

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

Maria Gromkova

***Pseudomonas syringae* pv. tomato levansukraasi Lsc3 struktuuri ja funktsiooni seoste
uurimine mutatsioonanalüüsiga**

Magistritöö

Juhendajad dots Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat

teadur Triinu Visnapuu, PhD

Karin Mardo, magister



TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Levaansukraasid.....	6
1.1.1 Levaansukraaside ehitus ja reaktsioonimehhanism.....	7
1.1.2 Levaansukraaside kristallstruktuurid.....	9
1.1.3 Levaansukraaside mutatsioonanalüüs	10
2. EKSPERIMENTAALOSA	13
2.1 Töö eesmärgid.....	13
2.2 Materjal ja meetodika	13
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.....	13
2.2.2 Mutantide konstrueerimine ja <i>lsc3</i> geeni klonereerimine pURI3 vektorisse	14
2.2.3 Elektroporatsioon, konstruktide kontrollimine, plasmiidse DNA eraldamine ja sekveneerimine.....	15
2.2.4 Levaansukraaside ekspressioon, rakuekstraktide tegemine, valkude puhastamine ja elektroforees	17
2.2.5 Valgu kontsentratsiooni määramine.....	18
2.2.6 Levaansukraasi koguaktiivsuse, kineetiliste parameetrite ja levaani tekke mõõtmine	18
2.2.7 Valkude termostabiilsuse määramine.....	21
2.3 Tulemused ja arutelu.....	22
2.3.1 <i>Lsc3</i> valgu mutatsioonanalüüs: muteeritavate positsioonide valik.....	22
2.3.2 Levaansukraasi <i>Lsc3</i> mutantide iseloomustamine ning struktuuri ja funktsiooni vahelised seosed	26
2.3.2.1 Mutantsete valkude substraadispetsiifika ja kineetilised parameetrid.....	27
2.3.2.2 Mutantsete levaansukraaside polümerisatsiooniproduktide iseloomustamine	32

KOKKUVÕTE	38
SUMMARY	40
KASUTATUD KIRJANDUS	42
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	45
LISA 1	46
LISA 2	72
LISA 3	78
LIHTLITSENTS.....	79

KASUTATUD LÜHENDID

DNS – 3,5-dinitrosalitsüülhape

FOS – fruktooligosahhariid

Fru – fruktoos

Gal – galaktoos

Glc – glükoos

GH – glükosiidi hüdrolaas

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

KA – konserveerumise aste

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

K_m – Michaelis' e konstant ehk afiinsus substraadile (mM)

LevU – *Zymomonas mobilis*' e levaansukraas

Lsc3 – *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraas

LsdA – *Gluconacetobacter diazotrophicus*' e levaansukraas

LscA – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* levaansukraas

MsFFase – *Microbacterium saccharophilum*' i β -fruktofuranosidaas

PA – polümeerisatsiooniaste

SacB – *Bacillus subtilis*' e ja *Bacillus megaterium*' i levaansukraas

TA – transfruktosüüliv aktiivsus

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

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

wt – metsiktüüpi (muteerimata) valk (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Levaansukraasid on bakteriaalsed rakuvälised ensüümid, glükosiidi hüdrolaaside (GH) perekonnast 68. Nad katalüüsivad nii substraadi (nt sahharoosi) hüdrolüüsi kui ka fruktoosjäägi ülekannet erinevatele aktseptoritele. Reaktsiooni käigus moodustavad β -2,6-sidemega seotud fruktaanid: polümeerne levaan ja lühikese ahelaga fruktooligosahhariidid (FOS-id). Põhiline levaansukraaside substraat on sahharoos, kuigi paljud levaansukraasid on võimelised kasutama ka rafinoosi ja stahhüoosi. Viimase kahe substraadi kasutamist levaansukraasidel on siiski vähe uuritud. Fruktaanidel on mitmeid biotehnoloogilisi rakendusi. Neid saab kasutada näiteks toidutehnoloogias, farmaatsia- ja keemiatööstuses ning meditsiinis. Kuigi levaani-tüüpi FOS-ide prebiootiline toime võib olla isegi tõhusam kui laialdaselt kasutatavatel inuliini-tüüpi FOS-idel, on seda veel vähe uuritud, sest neid FOS-e ei toodeta tööstuslikult. Prebiootiliselt võiksid eriti tõhusad olla rafinoosist sünteesitud FOS-id, kuna juba rafinoosil endal on prebiootiline toime.

