194 vahetusel asparagiiniga kaotas ensüüm võime hüdrolüüsida sahharoosi. Kuna aga afiinsus sahharoosile ei langenud ning transfruktosüleeriv aktiivsuse osakaal võrreldes algse valguga ei muutunud, siis tehti järeldus, et tegu võiks olla vaheühendi stabiliseerijaga. Samas töös isoleeriti ka *Z. mobilis*'e levaansukraasi juhuslikke mutante. Selles selektsioonis leiti inaktiivne mutant M33,

milles oli toimunud asendus Glu278Asp. Sellel mutandil alanes katalüütiline konstant (k_{cat}) 30 korda. Kui sama positsioon asendati kohtsuunatult histidiiniga (positiivse laenguga aminohape), langes k_{cat} koguni 210 korda. Katsetest järeldati, et Glu278 osaleb *Z. mobilis*'e levaansukraasis substraadi glükosiidsideme lagundamisel alus-hape katalüüsijana (Yanase *et al.*, 2002). Alus-hape katalüüsijate paiknemine levaansukraaside joondustel on näidatud ka Lisas 3.

Meng ja Fütterer'i töögrupp tegi aastal 2003 kindlaks *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB kristallstruktuuri ja tõestas ka mutatsioonanalüüsiga ensüümi katalüütilise kolmiku: nukleofiili (Asp86), vaheühendi stabiliseeriija (Asp247) ning alus-hape katalüüsija (Glu342). Vastavate positsioonide aminohapped asendatialaniiniga, mis on väike mittepolaarne aminohape. Uuriti muteeritud valkude katalüütilist aktiivsust ning kõik kolm mutanti kristalliseeriti. Ükski katalüütilise kolmiku mutant ei olnud võimeline tootma levaani. Näidati ka, et asendused ei mõjutanud ensüümi üldist struktuuri. Alus-hape katalüüsija mutant Glu342Ala kristalliseeriti ka koos aktiivtsentris oleva substraadiga (sahharoosiga SacB struktuuri PDB ID: 1PT2; Meng ja Fütterer, 2003; Joonis 3).

Mutatsioonanalüüs annab võimaluse tuvastada ka positsioone, mis on olulised moodustuvate produktide spektris. *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB muteerimisel on selgunud, et mitmed asendused valgus muudavad levaansukraasi reaktsiooniproduktide pikkust. Näiteks SacB mutandid Tyr429Asn ja Arg433Ala suutsid sahharoosist sünteesida vaid oligosahhariide (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Nimetatud mutandid inspireerisid meid tegema Lsc3 valgus mutante käesolevas töös. Veelgi tugevamini mõjutas SacB valguga sünteesitavate produktide pikkust Arg360 muteerimine. Arg360 asendamine seriini või leutsiiniga kaotas mutandil levaani sünteesimise võime, moodustus ainult trisahhariid kestoos, samas sahharoosi hüdrolüüsi võime jäi muutumatuks (Chambert ja Petit-Glatron, 1991). Homoloogne positsioon *Z. mobilis*'e levaansukraasis on His296 ja Lsc3 valgus His321 (vt Lisa 1). His296 ja His321 muteerimine näitas, et see aminohape on ülioluline ka nende levaansukraaside transfruktosüülimisreaktsiooniks (Li *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2011).

Z. mobilis'e mutantide põhjal on uuritud veel positsioone Trp47, Trp118 ja Arg193, mis asuvad LevU valgus konserveerunud motiivides 46-VWD-48, 117-EWSG-120 ja 193-RDP-195. Mainitud aminohapped asuvad ennustuse järgi substraaditasku -1 alampiirkonnas ning mutatsioonanalüüs näitas, et need aminohapped ei osale mitte ainult fruktoosijäägiga seondumises, vaid mõjutavad ka sünteesitava produkti pikkust. Trp47Asn ja Trp47His mutandid sünteesisid sarnaselt muteerimata ensüümiga pikka polümeerset levaanahelat, kuid

kaotasid võime moodustada trisahhariididest pikemaid FOS-e. Trp118 asub ennustatuse kohaselt -1 alampiirkonna lähedal, aga ei puutu otsestelt kokku substraadiga, pigem moodustab hüdrofoobse piiri aktiivtsentrile. Mutatsioonid Trp118Asn ja Trp118His muutsid ensüümi praktiliselt inaktiivseks. Aminohappe vahetused positsioonis Arg193 põhjustasid afiinsuse langust sahharoosile, mis näitab, et see positsioon on oluline substraadi seondumisel. Leiti ka, et mahukam katalüütiline tasku vähendab ensüümi afiinsust kasvavale polümeeriahelale, mõjutades tugevalt produktide pikkust (Li *et al.*, 2011).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Meie töögrupis on käsil *Pseudomonas syringae* patovar tomato DC3000 levaansukraasi Lsc3 struktuuri ja funktsiooni vaheliste seoste uurimise projekt (GLOMR 9072), mida rahastab Eesti Teadusagentuur.

Levaansukraaside uurimine ei ole seni andnud vastuseid järgmistele olulistele küsimustele: 1) millised piirkonnad ja positsioonid valgus määravad levaansukraasi protsessiivsuse ehk võime teha peamiselt kas fruktooligosahhariide või siis pika ahelaga produkti - levaani, 2) mis määrab ära levaansukraasi substraadivaliku. Kuna meie projektis uuritav Lsc3 valk on katalüütiliselt väga aktiivne, on mõtet tegelda selle valgu muteerimisega spetsiifiliste produktide (näiteks fruktooligosahhariidide või levaani) suuremaks sünteesiks. Lsc3 valku saab kasutada ka substraadivaliku uurimisel, kuna ta kasutab nii sahharoosi kui ka rafinoosi. Seni on selle probleemiga väga vähe tegeletud.

Minu ülesandeks sai kolme positsiooni, Asp333, Phe381 ja Val385, olulisuse selgitamine Lsc3 valgu katalüüsis. Need aminohapped valiti välja lähtudes levaansukraaside järjestuste võrdlemisest ning mutatsioonidest, mis oli varem tehtud *Z. mobilis*'e levaansukraasis LevU ja *B. subtilis*'e levaansukraasis SacB (Yanase *et al.*, 2002; Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Vastavatel SacB ja LevU mutantidel oli muutunud nii protsessiivsus kui ka substraadivalik.

Konkreetsemad töös püstitatud ülesanded olid järgmised:

- 1) Konstrueerida pURI3 vektorit kasutades plasmiidid mutantsete Lsc3 valkude Asp333Ala, Asp333Asn, Phe381Ala, Phe381Asn ja Val385Ala ekspresseerimiseks *Escherichia coli*'s.
- 2) Ekspresseerida mutantseid levaansukraase, puhastada valgud ning iseloomustada nende katalüütilisi omadusi võrrelduna muteerimata valguga.
- 3) Ennustada muteeritud positsioonide asukohti Lsc3 valgus ja nende rolli katalüüsis.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutatud konstruktide tegemiseks kasutati *Escherichia coli* bakteritüve DH5 α (*supE44 lacU169* (ϕ 80 *lacZ*AM15) *recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1*) (Invitrogen, CA, USA; Miller, 1972). DH5 α tüve kasutati kloneerimisetapis ja sealt puhastati plasmiidne DNA (vt pt

2.2.3). Metsiktüüpi ja mutantseid valke ekspresseeriti *E. coli* BL21(DE3) tüves [*hsdS gal* (*λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*); Studier ja Moffatt, 1986] nagu on kirjeldatud alapeatükis 2.2.4.

Mutantsete *lsc3* geenide ekspresseerimiseks kasutati kõrge koopiaarvuga pURI3 plasmidi (2737 ap) (Rivas *et al.*, 2007), millesse kloneeriti *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi metsiktüüpi (Visnapuu *et al.*, 2011) või mutantne *lsc3* geen, saades konstrukt pURI3-*lsc3* (3820 ap; vt Lisa 1). Plasmiidil on selektsioonimarkeriks ampitsilliini (Amp) resistentsusgeen ning levaansukraasi ekspressioon on T7 promootori kontrolli all (Lisa 1). Ekspresseeritavale valgule lisatakse kloneerimisega N-terminusse His₆-järjestus, mida saab kasutada valgu puhastamiseks. Matriitsina kasutati metsiktüüpi *lsc3* geeni sisaldavat pURI3-*lsc3* plasmidi konstrueeris T. Visnapuu. Töös kasutatud ja konstrueeritud plasmiidid on toodud Tabelis 2.

2.2.2 Mutatsioonide viimine *lsc3* geeni ja kloneerimine ekspressioonivektorisse

Mutatsioonid viidi *lsc3* geeni kasutades kohtsuunatud muteerimist megaprimeri meetodil (vt selgitavat joonist Lisas 2) (Wei *et al.*, 2004); Visnapuu *et al.*, 2011). Mutatsioon tekitati vastavat mutatsiooni sisaldava PCR-i praimeriga (vt allpool). Muteerimisel kasutatud praimerid ja saadud konstruktid on esitatud Tabelis 2. Selgitavad joonised muteerimise ja PCR-põhise ligaasivaba kloneerimise etappide kohta asuvad Lisas 2.

Tabel 2. Töös kasutatud ja konstrueeritud plasmiidid ning muteerimispraimerid. Halli taustaga on tähistatud muudetava aminohappe koodon, alla on joonitud nukleotiidid, mis tähistavad mutatsiooni asukohta praimeris järjekorras.

Plasmiid	Praimer	Praimeri järjestus	Viide
pURI3	-	-	Rivas <i>et al.</i> , 2007
pURI3- <i>lsc3</i>	-	-	Visnapuu <i>et al.</i> , 2011
pURI3- <i>lsc3</i> D333A	D333A Fw	5'-GGGCCAGCGGGGGTGTACGG-3'	Käesolev töö
pURI3- <i>lsc3</i> D333N	D333N Fw	5'-GGGCCA <u>AAC</u> GGGGTGTACGG-3'	Käesolev töö
pURI3- <i>lsc3</i> F381A	F381A Fw	5'-TAACTTCG <u>GCC</u> ATCGACAGCG-3'	Käesolev töö
pURI3- <i>lsc3</i> F381N	F381N Fw	5'-TAACTTCG <u>AAC</u> ATCGACAGCG-3'	Käesolev töö
pURI3- <i>lsc3</i> V385A	V385A Fw	5'-ACAGCG <u>GCG</u> CCCACCACAGG-3'	Käesolev töö

Megapraimer ehk mutatsiooni sisaldav PCR-i fragment sünteesiti kasutades muteerimispraimereid D333A Fw, D333N Fw, F381A Fw, F381N Fw või V385A Fw (vt Tabel 2) ning vastasahela sünteesiks Ampsaba (5'-CTGAGATAGGTGCCTCAC-3'). PCR-i segus kasutati matriitisina pURI3-*lsc3* plasmidi (Visnapuu *et al.*, 2011) ning reaktsiooni tehti vigu parandava aktiivsusega *Pfu* polümeraasiga (Thermo Scientific, USA). PCR-i segu komponente lisati järgnevate lõppkontsentratsioonidega: *Pfu* polümeraasi 0,025 U, dNTP 0,2 mM, mõlemat praimerit 0,5 pmol/μl ning polümeraasile vastavaid puhvrikomponente. Reaktsiooni sünteesiaeg oli 2 korda pikem kui tavalisel PCR-il. PCR-i produktid (vastavalt 461, 319 ja 304 ap) lahutati elektroforeesiga 1% agarosgeelis (sisaldas 0,35 μg/ml etiidiumbromiidi) 0,5x TAE puhvis (40 mM Tris-atsetaatpuhver, 1 mM EDTA; pH 8,2) toatemperatuuril pingel 10 V/cm. Produktide suuruste kindlakstegemiseks kasutati GeneRuler™ 1 kb DNA markerit (Thermo Scientific, USA). PCR-i produktid puhastati agarosgeelist MoBio (USA) Ultra Clean™ 15 komplektiga. Saadud mutantset *lsc3* geeni fragmenti kasutati järgmises etapis megapraimerina (vt selgitavat joonist Lisa 2 paneel 1).

Megapraimeri pikendamiseks kasutati matriitsina taas pURI3-*lsc3* konstrukti ning *Pfu* polümeraasi (Lisa 2 paneel 2). Polümeraasi lisati 0,05 U/μl (lõppknts.) ning nukleotiide 0,1 mM (lõppknts.). Programm oli järgmine: 96°C 2 min, 62°C 2 min, 66°C 2 min, 68°C 5 min ning tsükli korrati 20 korda. Segu töödeldi *DpnI* restriktasiga (lõppkontsentratsioon 0,2 U/μl; Thermo Scientific, USA), et vabaneda metüleeritud matriits-DNA-st, ning inkubeeriti temperatuuril 37°C üleöö. Ensüüm inaktiveeriti 20 min jooksul kuumutamiseks 80°C.

Järgnev PCR-i reaktsioon viidi läbi praimeripaariga Lsc3pURI3 Fw (5'-CATCATGGTGACGATGACGATAAGATGTACAATAGCAACTCTGCTGTAA-3') ja Lsc3pURI3 Rev (5'-AAGCTTAGTTAGCTATTATGCGTAGTTCTTCAGGTATGGGAA CGGCGTG-3'), et paljundada muteeritud *lsc3* fragmenti. Vastavad praimerid on umbes kaks korda pikemad kui tavaliselt, sest need on osaliselt komplementaarsed *lsc3* geeni järjestusega (kaldkirjas) ja osaliselt pURI3 vektoriga (alla joonitud). Inserdi viimist pURI3 vektorisse on skemaatiliselt näidatud Lisas 2 (paneel 3). Rasvases kirjas on märgitud Lsc3 valgu startkoodon. Produkti olemasolu ja pikkust (1369 ap) kontrolliti 1% agarosgeelil ning see puhastati geelist MoBio (USA) Ultra Clean™ 15 komplektiga.

Järgnevalt kloneeriti mutantne *lsc3* geen, mille mõlemas otsas olid 24-25 ap vektoriga komplementaarsed järjestused, pURI3 vektorisse (Lisa 2 paneel 3). Selleks pikendati eelnevalt saadud PCR-i fragmenti pURI3 matriitsil. Selle tulemusena saadi pikad lineaarsed üheaahelalise DNA ahelad, mille ühes otsas asub *lsc3* geen, millele järgneb plasmidijärjestus. Kuna need kaks fragmenti on omavahel komplementaarsed, siis need moodustavad seondudes

rakus plasmidi, mille mõlemas ahelas on üks katke, mille põhjustab üleulatuv osa või puudujääv lõik (vt Lisa 2 paneel 4). Katked parandatakse hiljem bakteri ensüümide abil. Segu töödeldi üleöö *DpnI* restriктаasiga, et lagundada metüleeritud DNA (pURI3), restriктаas inaktiveeriti ja DNA puhastati MoBio (USA) Ultra Clean™ 15 komplektiga vastavalt tootjapoolsetele soovitudele. Puhastatud DNA-le lisati restriктаas *NotI* (lõppkonts. 0,2 U/μl; Thermo Scientific, USA), mis lõikab ainult ilma inserdita pURI3 vektorit (Lisa 2 paneel 4). *NotI* restriктаasiga töötlus tehti O puhvril 3 h temperatuuril 37°C. Need töötused tagavad selle, et transformeeritavas DNA-s poleks tühje vektoreid, mis vähendaksid inserdiga vektoreid kandvate transformantide arvu.