Meie töögrupis on isoleeritud stabiilne ja katalüütiliselt väga aktiivne levaansukraas Lsc3 bakterist *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Oleme näidanud, et see valk on kasutatav levaani ja FOS-ide sünteesiks mahus, mis võimaldaks bioloogiliste toimete (nt prebiootilisuse) uuringuid. Minu magistritöö eesmärgiks oli uurida mutatsioonanalüüsiga mitmete aminohapete olulisust ja rolli Lsc3 valgu katalüüsis ja substraadivalikus. Töö eesmärgid on detailsemalt toodud peatükis 2.1.

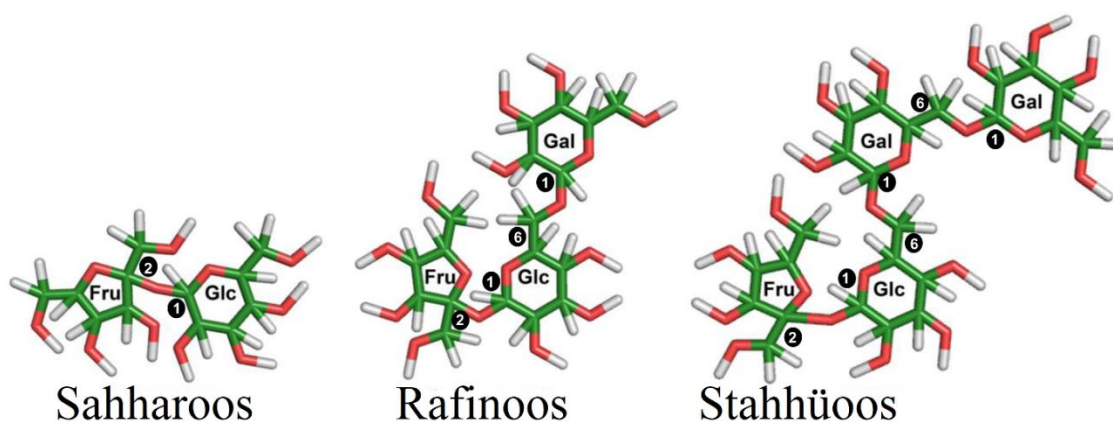
Töö lõppu on lisana köidetud 2014. aastal ajakirjas *Molecules* ilmunud artikkel pealkirjaga „High-throughput assay of levansucrase variants in search of feasible catalysts for the synthesis of fructooligosaccharides and levan“, milles olen kaasautor. Minu panus artiklisse seisnes selles, et ma konstrueerisin, sünteesisin ja puhastasin kuus selles artiklis käsitletud mutantset Lsc3 varianti: Trp109Ala, Glu110Asp, His113Ala, Glu146Gln, Glu236Gln ja Val248Ala ning iseloomustasin nende katalüütilisi omadusi.

Töö valmis Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi Geneetika õppetoolis, Eesti Teadusagentuuri grantiprojekti GLOMR9072 ning EL Regionaalarengu Fondist rahastatud projekti “Design and application of novel levansucrase catalysts for the production of functional food ingredients (Functional Food Ingredients, FFI)” SLOMR12215T raames. Tänaksin oma juhendajaid Tiina Alamäe'd, Karin Mardo't ja Triinu Visnapuu'd, kes aitasid käesolevat tööd koostada ja praktilist tööd planeerida. Avaldan tänu ka kõikidele TUMRI töötajatele, kes aitasid töö valmimisele kaasa, ning Heiki Vija'le Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudist, kes viis läbi proovidele kõrgefektiivse vedelikkromatograafia ja esmase andmeanalüüsi.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Levaansukraasid

Levaansukraasid (EC 2.4.1.10) on bakteriaalsed ekstratsellulaarsed ensüümid, mis kuuluvad glükosiidi hüdroolaaside (GH) perekonda 68. Lisaks levaansukraasidele kuuluvad GH68 perekonda ka β -fruktofuranosidaasid (EC 3.2.1.26) ja inulosukraasid (EC 2.4.1.9) (www.cazy.org). Levaansukraasid sünteesivad kõrge polümeerisatsiooniastmega (PA) β -2,6 sidemega levaani, mille molekulmass võib ulatuda 20-st kDa kuni mitme MDa, või lühema ahelaga fruktooligosahhariide (FOS) (Lammens *et al.*, 2009). Levaansukraasid on multifunktsionaalsed, nad on võimelised katalüüsima nii substraadi hüdrolyüsi kui ka fruktoosijääkide polümeerisatsiooni (Meng ja Fütterer, 2003). Põhiline levaansukraaside substraat on sahharoos, kuigi on näidatud, et paljud levaansukraasid on võimelised kasutama 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) substraadina (Joonis 1) (Yanase *et al.*, 2002; van Hijum *et al.*, 2004; Seibel *et al.*, 2006; Visnapuu *et al.*, 2011).