2.2.3 DNA transformatsioon, plasmidi eraldamine ja mutatsiooni kontrollimine

Bakterirakkude transformatsiooniks ettevalmistamiseks kasvatati neid Luria-Bertani (LB) vedelsöötmes kuni optilise tiheduseni OD₆₀₀ 0,4 ning pesti 3 korda steriilse 15% glütserooliga, et vabaneda sooladest. Rakud suspendeeriti 50 μl 15% glütseroolis (Elmi, 2011). Mutantseid *lsc3* geene kandvad plasmiidid viidi *E. coli* DH5α tüvesse elektroporatsiooniga (Sharma ja Schimke, 1996) pingel 2,5 kV (GenePulser Xcell™; BIO-RAD, USA). Seejärel kasvatati bakterirakke 1 h 1 ml LB vedelsöötmes 37°C loksutil ning plaaditi ampitsilliini (0,15 mg/ml) sisaldavale selektiivsöötmele. Üleöö 37°C termostaadis kasvanud transformantide kolooniad külvati ümber Amp tardsöötmele. Igas ümberkülvatud koloonias kontrolliti *lsc3* geeni olemasolu PCR-iga, kus kasutati praimereid T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') ja Lsc1ja3Rev1 (5'-TGCGCTTCGGTTTGATA ATAGG-3').

Sobivad kolooniad, mis sisaldasid *lsc3* geeni, külvati edasi 5 ml LB Amp vedelsöötmesse. Üleöö temperatuuril 37°C aereeritud (180 rpm) rakkudest eraldati plasmiidne DNA, kasutades FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit-i (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) ning kontrolliti plasmidi olemasolu 1% agarosgeelil (vt pt 2.2.2).

Mutatsiooni olemasolu ja olemust kontrolliti *lsc3* geeni sekveneerimisega. Sekveneerimisreaktsiooni segud valmistati BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-iga (Applied Biosystems, Kanada) vastavalt tootjapoolsele protokollile, kuid ~10 x vähendatud ensüümikogusega ning sekveneerimine toimus Applied Biosystems'i (Kanada) sekvenaatoriga (TÜMRI teenused). Saadi plasmiidid: pURI3-lsc3D333A, pURI3-lsc3D333N, pURI3-lsc3F381A, pURI3-lsc3F381N ja pURI3-lsc3V385A (Tabel 2).

2.2.4 Levaansukraaside heteroloogiline ekspressioon ja rakuekstraktide tegemine

Metsiktüüpi ja mutatsiooni sisaldava *lsc3* geeniga plasmiidid viidi elektroporatsiooniga *E. coli* BL21(DE3) tüvesse (vt 2.2.3) ning rakud plaaditi LB Amp söötmele. Transformantide rakke kasvatati 5 ml LB Amp vedelsöötmes 37°C loksutil üleöö. Kultuur külvasi 200 ml LB Amp vedelsöötmesse algtihedusega OD₆₀₀ 0,05 ning kasvatati 37°C loksutil kuni optilise tiheduse väärtus jäi vahemikku 0,4-0,6.

Valguekspressioon indutseeriti IPTG-ga (isopropüül β-D-1-tiogalaktopüranosiid; lõppkonts. 0,5 mM) ning rakke kasvatati üleöö (~20 h) temperatuuril 22°C (Visnapuu *et al.*, 2011). Rakud koguti tsentrifuugimisega (2400*g; 20 min; 4°C) ning pesti 50 mM kaaliumfosfaatpuhvriga (pH 7). Rakke säilitati temperatuuril -20°C kuni rakuekstraktide tegemise ja valgu puhastamiseni.

Rakulüsaatide tegemiseks suspendeeriti külmutatud rakud sonikeerimispuhvris A (10 mM imidasool, 10% glütserool, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl; pH 6,0) külmutati neid 3 korda vedelas lämmastikus ning sulatati ning seejärel purustati rakke veelgi sonikeerimisega. Segu tsentrifuugimisel (2400*g; 20 min; 4°C) saadud supernatanti kasutati rakulüsaadina edasistes katsetes. DNA lagudamiseks lisati ligi 10 ml-le lüsaadile DNaseI (5 U/μl; Thermo Scientific, USA) ja inkubeeriti üleöö temperatuuril 4°C. Järgmisel päeval rakulüsaat tsentrifuugiti ja filtreeriti läbi 0,45 μm poorisuurusega filtri (Minisart[®], Sartorius Stedim Biotech GmbH, Saksamaa).

2.2.5 Valkude puhastamine ja valgu geelelektroforees

Lsc3 valgud puhastati rakulüsaatidest Ni²⁺-afiinsuskromatograafiaga vastavalt varem kirjeldatud meetodikale (Visnapuu *et al.*, 2011). Selleks kasutati ÄKTAprime plus kromatograafi, ning 1 ml Ni²⁺-afiinsuskromatograafiakolonne (HisTrap[™] FF, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi). Kõik mutantsed valgud puhastati erinevate kolonnidega, et vältida ristsaastet.

Rakulüsaat kanti kolonnile puhvris A (vt koostist alapunktist 2.2.4) ning valgu kolonnist elueerimiseks kasutati kõrgema imidasooli sisaldusega elueerimispuhvrit B (500 mM imidasool, 10% glütserool, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl; pH 6,0). Valkude puhastamiseks kasutati ÄKTAprime plus masina tootjapoolset eelseadistatud programmi *Affinity Purification any HiTrap*. Fraktsioone analüüsiti denatureeriva

polüakrüülamiidgeelektrofooresiga (SDS-PAGE) 10% geelil (Sambrook ja Russell, 2001) ning pingel 14 V/cm ja selle alusel valiti välja puhast Lsc3 valku sisaldavad fraktsioonid. Geel värviti Coomassie Brilliant Blue G250'ga ning ensüümi suurust võrreldi PageRuler™ SM0671 valgumarkeriga (Thermo Scientific, USA). Puhast valku sisaldavad proovid koguti ja dialüüsiti SERVAPOR® membraanis (M_w cutoff 12-14 kDa; SERVA Electrophoresis GmbH, Saksamaa) McIlvaine'i puhvris (pH 6,0 + 0,02% Na-asiid) (McIlvaine, 1921), temperatuuril 4°C. Puhvrit vahetati 48 h jooksul 3 korda.

Pärast dialüüsi valgud kontsentreeriti Amicon® Ultra (M_w cutoff 10 kDa, Millipore, Iirimaa) tsentrifuugimifiltritega (2400*g; 20 min; 4°C). Valgu kontsentratsioon puhastatud Lsc3 preparaadis arvutati OD₂₈₀ väärtuste, mis mõõdeti Tecan Infinite M200 Pro™ mikroplaadilugejaga (Tecan Group Ltd., Šveits), kasutades programmi Tecan i-control™ versiooni 1.7 (Tecan Group Ltd.), ja ekstinktsioonikoefitsendi abil. Kontsentratsioon arvutati valemiga C (mg/ml) = OD₂₈₀/(ϵ *L). Ekstinktsioonikoefitsient on 1,665 g/l ning teepikkus 0,05 cm. Ekstinktsioonikoefitsient arvutati ExpASY Proteoomika Serveris (Gasteiger *et al.*, 2005; <http://web.expasy.org/protparam/>).

2.2.6 Levaansukraasi aktiivsuste määramine

Levaansukraasi Lsc3 mutantide koguaktiivsused mõõdeti McIlvaine'i puhvris (pH 6,0), kasutades substraadina sahharoosi või rafinoosi. Lsc3 sahharoosi kasutamise kineetika parameetrid määrati ensümaatilise Glucose Liquicolor reaktiiviga (Human GmbH, Saksamaa) eelnevalt väljatöötatud meetodiga (Visnapuu *et al.*, 2008) reaktsiooni käigus eraldunud glükoosi hulga järgi mg valgu kohta minutis ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ ehk U/mg). Reaktsioon viidi läbi erinevatel sahharoosi kontsentratsioonidel (vahemikus 10-400 mM) temperatuuril 37°C. Sõltuvalt mutantse valgu aktiivsusest valiti reaktsioonideks sobivad valgu kogused ja ajapunktid. Afiinsus (K_m ; mM) ja maksimaalne reaktsioonikiirus (V_{max} ; U/mg) sahharoosile arvutati algkiiruste kaudu vastavalt Michaelis-Menteni võrrandile programmi SigmaPlot 2001 (SYSTAT, USA) ensüümkinetika lisamooduliga (Enzyme Kinetics Module 1.1). Levaansukraasi katalüütiline konstant k_{cat} (1/s) arvutati V_{max} -i ja valgu molekulmassi, mis leiti ExpASY Proteoomika Serveri abil (Gasteiger *et al.*, 2005; http://expasy.org/tools/pi_tool.html). Valgu katalüüsi efektiivsus leiti k_{cat}/K_m (1/M*s) vastavate väärtuste jagatisena.

Ensüümide koguaktiivsus ja afiinsus rafinoosile määrati redutseerivate suhkrute moodustumise kiiruse järgi substraadi erinevatel kontsentratsioonidel. Redutseerivate

suhkrute kontsentratsiooni reaktsioonisegus mõõdeti spektrofotomeetriselt, kasutades 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNS) reaktiivi (Miller, 1959). Algkiiruste analüüsiks kasutati programmi SigmaPlot 2001 abil (vt eestpoolt). Redutseerivate suhkrute moodustumise kiiruste järgi 400 mM rafinoosist ja sahharoosist arvatati rafinoosi ja sahharoosi kasutamise suhe, mida väljendati protsendina. Mutantide transfruktosüüliva aktiivsuse (TA) määramiseks ning lühemate reaktsiooniproductide analüüsiks inkubeeriti 2,7 U/ml valku 1200 mM sahharoosiga temperatuuril 37°C 20 h. Reaktsioon lõpetati proovide kuumutamiseega 96°C 5 min.

Reaktsiooniproductide analüüs viidi läbi kõrgefektiivsuse vedelikkromatograafiaga. Mõõtmised tegi Heiki Vija (Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, Tallinn). Detailne meetodika on välja toodud Lisas 4.

Levaani tekke kineetikat määrati mikrotiiterplaadil (CELLSTAR[®], Greiner Bio-One GmbH, Saksamaa). Reaktsioon toimus McIlvaine'i puhvris (lõppmaht 200 µl), kus reaktsioonisegu sisaldas 2 µg valku ja 300 mM või 1200 mM sahharoosi. Tekkinud levaani hulka hinnati reaktsioonisegu hägusususe järgi lainepikkusel 400 nm (Visnapuu *et al.*, 2011). Proove inkubeeriti temperatuuril 30°C Tecan Infinite M200 Pro[™] mikroplaadilugejas (Tecan Group Ltd., Šveits) 20 tundi ning hägusust mõõdeti iga 30 min järel. Andmed koguti programmiga Tecan i-control[™] 1.7 (Tecan Group Ltd.). Levaani kontsentratsioon (mg/ml) leiti kaliibergraafikult, mis koostati puhastatud levaani kindla kontsentratsiooniga lahuste optiliste tiheduste alusel. Arvutamiseks kasutati valemit $C \text{ (mg/ml)} = OD_{400} * 18,3$.

2.2.7 Arvutipõhised meetodid: valgujärjestuste otsimine andmebaasidest ja joondamine. Valgustruktuuride andmebaas, struktuuride visualiseerimine ja analüüs.

Levaansukraasi geeni olemasolu kontrollimiseks, muteerimiseks ning kloneerimiseks kasutatavate praimerite valimiseks ja plasmiidide visualiseerimiseks kasutati programmi pDRAW32 ver. 1.1.107 (<http://www.acaclone.com/>). Mutatsioonide asukoha kindlakstegemisel võrreldi omavahel sekveneeritud *lsc3* geeni ja algse geeni nukleotiidseid järjestusi programmiga BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999). Valkude aminohappeliste järjestuste joondused tehti sama programmi tööriistaga ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Levaansukraasi valgu Lsc3 järjestus joondati 12 erineva mikroorganismi levaansukraaside järjestustega (Lisa 3). Valkude järjestused võeti UniProtKB (The UniProt Consortium, 2012; www.uniprot.org) andmebaasist.

Ensüümide molekulmassid ja Lsc3 ekstinktsioonikoefitsient arvutati ExPASy Proteoomika Serveris (Gasteiger *et al.*, 2005; http://expasy.org/tools/pi_tool.html).

Z. mobilis'e ennustatud mudeli modelleeris K. Mardo ModBase serveris (<http://modbase.compbio.ucsf.edu>) *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi LsdA (PDB ID: 1w18) struktuuri baasil. Kahe valguga identsus modelleeritud alal oli 44%. Valgumodelite ruumilise struktuuri ja uuritavate aminohapete paiknemise visualiseerimiseks kasutati programmi PyMOL 1.3 (DeLano, 2002).

Valkude kristallstruktuuride andmed saadi PDB andmekogust (<http://www.pdb.org>; Berman *et al.*, 2003) ning visualiseeriti programmiga PyMOL 1.3.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Levaansukraaside valgujärjestuste joondamine ja sarnasuse hindamine

Erinevate mikroorganismide levaansukraaside valgujärjestused joondati ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) programmiga (vt 2.2.8.). Valikusse võeti kaksteist valku. Nende hulgas oli grampositiivsete bakterite (batsillid ja *Arthrobacter* sp. K-1), arhede (*Halalkalicoccus jeotgali* ja *Haloarcula marismortui*) ja gramnegatiivsete bakterite levaansukraase (ülejäänud kuus valku). Valkude täispikk joondus on esitatud töö Lisas 3 ja väljavõtted joondusest Joonistel 4 ja 6. Viimastel on tähistatud ära positsioonid *Z. mobilis*'e ja *Bacillus subtilis*'e levaansukraasides, millest lähtudes konstrueeriti selle töö jaoks Lsc3 valgu mutandid ning valiti vastavad positsioonid Lsc3 valgus. Tabelis 3 on esitatud 12 levaansukraasi aminohappelise järjestuse joonduse alusel väljaarvutatud identsuse määrad.

Tabel 3. Erinevate bakterite levaansukraaside* järjestuste omavaheline identsus (%).

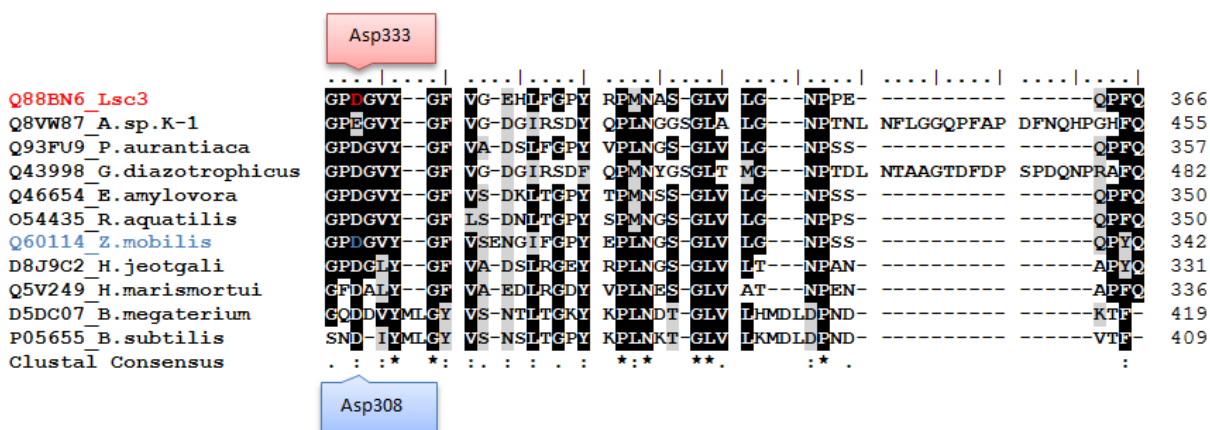
	<i>P. syringae</i> Lsc3	<i>A. sp.K-1</i>	<i>P. aurantiaca</i>	<i>G. diazotrophicus</i>	<i>E. amylovora</i>	<i>R. aquatilis</i>	<i>Z. mobilis</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>H. jeotgali</i>	<i>H. marismortui</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>P. syringae</i> Lsc3	100	42	73	42	77	78	50	43	34	31	25	25
<i>A. sp. K-1</i>		100	41	50	45	44	43	35	33	31	23	22
<i>P. aurantiaca</i>			100	41	72	73	49	45	37	34	26	25
<i>G. diazotrophicus</i>				100	43	41	43	38	32	28	21	22
<i>E. amylovora</i>					100	77	51	47	36	32	27	27
<i>R. aquatilis</i>						100	51	46	35	33	26	28
<i>Z. mobilis</i>							100	58	35	30	25	25
<i>G. oxydans</i>								100	31	28	24	23
<i>H. jeotgali</i>									100	60	23	23
<i>H. marismortui</i>										100	23	22
<i>B. megaterium</i>											100	73
<i>B. subtilis</i>												100

*Bakterid ja nende levaansukraasid. Sulgudes on näidatud vastava valgu nimetus ja tunnusnumber UniProt andmebaasis (The UniProt Consortium, 2012). *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Lsc3; Q88BN6); *Arthrobacter* sp.K-1 (Q8VW87); *Pseudomonas aurantiaca* (Q93FU9); *Gluconacetobacter diazotrophicus* (LsdA; Q43998); *Erwinia amylovora* (Q46654); *Rahnella aquatilis* (O54435); *Zymomonas mobilis* (LevU; Q60114); *Gluconobacter oxydans* (Q5FSK0); *Halalkalicoccus jeotgali* (D8J9C2); *Haloarcula marismortui* (Q5V249); *Bacillus megaterium* (SacB; D5DC07); *Bacillus subtilis* (SacB; P05655).

Tabel 3 näitab, et enim sarnanevad üksteisega gramreaktiivsuselt samasuguste bakterite levaansukraasid. Samuti on arhede levaansukraasid omavahel 2-3 korda sarnasemad kui need on teiste bakterite levaansukraasidele. Seetõttu võiks arhede levaansukraasidel olla erilisi omadusi. Kahjuks ei ole seni veel ühegi arhe levaansukraasi puhastatud ega iseloomustatud. Üldiselt jääb tabelis toodud levaansukraaside omavahelise identsuse määr alla 50%. Suurim (77-78%) oli see on gramnegatiivsete bakterite *P. syringae* pv. tomato, *R. aquatilis*'e ja *E. amylovora* levaansukraasidel. Kõik kolm nimetatud bakterit on patogeensed: *P. syringae* ja *E. amylovora* on taimepatogeendid, *R. aquatilis* on aga patoogeenne loomadele ning ohtlik ka inimesele (Matsukura *et al.*, 1996). Batsillide (*B. subtilis* ja *B. megaterium*) levaansukraasid on omavahel järjestuselt 73% identsed. Mõlemat valku on struktuur-funktsioon analüüsiks muteeritud ning neil on lahendatud ka kristallstruktuurid (Meng ja Fütterer 2003, 2008; Homann *et al.*, 2007).

2.3.2 Aminohapete väljavalimine Lsc3 valgus nende suunatud asendamiseks

Asp333 (Joonis 4) valiti asendamiseks välja kirjanduse andmete analüüsi ja levaansukraaside joondamise alusel. Asp308 (homoloogne Lsc3 Asp333-ga; Joonis 4) muteerimine *Z. mobilis*'e levaansukraasis asparagiiniks (Asn) tõi kaasa olulisi muutusi katalüüsis. Mutandil Asp308Asn oli langenud transfruktosüüliv aktiivsus, afiinsus sahharoosile ja rafinoosi kasutamise võime (Yanase *et al.*, 2002).

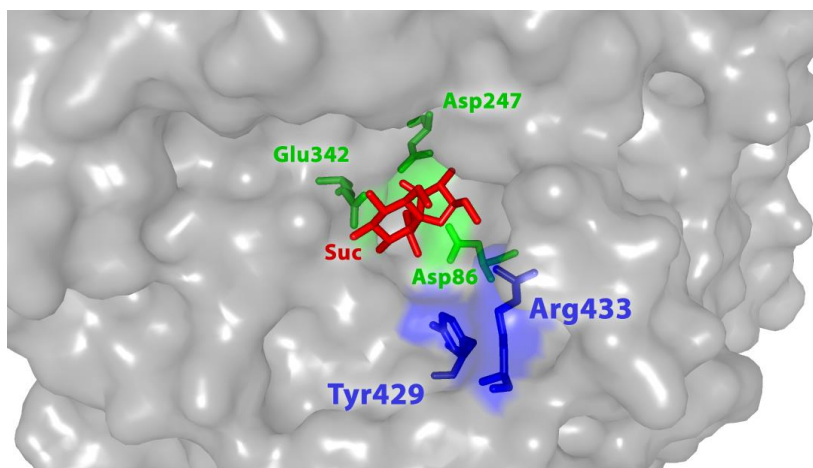


Joonis 4. Asp333 paiknemine Lsc3 valgus (Q88BN6) järjestuses. Valgud joondati programmiga Clustal W. Identsus Lsc3 valguga on näidatud mustal taustal, sarnasus hallil taustal. Yanase *et al.* (2002) töös muteeritud Asp308 *Zymomonas mobilis*'e LevU valgus (Q60114) on samuti joonisel näidatud. Valkude tähistused on esitatud Tabeli 3 jaluses.

Positsioon Asp308 muteerimiseks valiti välja kui üks levaansukraaside konserveerunud piirkondades asuvatest happelistest aminohapetest, millele ennustati funktsiooni katalüüsis. Oletati, et Asp308 võiks kuuluda substraadi seostumistasku +1 või +2 alampiirkonda ja

SacB mutantidel Tyr429Asn ja Arg433Ala kadus võime sünteesida polümeerset levaani – nad suutsid sünteesida vaid fruktooligosahhariide. Ka oli nende afiinsus sahharoosile ja k_{cat} alanenud, eriti tugevalt väljendus see mutandil Tyr429Asn (Ortiz-Soto *et al.*, 2008).

B. subtilis'e levaasukraas SacB on kristalliseeritud nii koos substraadiga (sahharoos, rafinoos) kui ka ilma (Meng ja Fütterer, 2003, 2008). Et näidata Tyr429 ja Arg433 paiknemist SacB 3D struktuuris, visualiseeriti PDB andmebaasist (<http://www.pdb.org>; Berman *et al.*, 2003) võetud sahharoosiga seotud SacB struktuur (PDB ID: 1PT2; Joonis 7).



Joonis 7. *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB aktiivtsenter. Sinise värviga on märgitud Tyr429 ja Arg433. Sahharoosi molekul aktiivtsentris on näidatud punaselt, katalüütilise kolmiku aminohapped roheliselt. Joonise tegemisel kasutati SacB kristallstruktuuri koordinaate (PDB ID: 1PT2; Meng ja Fütterer, 2003). Visualiseerimine toimus programmiga PyMOL 1.3 (DeLano, 2002).

2.3.3. Mutantsete Lsc3 valkude süntees, puhastamine ja iseloomustamine

Mutantsete valkude sünteesi võimaldavad geenikonstruktid tehti suunatud mutageneesil megapraimeri meetodil ja kloneeriti pURI3 plasmidi ligeerimisvaba meetodit kasutades (meetodi kirjeldus on esitatud skeemina Lisas 2; de la Rivas *et al.*, 2007). Seejärel viidi mutantseid *lsc3* geene sisaldavad konstruktid *E. coli* BL21(DE3) tüve kompetentsetesse rakkudesse ning levaansukraasi ekspressioon indutseeriti IPTG-ga. Täpne meetodika on esitatud peatükis 2.2. Levaansukraase ekspresseerivatest *E. coli* rakkudest tehti lüsaat ning mutantsed valgud puhastati rakuekstraktist Ni^{2+} -afiinsuskromatograafiaga (pt 2.2.4 ja 2.2.5).

Mutantsete Lsc3 valkude kineetilised parameetrid

Sahharoosi kasutamise kineetikat levaansukraasidel mõõdeti glükoosi vabanemise kiiruse järgi, kasutades selleks Glucose Liquicolor reaktiivi. Reaktsioon viidi läbi sahharoosi erinevatel kontsentratsioonidel (10 mM – 400 mM) ja reaktsioonide algkiirusi analüüsiti programmi SigmaPlot ensüümikineetika mooduliga, et arvutada välja K_m ja V_{max} sahharoosi lõhustamiseks. Lisaks arvutati välja ka ensüümide katalüütiline konstant k_{cat} (1/s) ja katalüütiline efektiivsus (k_{cat}/k_m , 1/mM*s). Kuna trisahhariid rafinoosilt fruktoosijäägi eemaldamisel vabaneb produktina melibioos (α -D-Galp-(1→6)- α -D-Glcp), siis ei saa rafinoosi lõhustamisel kasutada Glucose Liquicolor reaktiivi. Levaansukraaside afiinsust rafinoosile mõõdeti redutseerivate suhkrute (fruktoos ja melibioos) tekke kiiruse järgi rafinoosist. Reaktsioon viidi läbi rafinoosi erinevatel kontsentratsioonidel (10 mM – 400 mM) ning K_m arvutati reaktsiooni algkiiruste järgi SigmaPlot programmi ensüümikineetika mooduliga (vt peatükk 2.2.6). Kuna sooviti teada, kas mutantidel võiks olla muutunud sahharoosi ja rafinoosi kasutamise eelistus, mõõdeti redutseerivate suhkrute moodustumise algkiirusi 400 mM sahharoosist ja 400 mM rafinoosist, mis on muteerimata valgu jaoks küllastavad kontsentratsioonid. Muteerimata Lsc3 valk eelistab sahharoosi rafinoosile, tema vastav rafinoosi ja sahharoosi kasutamise algkiiruste suhe on ~0,48 (~48%) ehk ta kasutab rafinoosi ligikaudu poole halvemini kui sahharoosi. Seda näitajat on nimetatud rafinoosi ja sahharoosi kasutamise suhteks (Yanase *et al.*, 2002; Visnapuu *et al.*, 2008). Mutantsete valkude vastavate väärtuste mõõtmiste tulemused on võetud kokku Tabelis 4.

Tabel 4. Lsc3 mutantide kineetilised parameetrid sahharoosi ja rafinoosi kasutamisel.

Valk	Substraadiks sahharoos, mõõdetud glükoosi tekke järgi				Mõõdetud redutseeriva suhkru tekke järgi	
	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/k_m (1/mM*s)	K_m (mM) rafinoosile	Raf/Sah ^a kasutamise suhe (%)
WT (muteerimata) ^b	18,5±2,5	610,5±82,0	504,4	27,3	44,8±3,4	47,8±4,1
Asp333Ala	27,0±2,9	148,9±3,7	122,9	4,6	134,9±15,4	37,3±1,4
Asp333Asn	41,3±4,2	574,7±16,4	474,8	11,5	178,0±13,1	55,6±1,9
Phe381Ala	14,3±1,8	11,1±0,3	9,2	0,6	486,3±122,9	51,0±4,1
Phe381Asn	27,7±2,2	3,7±0,06	3,1	0,1	65,3±4,0	104,9±24,1
Val385Ala	39,4±2,3	506,9±8,5	418,6	10,6	53,6±8,1	19,0±1,3

^a Raf, rafinoos; Sah, sahharoos. Mõõdeti 400 mM rafinoosi ja 400 mM sahharoosi kasutamise algkiirusi ja arvutati välja nende suhe.

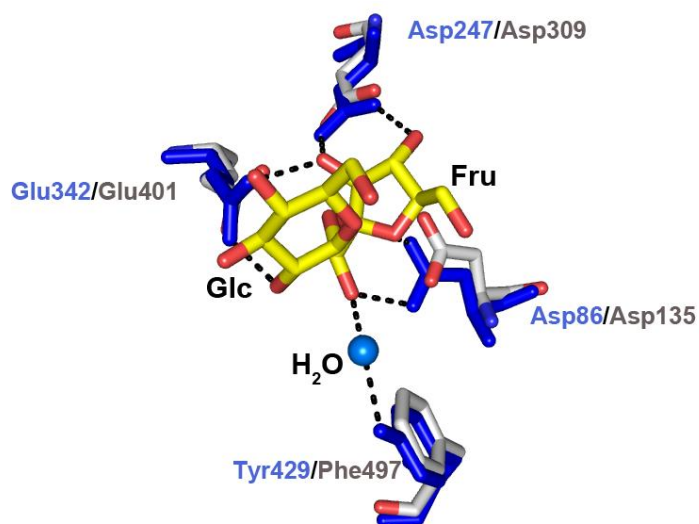
^b Muteerimata Lsc3 kineetilised näitajad määras T. Visnapuu.

Tabelist 4 ilmneb, et kaks Asp333 positsiooni mutanti on üsna erinevad. Asp333Ala mutandil oli sahharoosi lõhustamise katalüütiline konstant (k_{cat}) langenud 4 korda, samas mutandil

Asp333Asn langes k_{cat} väärtus väga vähe. Asp kui ka Asn on sarnased polaarsed aminohapped (Lisa 5). Asp asendamine Asn-ga ei mõjuta kirjanduse andmetel oluliselt ekstratsellulaarseid valke, samas Asp asendamine mittepolaarsealaniiniga on mõõduka negatiivse mõjuga (Betts ja Russell, 2003). *Z. mobilis*'e levaansukraasi Asp308Asn mutant kasutas rafinoosi tunduvalt halvemini kui muteerimata valk. Rafinoosi kasutamise kiirus oli tal 69% sahharoosi kasutamise kiirusest. Samas muteerimata valk eelistas rafinoosi sahharoosile, tema vastav väärtus oli 117% (Yanase *et al.*, 2002). Seega võiks Asp308 olla oluline rafinoosi kasutamisel substraadina. Lsc3 valk on *Z. mobilis*'e levaansukraasist substraadispetsiifikalt erinev, ta eelistab sahharoosi rafinoosile. Lsc3 mutandil Asp333Asn oli afiinsus rafinoosile alanenud rohkem kui sahharoosile (Tabel 4), kuid see ei kajastunud märkimisväärselt tema substraadieelistuses.

Positsiooni Phe381 mutandid olid väga väikese katalüütilise aktiivsusega, sahharoosi lõhustamise kiirus oli neil vastavalt 56 (Phe381Ala) ja 163 (Phe381Asn) korda vähenenud võrreldes muteerimata valguga. Afiinsustes sahharoosile märkimisväärsed erinevusi muteerimata valgust aga ei leitud. Phe381-le vastavas positsioonis on levaansukraasides enamasti fenüülalaniin (Lisa 3), vaid *B. subtilis*'e ja *B. megaterium*'i (grampositiivsed bakterid) levaansukraasides on seal türosiin, vastavalt Tyr429 ja Tyr439 (Joonis 6). SacB mutandil Tyr429Asn oli k_{cat} alanenud ~27 korda ja afiinsus sahharoosile ~40 korda. Mutandi afiinsuse kohta rafinoosile Ortiz-Soto *et al.* (2008) andmeid ei esitanud, kuid töös on kirjas, et Tyr429Asn mutant suutis rafinoosi vaid hüdrolüüsida, kuid mitte polümeriseerida. Meie tulemused näitavad, et Lsc3 mutandil oli muutunud substraadieelistus – ta kasutas rafinoosi paremini kui sahharoosi, kuigi mõlema substraadi kasutamise efektiivsus oli madal.

Ortiz-Soto *et al.* (2008) arvavad, et *B. subtilis*'e levaansukraasis võib Tyr429 osaleda sahharoosi paigutamisel aktiivtsentri +1 piirkonda. Veemolekuli vahendusel võib Tyr429 vesiniksidemetega seostuda Arg360-ga, mis on ülioluline aminohape SacB valgu polümeriseerimisreaktsioonis (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Samamoodi võib Tyr429 vee molekuli kaudu koordineerida ka sahharoosi seostumist ensüümiga (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Kuna fenüülalaniin (Phe381 Lsc3 valgus) ei osale vesiniksidemete moodustamises, siis ei saa ta koordineerida substraadi seostumist aktiivtsentrisse samamoodi nagu Tyr429 SacB valgus. *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi struktuuri uurimine näitas, et valgu kristallstruktuuri mudelil paigutub Phe497 (vastab Phe381 positsioonile Lsc3-s) ligikaudu samasse piirkonda nagu Tyr429 SacB valgus (Joonis 8).



Joonis 8. *B. subtilis*'e SacB aktiivtsenter (PDB ID: 1PT2; Meng ja Fütterer, 2003), millega on kohakuti pandud *G. diazotrophicus*'e LsdA (PDB ID: 1W18; Martinez-Fleites *et al.*, 2005) aktiivtsenter. Siniselt on märgitud SacB aminohapped (Asp86, Asp247, Glu342 ja Tyr429). Halliga on tähistatud LsdA aminohapped (Asp135, Asp309, Glu401 ja Phe497). Märgitud on ka veemolekul, mille kaudu saab Tyr429 moodustada vesiniksideme -1 alampiirkonnas asuvaga fruktoosijäägiga. Mudelid visualiseeris K. Mardo.

Oletame, et Phe381 võib osaleda valgu aktiivtsentri struktuuri hoidmises tänu tema hüdrofoobsetele interaktsioonidele teiste aminohapetega, näiteks fenüülalaniini ja trüptofaaniga. GH32 perekonna valkudel ja ka levaansukraasidel on näidatud, et substraadi seostumistasku ümbruses on neil nn aromaadne hüdrofoobne rõngas, mille moodustavad peamiselt trüptofaani ja fenüülalaniini jäägid. Arvatakse, et see hüdrofoobne tsoon võiks olla vajalik substraaditasku piiritlemiseks ja substraadi koordineerimises taskus. See on omakorda ülioluline ka ensüümi poolt katalüüsitavaks reaktsiooniks. On näidatud, et *B. subtilis*'e levaansukraasis osaleb Phe182 hüdrofoobse interaktsiooni kaudu Trp163 positsioneerimises (Lammens *et al.*, 2009; vaata Trp163 paiknemist aktiivtsentri äärel Jooniselt 3). Nimetatud trüptofaan on väga oluline valgu katalüütiliseks aktiivsuseks. Näiteks Trp163-le vastava positsiooni (Trp118) asendamine *Z. mobilis*'e levaansukraasis hüdrofiilse aminohappe asparagiiniga (vt ka Lisa 5) tõi kaasa sahharoosi lõhustamise ja transfruktosüüliva aktiivsuse tohtu languse (Li *et al.*, 2011).

Lsc3 mutandil Phe381Ala oli fenotüüp mõnevõrra vähem muutunud kui mutandil Phe381Asn. See on ilmselt tingitud sellest, etalaniin nagu fenüülalaniingi on hüdrofoobne aminohape (vt Lisa 5) ja suudab mingil määral täita fenüülalaniini ülesannet Lsc3 positsioonis 381. Mutandi Phe381Ala eripäraks oli tugevasti alanenud afiinsus rafinoosile (Tabel 4).

Teadaolevalt ei ole Phe381-le homoloogset positsiooni gramnegatiivsete bakterite levaansukraasides muteeritud.

B. subtilis'e levaansukraasi mutandi Arg433Ala imiteerimiseks konstrueeritud Lsc3 mutandil Val385Ala oli afiinsus sahharoosile langenud ligi kaks korda, kuid koguaktiivsus vaid viiendiku võrra. Mutantne valk sidus rafinoosi sama edukalt kui muteerimata valk, kuid rafinoosi ja sahharoosi kasutamise suhe näitas, et kõrgel substraadi kontsentratsioonil on eelistatum substraat siiski sahharoos. Val385-le vastavas positsioonis on gramnegatiivsete bakterite, arhede ja *Arthrobacter*'i levaansukraasides kas valiin, või isoleutsiin, batsillide omades aga arginiin (Joonis 6 ja Lisa 3). Kuna arginiin on oma omadustest väga erinev valiinist ja isoleutsiinist (Lisa 5), ei saa neil nähtavasti levaansukraasides selles analüüsitavas piirkonnas samasugust funktsiooni olla.

Mutantsed Lsc3 valgud polümeriseerijatena

Levaansukraaside reaktsiooniproduktideks on nii oligomeersed fruktooligosahhariidid (FOS-id) kui ka polümeerne levaan. Mutatsioonid ensüümis võivad mõjutada produktide pikkust ja hulka. Mutantsete valkude produktide analüüsimiseks inkubeeriti ensüümi (2,7 koguaktiivsuse ühikut (U) 1 ml kohta) 1200 mM sahharoosiga temperatuuril 30°C 20 tunni jooksul. Lisaks reaktsiooniproduktide hulgale mõõdeti ka reaktsioonis kasutatamata jäänud sahharoosi kogust.

Tabel 5. Mutantsete valkudega 1200 mM sahharoosist sünteesitud fruktooligosahhariidide analüüs*.

Valk	Transfruktosüleeriv aktiivsus (%)	FOS DP [#]	FOS (g/mg valgu kohta)	Jääk-sahharoos (%)
Muteerimata	73,6 ± 0,9	3-7	15,4 ± 2,2	9,0 ± 1,5
Asp333Ala	67,9 ± 0,2	3-5	3,9 ± 0,1	9,8 ± 0,4
Asp333Asn	80,4 ± 0,3	3-7	15,4 ± 1,2	5,3 ± 0,3
Phe381Ala	59,0 ± 3,2	3-6	0,8 ± 0,01	13,8 ± 3,7
Phe381Asn	63,7 ± 0,5	3-6	0,2 ± 0,02	65,0 ± 0,5
Val385Ala	77,7 ± 0,3	3-6	9,1 ± 0,3	7,1 ± 0,1

*Kõrgefektiivse vedelikkromatograafilised (HPLC) mõõtmised tehti Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis (Tallinn). Kasutatud meetodika on toodud Lisas 4.

[#] DP, *degree of polymerization* (polümerisatsiooniate).

Transfruktosüleeriv aktiivsus (TA) arvutati välja reaktsioonisegus detekteeritud glükoosi ja fruktoosi kontsentratsioonide vahe kaudu ja see näitab kui mitu protsenti hüdrolüüsitud sahharoosi fruktoosijääkidest kasutati polümerisatsiooniks, kanti üle kas sahharoosile või kasvavale fruktaanahelale. Tabelist 5 selgub, et ühegi mutandi TA ei muutunud drastiliselt.

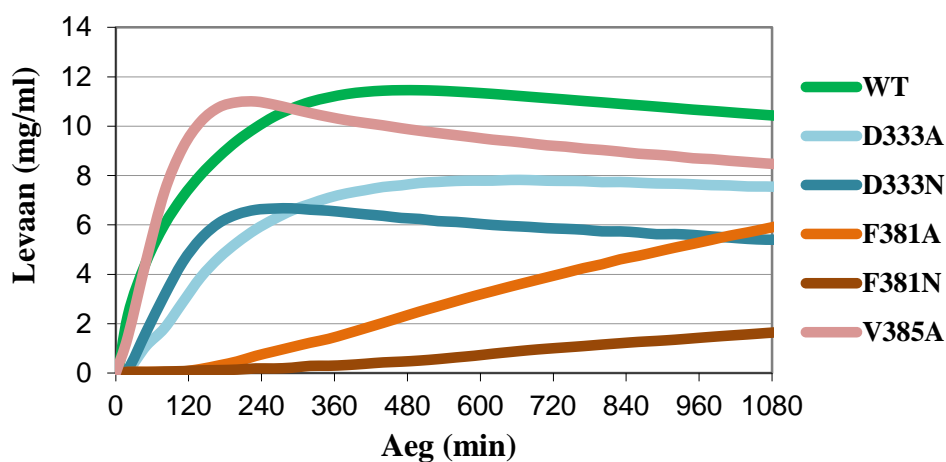
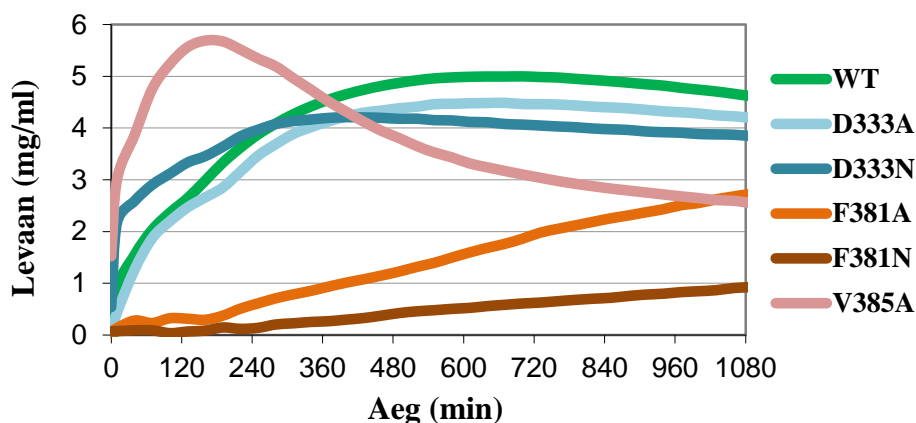
Suurim muutus oli Phe381Ala mutandil, millel TA langes muteerimata valguga võrreldes viiendiku võrra.

FOS-i DP näitab oligofruktaani ahela pikkust. Kõige lühemad transfruktosüülimisproduktid on kestoosid (DP 3), nende moodustumisel on sahharoos olnud nii fruktosüüli doonoriks kui aktseptoriks (vt Joonis 1). FOS-ide sünteesi võime ja spektri muutuse järgi eristus mutant Asp333Ala, mis sünteesis algsest valgust neli korda vähem FOS-e ja sünteesitud FOS-ide ahelapikkus oli kuni 5-ni. Samas levaani sünteesi poolest see mutant muteerimata valgust nii palju ei erinenud (Joonis 9 ja Tabel 6). Sama positsiooni mutant Asp333Asn ei erinenud sünteesitud FOS-ide spektri ja koguse poolest muteerimata valgust. Ülejäänud mutandid (Phe381Ala, Phe381Asn ja Val385Ala) sünteesisid FOS-e kuni ahelapikkuseni 6. Mutandid Phe381Ala ja Phe381Asn sünteesisid mg valgu kohta väga vähe FOS-e. Eriti väike oli toodetud FOS-i kogus mutandil Phe381Asn. Ka jättis Phe381Asn mutant suure osa sahharoosist kasutamata.

Lisaks FOS-ide moodustamisele uuriti mutantidel pika ahelaga polümeeri (levaani) sünteesi võimet. Levaani teket mõõdeti spektrofotomeetriliselt. See on võimalik tänu sellele, et tekkiv levaan on hägune ja hägususe muutumist saab mõõta neeldumise järgi. Levaani sünteesi 300 mM ja 1200 mM sahharoosist jälgiti 20 tunni jooksul temperatuuril 30°C (vt 2.2.6 ja Joonis 9).

Tulemused näitavad, et positsiooni Asp333 mutandid sünteesivad madalamal sahharoosi kontsentratsioonil (300 mM) vähem levaani kui metsiktüüpi Lsc3. 1200 mM sahharoosi puhul on erinevus väiksem, kuid siiski tekib ka siis nendel mutantidel veidi vähem levaani. Samas oli Asp333Asn mutandil TA väärtus (80,4%) isegi kõrgem kui muteerimata valgul (Tabel 5). Sellel mutandil on afiinsus sahharoosile langenud ~2 korda. 1200 mM sahharoosist sünteesib ta levaani reaktsiooni alguses kiiremini kui muteerimata valk (Joonis 9B). Praegused tulemused viitavad sellele, et positsioon Asp333 on oluline just FOS-ide sünteesiks. Kui see asendadaalaniiniga, siis on FOS-ide moodustumine häiritud, samas kui levaani süntees saab toimuda suhteliselt edukalt. Mutandil Asp333Asn kui heal polümeriseerijal võiks edaspidi levaani ja FOS-ide sünteesi põhjalikumalt uurida, kasutades suuremaid reaktsioonimahtusid ja varieerides reaktsioonitingimusi, näiteks temperatuuri. Sellel mutandil võiks uurida ka tema polümerisatsioonireaktsiooni inhibeeritavust glükoosiga.

Phe381 mutandid olid väga madala sahharoosi lõhustava aktiivsusega (Tabel 4) ning ka väga aeglased polümeriseerijad. Joonis 9 näitab, et 20 reaktsioonitunniga ei saavuta nad nendel tingimustel ilmselt oma levaanitootmise maksimumi.

A)**B)**

Joonis 9. Mutantsed levaansukraasid levaani sünteesijatena 300 mM (paneel A) ja 1200 mM (paneel B) sahharoosist.

Üllatusena eristus levaani sünteesi katses mutant Val385Ala. Esiteks oli sel mutandil levaani sünteesi algkiirus palju suurem kui muteerimata ensüümil. Teiseks sünteesis Val385Ala 1200 mM sahharoosist rohkem levaani kui muteerimata ensüüm (vt Joonis 9 ja Tabel 6). Samal ajal sünteesis see mutant FOS-e vähem kui muteerimata valk (Tabel 5). Tundub, et sellel mutandil on muutunud produktide muster – tal on suurenenud levaani sünteesi võime FOS-ide sünteesi arvel. Levaani sünteesi kiirust Lsc3 valgul inhibeerib glükoosi lisamine reaktsioonikeskkonda (Aasamets, 2013). Kui sahharoos lõhustatakse levaansukraasiga, siis vabaneb selle igast molekulist kõrvalproduktina üks glükoosimolekul. Glükoosijääk seondub levaansukraasi aktiivtsentris piirkonda +1 (vt Joonis 2) ja saab sellega otseselt häirida aktseptormolekuli (sahharoos või fruktaanahel) seondumist samasse piirkonda, sellega takistades polümerisatsioonireaktsiooni. Võimalik, et mutandil Val385Ala on takistatud glükoosi

seostumine sellesse piirkonda ja sellega vähenenud tema inhibeeriv toime levaani sünteesile. Sellega saaks seletada kiiret ja tulemuslikku levaani sünteesi. Hilisematel ajapunktidel (Joonis 9) langeb levaanitekke reaktsioonis neeldumine 400 nm juures. See võib olla tingitud asjaolust, et alates mingist kontsentratsioonist levaan agregeerub ja see vähendab neeldumist. Neeldumise langus ei ole põhjustatud levaani hüdrolüüsist, kuna hüdrolüüsil moodustub rohkesti fruktoosi, mida selles katses ei täheldatud.

Tabel 6. Maksimaalne levaani kogus (mg/ml), mis detekteeriti levaansukraaside reaktsioonis 300 mM ja 1200 mM sahharoosiga.

Lsc3	300 mM sahharoos	1200 mM sahharoos
Muteerimata	11,2 ± 0,1	5,0 ± 0,1
Asp333Ala	7,8 ± 0,3	4,5 ± 0,2
Asp333Asn	6,7 ± 0,5	4,2 ± 0,1
Val385Ala	11,0 ± 0,1	5,7 ± 0,1

* Andmed pärinevad katsest, mida kirjeldab Joonis 9.

2.3.4. Kokkuvõtte Lsc3 mutantide omadustest ja hüpotees levaansukraasi töömehhanismi kohta

Selle töö jaoks konstrueeritud Lsc3 valgu mutantidelt eeldati polümerisatsioonivõime langust ja substraadivaliku muutust. Mutandid positsioonile Asp333 konstrueeriti *Z. mobilis*'e levaansukraasi positsiooni Asp308 järgi. Mutandi Asp308Asn omadused näitasid, et Asp308 võiks paikneda substraaditasku +2 alampiirkonnas ja mõjutada seetõttu nii polümerisatsiooni-reaktsiooni kui ka rafinoosi seostumist (Yanase *et al.*, 2002). Lsc3 mutandil substraadivalik oluliselt ei muutunud, kuid sellegipoolest võib Asp333 paikneda Lsc3 valgu +2 piirkonnas või selle lähedal, sest mutandil, milles Asp333 oli asendatud väikese hüdrofoobse aminohappealaniiniga (mutant Asp333Ala; vt ka Lisa 5), langes FOS-ide sünteesi võime neli korda ning pikemaid FOS-e kui DP5 ei sünteesitud. Asp333 võib seega mängida rolli oligomeeride seostumises või vabanemises. Kui Asp333 asendati talle sarnase aminohappega, asparagiiniga (mutant Asp333Asn), siis mõjutas see valgu tööd suhteliselt vähe - transfruktosüüliv aktiivsus isegi suurenes ja jääksahharoosi hulk reaktsioonisegus vähenes.

Ortiz-Soto *et al.* näitasid 2008. aastal, et *B. subtilis*'e SacB Arg433Ala mutant kaotas võime sünteesida levaani ja tootis ainult FOS-e. SacB kristallstruktuurilt on näha, et Arg433 asub katalüütilise tsentri lähedal (Joonis 7). Valkude joonduse kohaselt on Arg433-le homoloogne positsioon Lsc3 valgus Val385 (Joonis 6). Mutandil Val385Ala muutusid afiinsus substraadile

ning sahharoosi lõhustamise koguaktiivsus vähe, seega võib see aminohape paikneda pigem aktiivtsentrist kaugemal. Val385Ala tegi vähem FOS-e ja rohkem levaani kui muteerimata valk ja tema transfruktosüüliv aktiivsus oli samuti tõusnud. Tõenäoliselt on Val385 oluline produktide spektri määramisel, mõjutades kuidagi kasvava polümeeri sünteesi ja FOS-ide vabanemist ensüümilt.

Ozimek *et al.* esitasid 2006. aastal hüpoteesi, mille järgi inulosukraasid ning levaansukraasid moodustavad erineva pikkusega fruktaane sellepärast, et nende aktseptorpiirkondade afiinsus erineva pikkustega substraatidele on erinev. Nad oletavad ka, et pärast fruktoosijäägi lisandumist aktseptorile võib pikenenud fruktaaniahel jääda ensüümiga seotuks ning kuna sahharoosi molekul on piisavalt väike, võib see mahtuda katalüütilisse taskusse, andes ensüümile järgmise fruktosüüli ahela jätkamiseks. Levaansukraasid moodustavad nii FOS-e kui ka pika ahelaga levaani. Kui reaktsioonis toimuks pidev seostunud fruktaaniahela pikendamine, oleks raske seletada FOS-ide moodustumist. Samuti ei ole Ozimek'i hüpoteesiga võimalik seletada seda, miks levaansukraas toodab FOS-e vaid kindla pikkuseni (Lsc3 kuni DP väärtuseni 7; Tabel 5) ning sellele lisaks vaid pikki levaaniahelad.

Sellist produktide mustrit saaks seletada hüpoteesiga, et aktseptorina toimiv fruktaaniahel seondub katalüütilise tasku aktseptorpiirkonda (alapiirkondadesse +1, +2 ja võimalik, et ka +3), kuid selle läheduses ei pruugi olla seostumiskohti pikemate aktseptorfruktaanide seostumiseks. Nimetan seda piirkonda, kuhu aktseptorahel seostuda ei saa, „surnud“ alaks. Sellest „surnud“ alast kaugemal võib olla veel üks ala, kuhu polümeerne aktseptor saab seostuda. Võib arvata, et kui fruktaaniahela süntees algab, on sünteesitav fruktaan lühike ning „surnud“ alale võiksid ulatuda vaid tema üksikud suhkrujäägid. Ahela pikenedes muutub fruktaaniahel raskemaks ning aina suurem osa temast satub „surnud“ alasse, mis seostumist ei võimalda. Mingil hetkel ei suuda katalüütilise tasku kõrval olevad +1 ja +2 piirkonnad järjest pikenevat levaaniahelat ensüümi küljes enam hoida ning oligomeer vabaneb reaktsioonikeskkonda.

Juhul kui FOS saavutab enne valgult eraldumist piisava pikkuse, et ulatuda üle „surnud“ ala polümeeri seondumise täiendavasse piirkonda, siis saab alata protsessiivne levaani süntees. Pidev ensüümiga seotud olemine eeldab, et kasvav polümeer peaks nihkuma pärast igat uut fruktosüüli lisamist mööda ensüümi pinda edasi. Nihkumisele võiks aidata kaasa suhkruahela küllaltki jäik struktuur.

Uuritud positsioonidest võiks antud hüpoteesidega seletada positsioonide Asp333 ja Val385 mutantide iseärasusi. Asp333 võiks asuda „surnud“ alas või selle kõrval, kuhu oligomeer küll

ei seondu, kuid mida fruktaaniahel peab läbima. Muteerides selle aminohappe hüdrofoobse Ala vastu, võib Ala tungida sügavamale ensüümi sisse, tõmmates ümbritsevad aminohapped „rajale“ ette või rikkuda selle muul moel. Tulemuseks on see, et fruktaaniahel ei saa enam nii sujuvalt mööda ensüümi pinda edasi nihkuda ja tekib rohkem võimalusi oligomeeri enneaegseks vabanemiseks valgult, mida näitab ka Asp333Ala sünteesitud pikim FOS DP-ga 5 muteerimata valgu DP 7 vastu.

Val on hüdrofoobne aminohape (vt Lisa 5) ning seega võiks asuda pigem valgu sees. Val muteerimisel väiksema hüdrofoobse Ala vastu (Lsc3 mutant Val385Ala) võib muutuda selle piirkonna struktuur. Kuna Ala on väiksem kui Val, siis võib see mutatsioon muuta ensüümi pinna sellest piirkonnas madalamaks, kui see on algvalgus. Võimalik, et selle madalamaks muutumise käigus nihkub polümeeri seondumise alampiirkond Lsc3 aktiivtsentrile mööda fruktaaniahela „seostumisrada“ lähemale, mistõttu toimub lühikeste FOS-ide pikendamine edukamalt. Võiks oletada, et Val385Ala valgul ulatub kuue suhkrujäägi pikkune sünteesitud FOS juba polümeeri seondumise piirkonda ning algab efektiivne ahela pikendamine ilma et seitsme suhkrujäägi pikkusi (DP 7) FOS-e reaktsioonikeskkonda eralduks.

Positsioon Phe381 valiti muteerimiseks *B. subtilis*'e SacB mutandi Tyr429Asn järgi (Ortiz-Soto *et al.*, 2008; vt ka Joonis 6). Tyr429Asn mutant suutis sahharoosist sünteesida vaid FOS-e, levaani mitte. Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasides on vastavas positsioonis fenüülalaniin (vt joondusi Joonisel 6 ja Lisas 3). Et teha kindlaks, kuidas paiknevad vastavad aminohapped *G. diazotrophicus*'e (gramnegatiivne bakter) LsdA valgus ja *B. subtilis*'e (grampositiivne bakter) SacB valgus, analüüsiti nende kahe valgu kristallstruktuure. Jooniselt 8 on näha, et SacB Tyr429 ning LsdA Phe497 benseenituumad kattuvad. Tyr429 saab osaleda substraadi seostamises aktiivtsentrisse üle vee molekuli moodustuvate vesiniksidemete (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Kuna fenüülalaniin ei saa vesiniksidet moodustada, võiks tema roll olla muu. Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasides võib vastav Phe pigem osaleda katalüütilist taskut ümbritseva hüdrofoobse rõnga moodustumises, mis aitab sahharoosi molekuli seal orienteerida.

Võrreldes metsiktüüpi ensüümiga Lsc3 vähenes Phe381 mutantidel afiinsus sahharoosile vähe, kuid sahharoosi lõhustamise koguaktiivsus alaneks drastiliselt. Seetõttu jäi ka reaktsioonisegusse palju sahharoosi alles (Phe381Asn mutandil 65%) ning levaani tootmine oli väga aeglane. Võib öelda, et positsioon Phe381 on oluline substraadi lõhustumisel, kuid omab väikest rolli selle seondumises.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärkideks oli kolme aminohappe (Asp333, Phe381 ja Val385) funktsiooni uurimine ning asukoha ennustamine *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasis Lsc3. Samuti sooviti teada saada rohkem levaansukraasi töömehhanismist. Selleks loeti kirjandust ja üritati oma tulemusi analüüsida olemasolava informatsiooni valgusel. Kohtsuunatud muteerimisega tehtud mutantidelt oodati muutusi substraadispetsiifikas ning produktide pikkustes.

Töös konstrueeriti ja ekspresseeriti järgnevad Lsc3 levaansukraasi mutandid: Asp333Ala, Asp333Asn, Phe381Ala, Phe381Asn ja Val385Ala. Mutandid valiti SacB ning LevU mutantide järgi, millel oli muutunud substraatide kasutamise spekter ja polümerisatsioonivõime. Ootasime, et mutant Asp333Asn võiks kasutada rafinoosi halvemini kui muteerimata valk ning et Phe381Asn ning Val385Ala mutandid võiksid produktidena toota vaid FOS-e. Mutantide uurimisel leiti, et Asp333 mutantidel muutus rafinoosi ja sahharoosi kasutamise suhe võrreldes metsiktüüpi ensüümiga vähe. Produkte analüüsides leiti, et Asp333 on vajalik eelkõige FOS-ide sünteesiks. Val385Ala mutant tootis FOS-e ning kõrgematel kontsentratsioonidel levaani isegi kiiremini ja rohkem kui metsiktüüpi valk. Lsc3 positsioonide Asp333 ning Val385 mutantide omaduste järgi püstitasin hüpoteesi, mille kohaselt akseptorina toimiva fruktaaniahela seostumisala on pikem kui seni on arvatud, kuid ta ei ole pidev, vaid sisaldab vahepeal nn „surnud“ ala, milles seostumist ei toimu. Sünteesitava oligomeeri pikenedes muutub fruktaaniahel üha raskemaks ning võib ensüümilt lahti tulla enne kui ta ulatub seonduma „surnud“ alale järgnevasse piirkonda. Sellega saaks selgitada asjaolu, miks lisaks teatud kindla pikkusega oligomeeridele sünteesitakse vaid pikki levaaniahelaid.

Phe381 mutandid sünteesisid väga vähe nii FOS-e kui ka levaani. Levaansukraaside SacB ning LsdA omavahelisel võrdlusel järelitati, et Lsc3 Phe381 osaleb katalüütilise tasku ümber hüdrofoobse rõnga moodustumisel. Olles lähedal reaktsioonitsentrile mõjutab see positsioon ka katalüüsi, mida kinnitavad uuritud Phe381 mutantide drastiliselt langenud katalüütilised näitajad.

The significance of Asp333, Phe381 and Val385 for the catalysis of *Pseudomonas syringae* pv. tomato levansucrase Lsc3

Mihkel Vaher

SUMMARY

Levansucrases (EC 2.4.1.10) are bacterial extracellular enzymes which produce short-chain fructooligosaccharides (FOS) and long-chain levan. In these fructans, fructose moieties are linked with $\beta(2\rightarrow6)$ bonds. There is a wide spectrum for the application of these fructans: from prebiotics and emulsifiers to immunostimulants and antitumor agents.

In current study, the effects of five replacement mutants: Asp333Ala, Asp333Asn, Phe381Ala, Phe381Asn and Val385Ala of *Pseudomonas syringae* pv. tomato levansucrase Lsc3 on enzyme catalysis were addressed. This enzyme has very high catalytic activity and stability, and has therefore a high potential for enzymatic synthesis of fructans.

The mutant *lsc3* genes were constructed by site-directed mutagenesis, the mutant proteins were expressed in *Escherichia coli*, purified and biochemically characterized. The results obtained by us clearly confirmed high role of Phe381 in sucrose cleavage and polymerization. The mutation of Asp333 had less severe consequences on catalysis. Enhanced velocity of levan synthesis was shown for the mutant Val385Ala. Based on literature analysis and experimental results of this study, a novel hypothesis on levansucrase reaction machinery was raised.

KIRJANDUSE LOETELU

- Aasamets, A. (2013). Levaansukraas Lsc3 polümeeriseerijana: reaktsioonitingimuste optimeerimine erinevate produktide sünteesiks. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L., Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochem.* 38: 701–6.
- Betts, M. J. and Russell, R. B. (2003) Amino acid properties and consequences of substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists*. Wiley.
- Berman, H. M., Henrick, K., Nakamura, H. (2003). Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Biol.* 10: 98.
- Calazans, G. M. T., Lopes, C. E., Lima R. M. O. C., de França, F. P. (1997). Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol. Lett.* 19: 19–21.
- Chambert, R. and Petit-Glatron, M. F. (1991). Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 79: 35–41.
- Chambert, R., and Petit-Glatron, M. F. (1993). Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carbohydr. Res.* 244: 129-36.
- Dahech, I., Belghith, K. S., Belghith, H., Mejdoub, H. (2012). Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 51: 329-35.
- DeLano, W. L. (2002). The PyMOL molecular graphics system. California, USA: DeLano Scientific, San Carlos (<http://www.pymol.org>).
- Dong, Z., McCully, M. E., Canny, M. J. (1997). Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Ann. Bot.* 80: 147–58.
- Elmi, T. (2011). *Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraasi Lsc3 katalüütilise tsentri aminohapete kindlakstegemine mutatsioonanalüüsiga. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Euzenat, O., Guibert, A., Combes, D. (1997). Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem.* 32: 237-43.
- French, A. D., and A. L. Waterhouse. 1993. Science and technology of fructans, p. 41-48. In M. Suzuki and N. J. Chatterton (ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J. A. (1983). Cloning structural gene sacB, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 153: 1424–31.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, p. 571-607. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-8.
- Hartmann, A., Prabhu, S. R., Galinski, E. A. (1991). Osmotolerance of *diazotrophic* rhizosphere bacteria. *Plant Soil* 137: 105–9.

- van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I. G. H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 70: 157-76.
- van Hijum, S. A. F. T., Szalowska, E., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* 150: 621-30.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* 407: 189–98.
- Jang, K. H., Song, K. B., Kim, C. H., Chung, B. H., Kang, S. A., Chun, U., Choue, R. W., Rhee, S. (2001). Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett*, 23: 339-44.
- Kang, H. K., Seo, M. Y., Seo, E. S., Kim, D., Chung, S. Y., Kimura, A., Day, D. F., Robyt, J. F. (2005). Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1727: 5–15.
- Kasapis, S., Morris, E. R., Gross, M., Rudolph, K. (1994). Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, and its possible role as a blocker of recognition during pathogenesis. *Carbohydr. Polym.* 23: 55–64.
- Koczan, J. M., McGrath, M. J., Zhao Y., Sundin, G. W. (2009). Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathology* 99: 1237–44.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., van Laere, A., Rabijns, A., van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J. Exp. Bot.* 60: 727-40.
- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T. R., Molin, S., Ullrich, M. S. (2006). Contribution of alginate and levan formation to biofilm by *P. syringae*. *Microbiology.* 152: 2909–18.
- Leloup, L., Driessen, A. J., Freudl, R., Chambert, R., Petit-Glatron, M. F. (1999). Differential dependence of levansucrase and alpha-amylase secretion on SecA (Div) during the exponential phase. *J. Bacteriol.* 181: 1820-6.
- Li, S.Y., Chen, M., Li, G., Yan, Y.L., Yu, H.Y., Zhan, Y.H., Peng, Z.X., Wang, J., Lin, M. (2008). Amino acid substitutions of His296 alter the catalytic properties of *Zymomonas mobilis* 10232 levansucrase. *Acta. Biochim. Pol.* 55: 201-6.
- Li, S., Yan, Y., Zhou, Z., Yu, H., Zhan, Y., Zhang, W., Chen, M., Lu, W., Ping, S., Lin, M. (2011). Single amino acid residue changes in subsite -1 of levansucrase from *Zymomonas mobilis* 10232 strongly influence the enzyme activities and products. *Mol. Biol. Rep.* 38: 2437-43.
- Mardo, K. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. tomato levanasukraasi Lsc3 struktuuri modelleerimine ja mutantide iseloomustamine. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Elmi, T., Alamäe, T. Mutational analysis of conserved regions harbouring catalytic triad residues of the levansucrase protein encoded by *lsc-3* (*lsc3*) gene of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (Ilmumas).
- Martin, I., Debarbouille, M., Klier, A., Rapoport, G. (1989). Induction and metabolite regulation of levanase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 171: 1885–92.

- Martinez-Fleites, C., Ortiz-Lombardia, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernandez, L., Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* 390: 19-27.
- Matsukura, H., Katayama, K., Kitano, N., Kobayashi, K., Kanegane, C., Higuchi, A., Kyotani, S. (1996) Infective endocarditis caused by an unusual gram-negative rod, *Rahnella aquatilis*. *Pediatric Cardiology.* 17: 108-11.
- Meng, G., Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* 10: 935-41.
- Meng, G., Fütterer, K. (2008). Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct. Biol.* 8: 16-28.
- Molina, L., Rezzonico, F., Défago, G., Duffy, B. (2005). Autoinduction in *Erwinia amylovora*: Evidence of an Acyl-Homoserine Lactone Signal in the Fire Blight Pathogen. *J. Bacteriol.* 187: 3206-13.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-8.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Oh, C. and Beer, S. V. (2005). Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiol. Lett.* 253: 185–92.
- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C., López-Munguía, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng. Des. Sel.* 21: 589-95.
- Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology.* 152: 1187-96.
- Paton, A. M. (1960). The role of *Pseudomonas* in plant disease. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 526–32.
- Pijning, T., Anwar, M. A., Böger, M., Dobruchowska, J. M., Leemhuis, H., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B. W. (2011). Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *J. Mol. Biol.* 412: 80-93.
- Rairakhwada, D., Pal, A. K., Bhathena, Z. P., Sahu, N. P., Jha, A., Mukherjee, S. C. (2007). Dietary microbial levan enhances cellular nonspecific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 477–86.
- de las Rivas, B., Curiel, J. A., Mancheño, J. M., Muñoz, R. (2007). Expression vectors for enzyme restriction- and ligation-independent cloning for producing recombinant His-fusion proteins. *Biotechnol. Progr.* 23: 680-6.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, p. A8.40-4. *In* J. Argentine, N. Irwin *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., vol.3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sangiliyandi, G. and Gunasekaran, P. (2004). Differential expression of *Zymomonas mobilis* sucrase genes (sacB and sacC) in *Escherichia coli* and sucrase mutants of *Zymomonas mobilis*. *Braz. arch. biol. technol.* 47: 329-38.

- Sangiliyandi, G., Ray, K. C., Gunasekaran, P. (1999). Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 21: 179-82.
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Hecht, H. J. (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr. Res.* 341: 2335-49.
- Sharma, R. C. and Schimke, R. T., (1996). Preparation of electro-competent *E. coli* using saltfree growth medium. *BioTechniques.* 20: 42-4.
- Shida, T., Mukaijo, K., Ishikawa, S., Yamamoto, H., Sekiguchi, J. (2002). Production of long-chain levan by a sacC insertional mutant from *Bacillus subtilis* 327UH. *Biosci. Biotech. Bioch.* 66: 1555–8.
- 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: 113–30.
- Strube, C. P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., Heinz, D. W. (2011). Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J. Biol. Chem.* 286: 17593–600.
- Tanaka, T., Oi, S., Yamamoto, T. (1980). The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. *J. Biochem.* 87: 297–303.
- The UniProt Consortium. (2012). Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt) *Nucleic Acids Res.* 40: D71-5.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research.* 22: 4673-80.
- Tonozuka, T., Tamaki, A., Yokoi, G., Miyazaki, T., Ichikawa, M., Nishikawa, A., Ohta, Y., Hidaka, Y., Katayama, K., Hatada, Y., Ito, T., Fujita, K. (2012). Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp. K-1 β -fructofuranosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 51: 359-65.
- Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Cruz-Vázquez, F., Trejo-Contreras, M. J., Fuentes-Ramírez, L. E., Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P., Valdez-Alarcón, J. J. (2011). *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Arch Microbiol* 193: 137–49.
- Vigants, A., Upite, D., Scherbaka, R., Lukjanenko, J., Ionina, R. (2013). An influence of ethanol and temperature on products formation by different preparations of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Folia Microbiol. Praha.* 58: 75-80.
- Vigants, A., Kruce, R., Bekers, M., Zirkmanis, P. (1998). Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. *Biotechnol. Lett.* 11: 1017–9.
- Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A. D., Vigants, A., Alamäe, T. (2011). Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation. *J. Biotechnol.* 155: 338–49
- Visnapuu, T., Mäe, A., Alamäe, T. (2008). *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter with sigma 70-like elements is feasible for *Escherichia coli*-based biotechnological applications: Expression of three genomic levansucrase genes of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Process Biochem.* 43: 414-22.

- Wanker, E., Huber, A., Schwab, H. (1995). Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microb. 61: 1953–8.
- Wei, D., Li, M., Zhang, X., Xing, L. (2004). An improvement of the site-directed mutagenesis method by combination of megaprimer, one-side PCR and *Dpn* I treatment. Anal. Biochem. 331: 401-3.
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., Okamoto, K. (2002). Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. Biochem. J. 132: 565-72.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

Advance: <http://www.advance.jp>

Carbohydrate-Active Enzymes Database: <http://www.cazy.org>

ExpASY Bioinformatics Resource Portal: <http://expasy.org/>

ModBase: <http://modbase.compbio.ucsf.edu>

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

Protein Data Bank: <http://www.pdb.org>

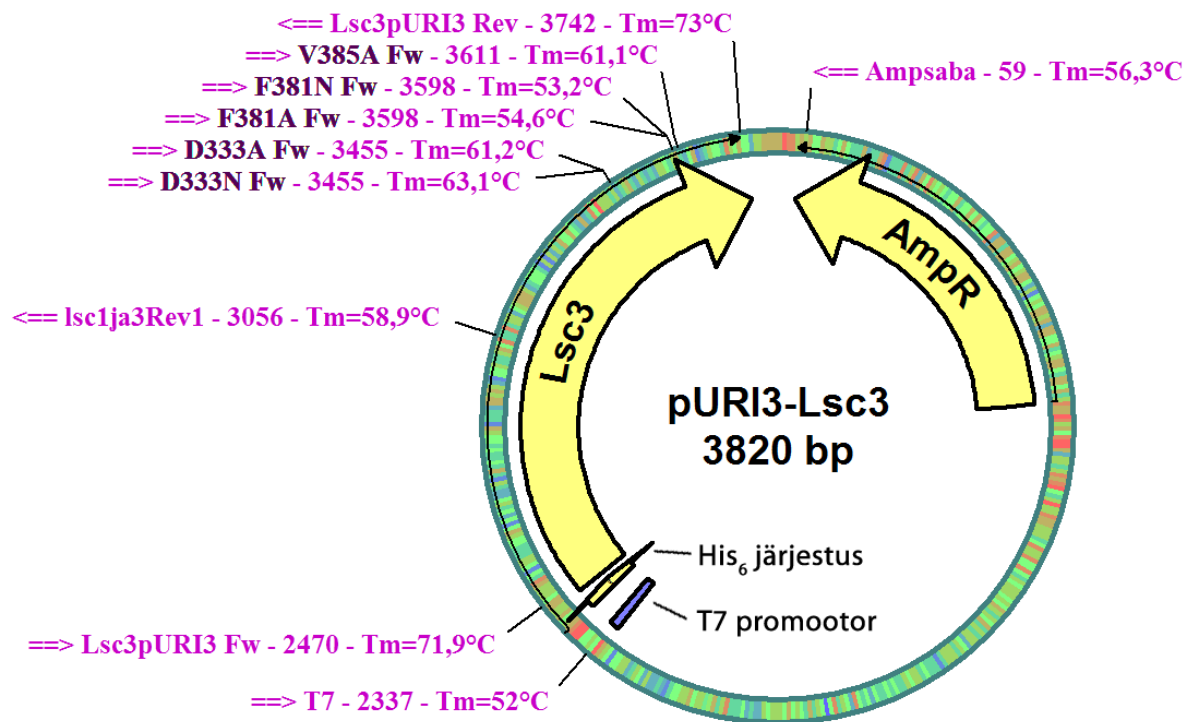
RealBiotech: <http://www.realbio.com>

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

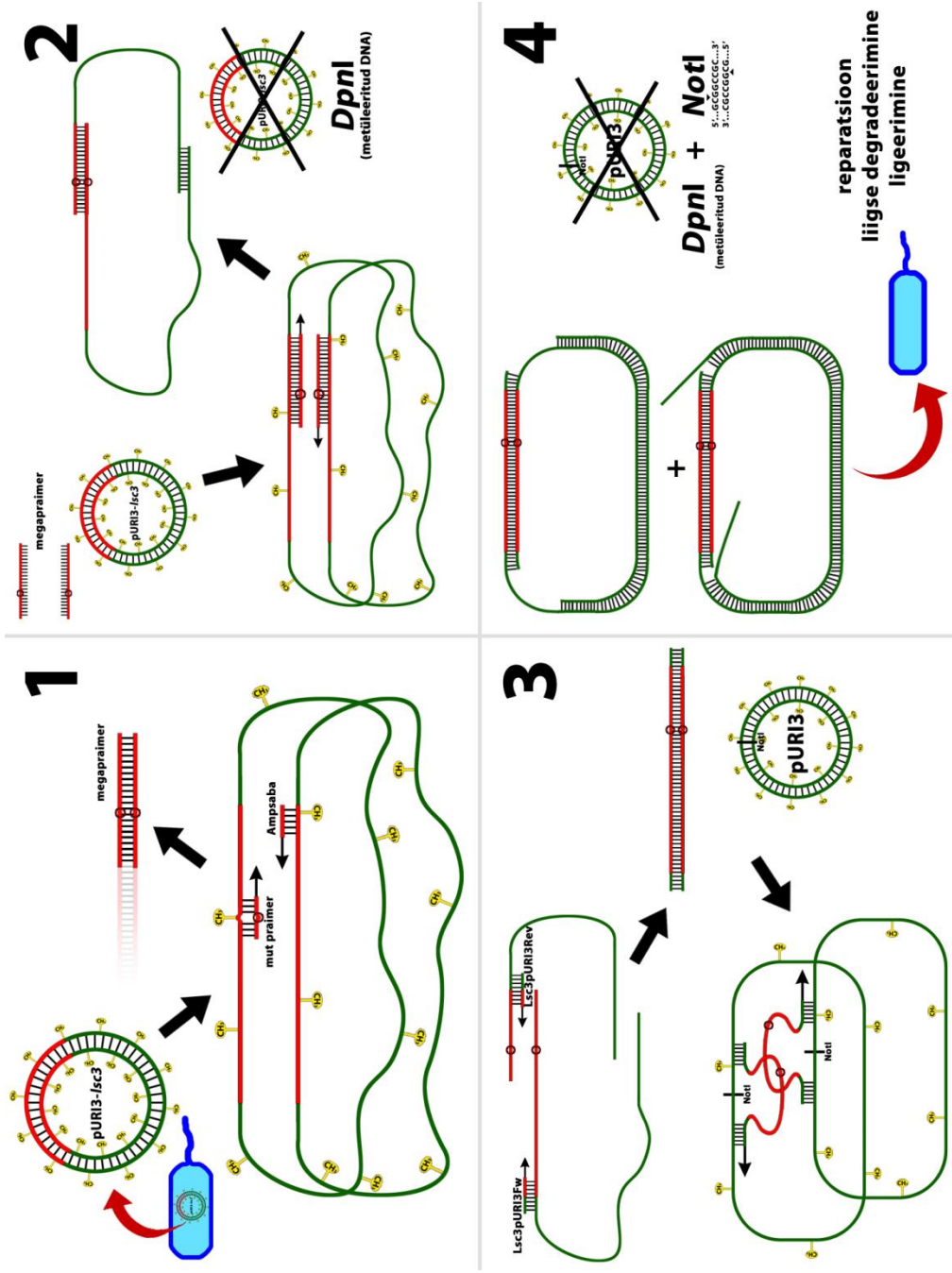
UniProt: <http://www.uniprot.org>

LISA 1

Ekspressioonivektor pURI3-lsc3 (3820 ap). Tumedama kirjaga on märgitud töös kasutatud muteerimispraimerid. Joonise tegemiseks kasutati programmi pDRAW32 ver. 1.1.107 (<http://www.acaclone.com/>).



LISA 2



Suunatud mutageens megaprimeri meetodil ja *lsc3* geeni vektoriga liitmine. Joonisel muteeritakse *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi geeni *lsc3* ning viiakse see pURI3 vektorisse. Kollaste CH₃ märgistega on tähistatud metüleeritud DNA, punase rõngaga mutatsioon. *DpnI* ja *NotI* on restriktasid, mis „lõikavad“ vastavalt metüleeritud DNA-d ja joonisel märgitud järjestust.

LISA 3

Erinevatest organismidest pärinevate levaansukraaside valgujärjestuste joonendus. Joonisel ei näidata vähekonserveerunud N- ja C-terminust.

Q88BN6_Lsc3	1	-----	--MYNSNSAV	SQLQNSPLVD	NIKYPE	----	--TV--	WSR	29
Q8VW87_A.sp.K-1	37	-----	-----SGL	QDGPEPTIHT	QOAYAPEDD	----	-FTAK--	WTR	66
Q93FU9_P.aurantiaca	1	-----	-----	-MKSNTKFG	KAPHQP	----	--SL--	WTR	20
Q43998_G.diazotrophicus	56	-----	--PGRSLAGV	PGFPLPSIHT	QOAYDPQSD	----	-FTAR--	WTR	90
Q46654_E.amylovora	1	-----	-----	-----MS	DYNYKP	----	--TL--	WTR	13
O54435_R.aquaticus	1	-----	-----	-----MT	NLNYTP	----	--TI--	WTR	13
Q60114_Z.mobilis	1	-----	-----	-----MLN	KAGIAEP	----	--SL--	WTR	15
D8J9C2_H.jeotgali	1	-----	-----	---MTPHSG	RATP	----	-----R--	WTR	15
Q5V249_H.marismortui	1	-----	-----	---MTNEALG	EGRSGTK	----	---GRAG	WTR	21
D5DC07_B.megaterium	17	-----	-----AL	LVGGGYQTFA	KGNDSKDFNN	----	SYGIS--	HTR	48
P05655_B.subtilis	17	-----	-----AL	LAGGATQAF	KETNQKPYKE	----	TYGIS--	HTR	48
Clustal Consensus									:*
Q88BN6_Lsc3	30	ADALKVND	PIT	-----	-----	-----	-----	-----	57
Q8VW87_A.sp.K-1	67	ADARQLQRM	DPT	APSRENS	MPASVIMPTV	QDFFDMSNE	Q-----	-----	107
Q93FU9_P.aurantiaca	21	ADALKVHADD	PIT	-----	-----	-----	-----	-----	48
Q43998_G.diazotrophicus	91	ADALQIKAHS	DA	VAAQONS	LPAQLTMPNI	PADFFVINPD	-----	-----	130
Q46654_E.amylovora	14	ADALKVHEDD	PIT	-----	-----	-----	-----	-----	41
O54435_R.aquaticus	14	ADALKVND	PIT	-----	-----	-----	-----	-----	41
Q60114_Z.mobilis	16	ADAMKVHTDD	PTA	-----	-----	-----	-----	-----	43
D8J9C2_H.jeotgali	16	EHASKIERTD	ET	-----	-----	-----	-----	-----	42
Q5V249_H.marismortui	22	EQASRIERTD	DT	-----	-----	-----	-----	-----	48
D5DC07_B.megaterium	49	DNMVKIPQQ	NSD	-----	-----	-----	-----	-----	88
P05655_B.subtilis	49	HDMLOIPEQQ	KNE	-----	-----	-----	-----	-----	81
Clustal Consensus		. : .			*				
Q88BN6_Lsc3	57	--VFWDIWP	LRELDGTVVS	VNGWSVITL	TADRHDPDPQ	YLGPDGRYDI	-----	-----	105
Q8VW87_A.sp.K-1	107	--VWVDIWP	LITDEDANQYS	VNGWELIFSL	VADRNLG	-----	-----	-----	142
Q93FU9_P.aurantiaca	48	--VFWDIWP	LRLDLDGNTIS	VDGWSVIFTL	TADRHDPDPE	YIDENGNIDI	-----	-----	96
Q43998_G.diazotrophicus	130	--VWVDIWP	LIDKHADQFS	YNGWVIFCL	TADPNAG	-----	-----	-----	165
Q46654_E.amylovora	41	--VFWDIWP	LRELDGTEIIS	VNGWCIIFTL	TADRNTDNPQ	FQDENGNIDI	-----	-----	89
O54435_R.aquaticus	41	--VFWDIWP	LRLDLDGTVVS	VDGWSVIFTL	TAQRNNNSE	YLDAEGNYDI	-----	-----	89
Q60114_Z.mobilis	43	--YWVDIWP	LRLDINGQVVS	FQGSVIFAL	VADRT	-----	-----	-----	76
D8J9C2_H.jeotgali	42	--INGWDIWF	LRELDGSIAT	VGGWRVIFSL	TAPADLL	-----	-----	-----	77
Q5V249_H.marismortui	48	--VHIWDIWF	LRLDNGTLAT	VDGVRVCFSL	TAPSDLL	-----	-----	-----	83
D5DC07_B.megaterium	89	IDLVDIWP	LQNDGTVAT	YHGQIVFAL	AGDPKDS	-----	-----	-----	125
P05655_B.subtilis	81	--LDVDIWP	LQNDGTVAN	YHGVIHIFAL	AGDPKNA	-----	-----	-----	116
Clustal Consensus		**:	*	* : : : *					
Q88BN6_Lsc3	106	KRDWEDRHGR	ARMCYWYSRT	G-----	----KDWIFG	GRVMAEGVS-	-----	-----	141
Q8VW87_A.sp.K-1	142	---FDDRHFV	AKTICYFYRPA	GVPAAE	----RPENGGWYTG	GLVFKKCVTG	-----	-----	185
Q93FU9_P.aurantiaca	97	TRDWNDRHGR	AKMYWFESRT	G-----	----KDWKLG	GRVMAEGVS-	-----	-----	132
Q43998_G.diazotrophicus	165	-YGFDDRHFV	ARTICYFYRPA	GIPASR	----RPVNGCWYTG	CHLFPDCASA	-----	-----	210
Q46654_E.amylovora	90	TRDWEDRHGR	ARTICYWYSRT	G-----	----KDWIFG	GRVMAEGVA-	-----	-----	125
O54435_R.aquaticus	90	TSDWNNRHGR	ARTICYWYSRT	G-----	----KDWIFG	GRVMAEGVS-	-----	-----	125
Q60114_Z.mobilis	77	KYGWHNRNDG	ARTICYFYSRG	G-----	----SNWIFG	CHLLKDCAN-	-----	-----	112
D8J9C2_H.jeotgali	77	---PGKRHDV	AEIRYFYSRD	G-----	----ETWFDG	GPVFEETR-	-----	-----	110
Q5V249_H.marismortui	83	---PGKRHDV	AEIRCFYSDD	G-----	----RNWHNA	GPVFEETP-	-----	-----	114
D5DC07_B.megaterium	125	-----ND	TSVYLFYKKA	G-----	----DKSIDSWKNA	GRVFKDSDKF	-----	-----	158
P05655_B.subtilis	116	-----DD	TSVYMFYQKV	G-----	----ETSIDSWKNA	GRVFKDSDKF	-----	-----	149
Clustal Consensus		: : : :	* : : : *			* : : *			
Q88BN6_Lsc3	141	-----PT	TREWAGTPIL	LNDKG	-----	D-	IDLYYTCV--	-----	167
Q8VW87_A.sp.K-1	186	QIFEDQSFSH	QTQWSGSARV	SKNGE	-----	-----	IKLFFTDVAF	-----	220
Q93FU9_P.aurantiaca	132	-----PT	AREWAGTPIL	LNEQG	-----	-----	VDLFFYTAV--	-----	158
Q43998_G.diazotrophicus	211	QVYAGQTYTN	QATWSGSRL	MQIHG	-----	-----	VSVEYTDVAF	-----	247
Q46654_E.amylovora	125	-----PT	TREWAGTPIL	LNDRG	-----	D-	IDLYYTCV--	-----	151
O54435_R.aquaticus	125	-----PT	SREWAGTPIL	LNEDG	-----	D-	IDLYYTCV--	-----	151
Q60114_Z.mobilis	112	-----PR	SREWSGCTIM	APGTA	-----	NS	VEVFFTSVND	-----	141
D8J9C2_H.jeotgali	110	-----G	SROWAGSALL	DDDGR	-----	-----	LYVFFYTASGR	-----	136
Q5V249_H.marismortui	114	-----LG	QROWAGSALLY	DDGGS	-----	-----	VYLFYTAAGE	-----	141
D5DC07_B.megaterium	159	VPNDPHLKNQ	TOEWSGSGLT	TKDGK	-----	-----	VRLFYTDYSG	-----	193
P05655_B.subtilis	150	DANDSILKDQ	TOEWSGSATF	TSDGK	-----	-----	IRLFYTDYSG	-----	184
Clustal Consensus			:*:*				: : : *		

Q88BN6_Lsc3	167	-----	-----	-----	-----	TPGA	AI	----	AKV	176
Q8VW87_A.sp.K-1	221	YRNS	-----	DGTNI	-----	KPYD	PRI	----	ALS	239
Q93FU9_P.aurantiaca	158	-----	-----	-----	-----	TPGA	TI	----	VKV	167
Q43998_G.diazotrophicus	248	NRDA	-----	NAN-NI	-----	TPPQ	AI	----	TOT	266
Q46654_E.amylovora	151	-----	-----	-----	-----	TPGA	TI	----	AKV	160
O54435_R.aquaticus	151	-----	-----	-----	-----	TPGA	TI	----	AKV	160
Q60114_Z.mobilis	141	-----	-----	-----	-----	TPSE	SVP	----	AQC	151
D8J9C2_H.jeotgali	136	-----	-----	AGEAEI	-----	TYEQ	RIA	----	VGS	152
Q5V249_H.marismortui	141	-----	-----	EGAEDL	-----	TYTQ	RI	----	VGA	156
D5DC07_B.megaterium	194	K	-----	-----	-----	QYGK	QTL	--	TTAQV	206
P05655_B.subtilis	185	K	-----	-----	-----	HYGK	QTL	--	TTAQV	197
Clustal Consensus										

Q88BN6_Lsc3	177	RCRIVTSDQS	VELKDFTOVK	KLFEADGTYI	QTEAONS	---	SWN	----	F	217
Q8VW87_A.sp.K-1	240	VCKVKANKKC	VTLTGFKNVT	DLLQADGTYI	QTGAQNE	---	FFN	----	F	280
Q93FU9_P.aurantiaca	168	RCRVVTEHG	VSMVGFQKVK	PLFEADGKMY	QTEAONP	---	FWG	----	F	208
Q43998_G.diazotrophicus	267	LCRIHADFNH	VWTFGFTAHT	PLLQEDGVLY	ONGAONE	---	FFN	----	F	307
Q46654_E.amylovora	161	RKIVTSDQS	VSLEGFQOVT	SLEFADGTYI	QTEEQNA	---	FWN	----	F	201
O54435_R.aquaticus	161	RCKVLTSEEG	VTLAGFNEVK	SLEFADGVYI	QTESONP	---	YWN	----	F	201
Q60114_Z.mobilis	152	KCYIYADDKS	VWFDGFDKVT	DLFQADGLYI	ADYAEEN	---	FWD	----	F	192
D8J9C2_H.jeotgali	153	GGSVVADDG	VRLEGPFAHG	VLLQEDGERY	EREQSR	--G	MIYT	----	F	195
Q5V249_H.marismortui	157	GGSIDTADG	FALSGPWTHH	ELLQEDGDRY	EREDQSR	--R	MIYT	----	F	199
D5DC07_B.megaterium	207	NMS-QPNNT	LKVDGVEDYK	SIFDGDGKIY	QTVQFIDEG		GYDTGDNHTL			255
P05655_B.subtilis	198	NVS--ASDSS	LNINGVEDYK	SIFDGDGKIY	QNVQFIDEG		NYSSGDNHTL			245
Clustal Consensus										

Q88BN6_Lsc3	218	RDPSPFID	--PND-GKLYM	VFEGN	----	VAGE	RG	----	SHTV	248
Q8VW87_A.sp.K-1	281	RDPFTFED	--PAHPGETEM	VFEGN	----	SAMQ	RE	----	TATC	312
Q93FU9_P.aurantiaca	209	RDPWPFED	--PND-GKLYM	LFEGN	----	VAGE	RG	----	SHKV	239
Q43998_G.diazotrophicus	308	RDPFTFED	--PKHPGVNVM	VFEGN	----	TAGQ	RG	----	VANC	339
Q46654_E.amylovora	202	RDPSPFID	--RND-GKLYM	LFEGN	----	VAGP	RG	----	SHEI	232
O54435_R.aquaticus	202	RDPSPFID	--PHD-GKLYM	VFEGN	----	VAGE	RG	----	SHVI	232
Q60114_Z.mobilis	193	RDPHVFIN	--PED-GKIYA	LFEGN	----	VAME	RG	----	TVAV	223
D8J9C2_H.jeotgali	196	RDPWFFED	--PRS-GKTYL	LFEAN	----	TPIP	EG	----	AGAC	226
Q5V249_H.marismortui	200	RDPWFFED	--PET-GETWL	LFEAN	----	TPVP	EG	----	SDVC	230
D5DC07_B.megaterium	256	RDPHYIED	--N--GKYL	VFEAN	----	TGTE	DGYQGEDSLY			288
P05655_B.subtilis	246	RDPHYVED	--K--CHKYL	VFEAN	----	TGTE	DGYQGEESLF			278
Clustal Consensus		*** . :	* :	*** *						

Q88BN6_Lsc3	249	GVAELGPVE	--PGHEDVG	--GAR	----	FOVCCIGL	AVAKDL	----		281
Q8VW87_A.sp.K-1	313	NEADLGYROG	DPAEYTVDDV	NASGAT	----	YOICNVGL	AKAKNK	----		352
Q93FU9_P.aurantiaca	240	GKAEICDVE	--PGYEDVG	--NSR	----	FOTACVGI	AVARDE	----		272
Q43998_G.diazotrophicus	340	TEADLGFREN	DENAEITLQEV	LDSGAY	----	YOKANIGL	AIATDS	----		379
Q46654_E.amylovora	233	TOAEMGNVE	--PGYEDVG	--GAK	----	YOACVGL	AVAKDL	----		265
O54435_R.aquaticus	233	GKQEMGTLPE	--PGHRDVG	--NAR	----	YOACCIEM	AVAKDL	----		265
Q60114_Z.mobilis	224	GEEELGPVE	--PKTETPD	--GAR	----	YCAAACGI	AOALNE	----		256
D8J9C2_H.jeotgali	227	GD	--PVWEE	----	----	FN-GSVGI	AHSPTG	----		246
Q5V249_H.marismortui	231	GGDD	--ALQE	----	----	FN-GSVGI	ARSPTG	----		251
D5DC07_B.megaterium	289	NRAYYGNN	--PFFQSEKKK	LLEGSNKEK	----	ASLANCALGI	IELND	----		330
P05655_B.subtilis	279	NKAYYGKST	--SFFRQESQK	LLQSDKKRT	----	AELANCALGM	IELND	----		320
Clustal Consensus										

Q88BN6_Lsc3	282	SGEWEILPP	LVTAAGVNDQ	TERPHYVFOD	GKYLLFTISH	KETYA	DGVT			330
Q8VW87_A.sp.K-1	353	QLTEWEFLPP	ILSANCVDQ	TERPQIYFKD	GKSYLFTISH	RGTEFA	AGLD			401
Q93FU9_P.aurantiaca	273	DGDDWEILPP	LVTAAGVNDQ	TERPHEVFOD	GKYLLFTISH	TETYA	DGVT			321
Q43998_G.diazotrophicus	380	TLSKWKFLESP	ILSANCVDQ	TERPQVYLHN	GKYLLFTISH	RTTEFA	ACVD			428
Q46654_E.amylovora	266	SGSEWQILPP	LVTAAGVNDQ	TERPHEVFOD	GKYLLFTISH	KYTEFA	DNLT			314
O54435_R.aquaticus	266	SGDEWEILPP	LVTAAGVNDQ	TERPHEVFOD	GKYLLFTISH	KETYA	DGLT			314
Q60114_Z.mobilis	257	ARTEWKLPP	LVTAAGVNDQ	TERPHVVFQD	GLTYLFTISH	HSTYA	DGLS			305
D8J9C2_H.jeotgali	247	DPTDWELCDP	LLEGICVNQE	TERPHVVVRN	GFYLLVSSH	DHTEFA	PGLE			295
Q5V249_H.marismortui	252	DPLAWELEDP	LLDAAGVNOE	TERPHVVYRD	GLYLLFTSSH	LHTEFA	PGLE			300
D5DC07_B.megaterium	331	DYTLKKVMKP	LIASNTVTDI	TERANIFKKD	GKWLFTDSR	GSKMTIDGI				379
P05655_B.subtilis	321	DYTLKKVMKE	LIASNTVTDI	TERANVFKMN	GKWLFTDSR	GSKMTIDGIT				370
Clustal Consensus		.. *	:: . *::	** :	:	* ** *	*			

Q88BN6_Lsc3	331	GEDGVY--GF	VG-EHLFGPY	RPMNAS-GLV	LG---NPPE-	-----	362
Q8VW87_A.sp.K-1	402	GE E GVY--GF	VG-DGIRSDY	QPLNGGSGLA	LG---NPTNL	NFLGGQPFAP	445
Q93FU9_P.aurantiaca	322	GEDGVY--GF	VA-DSLFGPY	VPLNGS-GLV	LG---NPSS-	-----	353
Q43998_G.diazotrophicus	429	GEDGVY--GF	VG-DGIRSDY	QPMNYGSLT	MG---NPTDL	NTAAGTDFDP	472
Q46654_E.amylovora	315	GEDGVY--GF	VS-DKLTGPY	TPMNSS-GLV	LG---NPSS-	-----	346
O54435_R.aquatilis	315	GEDGVY--GF	LS-DNLTGPY	SPMNGS-GLV	LG---NPSS-	-----	346
Q60114_Z.mobilis	306	GEDGVY--GF	VSENGIFGPY	EPLNGS-GLV	LG---NPSS-	-----	338
D8J9C2_H.jeotgali	296	GEDGLY--GF	VA-DSLRCGY	RPLNGS-GLV	LT---NPEAN	-----	327
Q5V249_H.marismortui	301	GEDALY--GF	VA-EDLRGDM	VPLNES-GLV	AT---NPEAN	-----	332
D5DC07_B.megaterium	380	GDDVYMLGY	VS-NTLTGKY	KPLNDT-GLV	LHMDLDEND	-----	416
P05655_B.subtilis	371	SND-IYMLGY	VS-NSLTGPY	KPLNKT-GLV	LKMDLDEND	-----	406
Clustal Consensus		. : :* *:	:: : : : :	** * **:		: *	
Q88BN6_Lsc3	362	-----QPFQ	TYSHCVMPN-	-G---LVTSF	-----	IDSVPPT----	387
Q8VW87_A.sp.K-1	446	DFNOHPGHFQ	AYSHYVMPG-	-G---LVQSF	-----	IDTIGT-----	476
Q93FU9_P.aurantiaca	353	-----QPFQ	TYSHCVMPN-	-G---LVTSF	-----	IDSVPPT----	378
Q43998_G.diazotrophicus	473	SPDQNPRAFQ	SYSHYVMPG-	-G---LVESF	-----	IDTIVEN-----	503
Q46654_E.amylovora	346	-----QPFQ	TYSHYVMPN-	-G---LVTSF	-----	IDSVPW-----	371
O54435_R.aquatilis	346	-----QPFQ	TYSHCVMPN-	-G---LVTSF	-----	IDNVPT-----	371
Q60114_Z.mobilis	338	-----QPYQ	AYSHYVMTN-	-G---LVTSF	-----	IDTIPS-----	363
D8J9C2_H.jeotgali	327	-----APYQ	AYSWVAFSH-	-REELLVSGF	FNYIDLGLLT	LDDVAT-----	365
Q5V249_H.marismortui	332	-----APFQ	SYSWMAFPH-	-SDEVLVQSF	FNYDFDGET	LDEIAH-----	370
D5DC07_B.megaterium	416	-----KTE-	TYSHFAVPT	KGNVVTISY	-----	MTNRGF-----	445
P05655_B.subtilis	406	-----VTE-	TYSHFAVQA	KGNVVTISY	-----	MTNRGF-----	435
Clustal Consensus		:	::** ...	::: :		:	
Q88BN6_Lsc3	387	---TGEDYRI	GGTEAPTVERI	LL--KGD--R	SFVQEEY---	---DYGVI-P	423
Q8VW87_A.sp.K-1	476	---HDDFVR	GGTLAPTVERM	DIGVGGDPTK	TAVDYSYGSE	GLGGWADI-P	521
Q93FU9_P.aurantiaca	378	---DESGTQIRI	GGTEAPTVEI	KI--KGO--Q	TFVVAEY---	---DYGVI-P	416
Q43998_G.diazotrophicus	503	-----RR	GGTLAPTVERV	RI--AQN--A	SAVDLRYGNG	GLGGYQDI-P	540
Q46654_E.amylovora	371	---KGKDYRI	GGTEAPTVKI	LL--KGD--R	SFIVDSF---	---DYGVI-P	407
O54435_R.aquatilis	371	---SDGNVRI	GGTEAPTVKI	VL--KGN--R	SFVERVF---	---DYGVI-P	407
Q60114_Z.mobilis	363	---SDPNVRY	GGTLAPTIKL	EL--VGH--R	SFVTEVK---	---GYGI-P	400
D8J9C2_H.jeotgali	366	LSPDEQRAKF	GGTLAPTVERV	AL--SGD--R	TRITGTL---	---SHGRI-P	404
Q5V249_H.marismortui	371	LSESEQMRF	GGSLGPALRL	EV--EGS--R	TRIIGSL---	---GHWHI-P	409
D5DC07_B.megaterium	445	---YEDNH-	-STFAPSFV	NI--DGS--K	TSVVKDR---	-VLEQQL-T	480
P05655_B.subtilis	435	---YADKQ-	-STFAPSFV	NI--KCK--K	TSVVKDS---	-ILEQQL-T	470
Clustal Consensus		:: : *:: :	:	:	:	:	

Roheliste nooltega on märgitud kõrgelt konserveerunud katalüütilise kolmiku aminohapped ning punaste nooltega käesolevas töös muteeritud aminohapped ja nende homologid. *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Lsc3; Q88BN6; 431 ah); *Arthrobacter* sp. K-1 (Q8VW87; 578 ah); *Pseudomonas aurantiaca* (Q93FU9; 424 ah); *Gluconacetobacter diazotrophicus* (LsdA; Q43998; 584 ah); *Erwinia amylovora* (Q46654; 415 ah); *Rahnella aquatilis* (O54435; 415 ah); *Zymomonas mobilis* (LevU; Q60114; 423 ah); *Halalkalicoccus jeotgali* (D8J9C2; 428 ah); *Haloarcula marismortui* (Q5V249; 445 ah); *Bacillus megaterium* (SacB; D5DC07; 484 ah); *Bacillus subtilis* (SacB; P05655; 473 ah). Valkude järjestused saadi UniProt (The UniProt Consortium, 2012) andmebaasist. Järjestused joondati programmiga BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999).

LISA 4

Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (*high-performance liquid chromatography, HPLC*) meetodika suhkrute lahutamiseks

Heiki Vija, Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, Tallinn

Glükoosi, fruktoosi, sahhiroosi ja FOS-ide kogus määrati sarnaselt Downes ja Terry (2010) kirjeldatud meetodikale.

Proovide valmistamine

Fruktoosist, glükoosist, sahharoosist ja rafinoosist valmistati 20% etanoolis lahused kontsentratsiooniga 20 mg/ml. Nende lahuste võrdses hulgas kokkusegamisel saadi standardlahus iga suhkru kontsentratsiooniga 5 mg/ml. Standardlahuse lahjendamisega valmistati lahused kontsentratsioonidega 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 mg/ml. Levaansukraasi reaktsioonisegudest valmistati analüüsiks proovid järgnevalt: proov segati hoolikalt Vortex mikseril ja tehti sellest 20% etanoolilahuses lahjendus arvestusega, et ühegi suhkru kontsentratsioon ei ületaks 5 mg/ml. Sõltuvalt mutantse või metsiktüüpi levaansukraasi omadustest ja reaktiivsusest olid sobivad lahjendused vahemikus 20-100x. Lahused segati, tsentrifuugiti 15 min 10 000 g, et eraldada lahustumatud osakesed, ja pipeteeriti 1 ml lahust kromatograafi proovivialli.

Vedelikkromatograafiline lahutamine

Suhkrute anaüüsiks kasutati kromatograafi Aquity UPLC (Waters, USA) koos binaarse pumba ja automaatse proovivõtjaga ning Aquity ELS (*evaporative light-scattering*) detektoriga (Waters, USA). Tingimused: võimendus (*gain*) 200, pihustus (*drift tube*) 50 °C, gaas (N₂) 20 psi (1.3 l/min). Suhkrud lahutati Alltech Prevail Carbohydrate ES kolonnil (250 x 4.6 mm; Grace, USA), mille osakeste suurus on 5 µm. Proovide pealekandmiseks kasutati eelkolonni Alltech Prevail Carbohydrate ES (7.5 x 4.6 mm; Grace, USA). Kromatograafia etapid viidi läbi toatemperatuuril ja vooluti voolukiirus oli 0.6 ml/min. Vooluti koosnes vedelikkromatograafia jaoks sobivast veest (*LC grade*) (A) ja atseetonitriilist (B). Lineaarne voolutusgradient atseetonitriili suhtes oli järgmine: 70-55% 15 min; 55% 10 min; 55-70% 2 min; 70% 13 min. Analüüsitava proovi kogus ühes tsüklis oli 5 µl.

Tulemuste analüüs ja andmete töötlemine

Standardsuhkrute väljumisaegade alusel identifitseeriti uuritavates proovides vastavad ained. Kõrgema polümerisatsiooniastmega FOS-id identifitseeriti kirjanduses toodud analoogia alusel (Downes ja Terry, 2010). FOS-ide polümerisatsiooniastmega 3-10 kogused kalibreeriti rafinoosi abil. Proovide analüüsil saadud kromatogrammide integreeriti. Tehti kalibreerimisgraafik erinevate kontsentratsiooniga suhkrute standardlahuste kromatogrammide piikide pindala ja suhkru kontsentratsiooni logaritmidest. Saadud

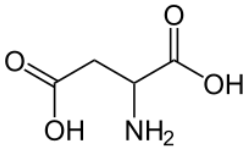
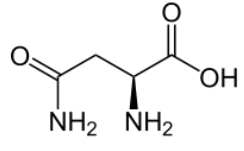
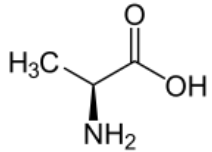
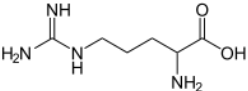
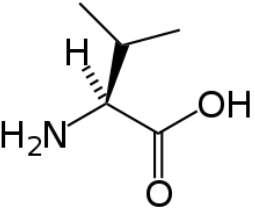
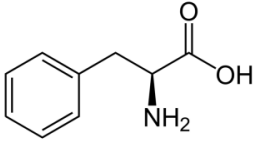
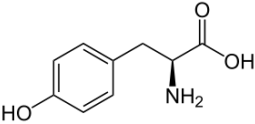
lineaarsele sõltuvusele arvutati funktsioonivõrrand kujul $y=ax+b$. Kuna glükoosi piigi pindala erines märgatavalt teiste suhkrute piigi pindalast, siis arvutati glükoosi ja teiste suhkrute jaoks erinevad funktsioonivõrrandid. Saadud võrrandite alusel arvutati uuritavates proovides registreeritud piikide pindalade alusel suhkrute kontsentratsioon võttes arvesse uuritavatele proovidele tehtud lahjendust. Paralleelproovide tulemuste alusel saadi määramisveaks kuni 10%. Kõikide reaktsioonisegu komponentide sisaldused leiti milligrammides ühe ml kohta. Vaba glükoosi ja fruktoosi sisalduse järgi arvutati transfruktosüüliv aktiivsus ehk reaktsiooniproduktidesse seotud fruktoosi protsentuaalne osakaal. Levaansukraaside võime toota FOS-e väljendati grammides mg valgu kohta.

Kasutatud kirjandus

Downes K., Terry L.A. (2010) A new acetonitrile-free mobile phase method for LC-ELSD quantification of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.). *Talanta* 82 118-24.

LISA 5

Aminohapped, mida asendati ja millega asendati levaansukraasi Lsc3 suunatud mutageniseerimisel.

Aminohape	Tähistus	Struktuur	Omadused	Osaleb H-sidemete loomises	Kasutus selles töös
Asparagiinhape	Asp, D		Hüdrofiilne, happeline, polaarne	Jah	Tehti mutant D333A, positsioon homoloogne LevU D308-ga
Asparagiin	Asn, N		Hüdrofiilne, laenguta, aluseline, polaarne	Jah	Tehti mutant D333N
Alaniin	Ala, A		Hüdrofoobne, mittepolaarne	Ei	Tehti mutandid D333A, F381A, V385A
Arginiin	Arg, R		Hüdrofiilne, aluseline, polaarne	Jah	R433 SacB-s on homoloogne V385-ga Lsc3-s
Valiin	Val, V		Hüdrofoobne, mittepolaarne	Ei	Tehti mutant V385A
Fenüülalaniin	Phe, F		Hüdrofoobne, mittepolaarne	Ei	Tehti mutandid F381A ja F381N
Türosiin	Tyr, Y		Laenguta, polaarne	Jah	Y429 SacB-s on homoloogne F381-ga Lsc3-s

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mihkel Vaher (08.04.1991)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

Asp333, Phe381 ja Val385 olulisus *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 katalüüsile,

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

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **28.05.2015** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013