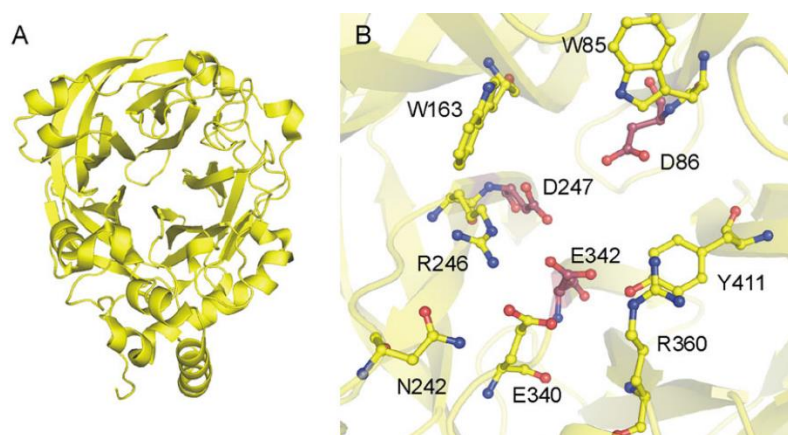


Joonis 1. Sahharoosi, rafinoosi ja stahhüoosi 2D struktuurid. Fru vastab fruktoosile, Glc glükoosile ja Gal galaktoosile. Rohelise värviga on tähistatud süsinikud, punasega hapnikud ja halliga vesinikud. Märgitud on ka suhkrujääkide positsioonid, mille vahele on moodustunud glükosiidside (Visnapuu, 2012).

Levaansukraasi geene leidub grampositiivsetel ja -negatiivsetel bakteritel, näiteks liikidel *P. syringae* (Hettwer *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2001; Visnapuu *et al.*, 2008), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Martínez-Fleites *et al.*, 2005), *Zymomonas mobilis* (Yanase *et al.*, 2002), *Erwinia amylovora* (Caputi *et al.*, 2013), *Bacillus subtilis* (Meng ja Fütterer, 2003), *B. megaterium* (Homann *et al.*, 2007), *Lactobacillus sanfranciscensis* (Korakli *et al.*, 2003), *L. reuteri* (Van Geel-Schutten *et al.*, 1999), *Leuconostoc mesenteroides* (Kang *et al.*, 2014), aga ka mõnel arhel nt *Haloalkalicoccus jeotgali* ja *Haloarcula marismortui* (CAZy; www.cazy.org).

1.1.1 Levaansukraaside ehitus ja reaktsioonimehhanism

Sõltuvalt bakterite kuuluvusest grampositiivsete või -negatiivsete hulka, on nende levaansukraasi valkude pikkus oluliselt erinev. Grampositiivsete bakterite, eriti piimhappebakterite, valgud on enamasti suuremad. Näiteks *L. sanfranciscensis*'e levaansukraas on 879 aminohappe (ah) pikkune (Tieking *et al.*, 2005), kuid gramnegatiivse *Z. mobilis*'e levaansukraasi pikkus on poole lühem - 423 ah (Kyono *et al.*, 1995). Selles töös uuritav valk Lsc3 on 431 ah pikkune (Visnapuu *et al.*, 2008). Kuigi levaansukraaside valgujärjestused ja pikkused on erinevad, on neis mitmeid konserveerunud piirkondi. Levaansukraasidel on viielabalise β -propelleri kuju, kus iga propelleri laba omakorda koosneb neljast antiparalleelsest β -ahelast (Joonis 2). Valgul on tsentraalne negatiivselt laetud õõnsus, mille põhjas asub aktiivtsenter. Aktiivtsenter koosneb kolmest kõrgelt konserveerunud happelisest aminohappest: kahest aspartaadist ja glutamaadist. Neid aminohappeid nimetatakse ka katalüütiliseks kolmikuks ja nende asendamisel teist tüüpi aminohapetega, näiteksalaniiniga, muutuvad valgud katalüütiliselt inaktiivseks (Meng ja Fütterer, 2003; Lammens *et al.*, 2009).

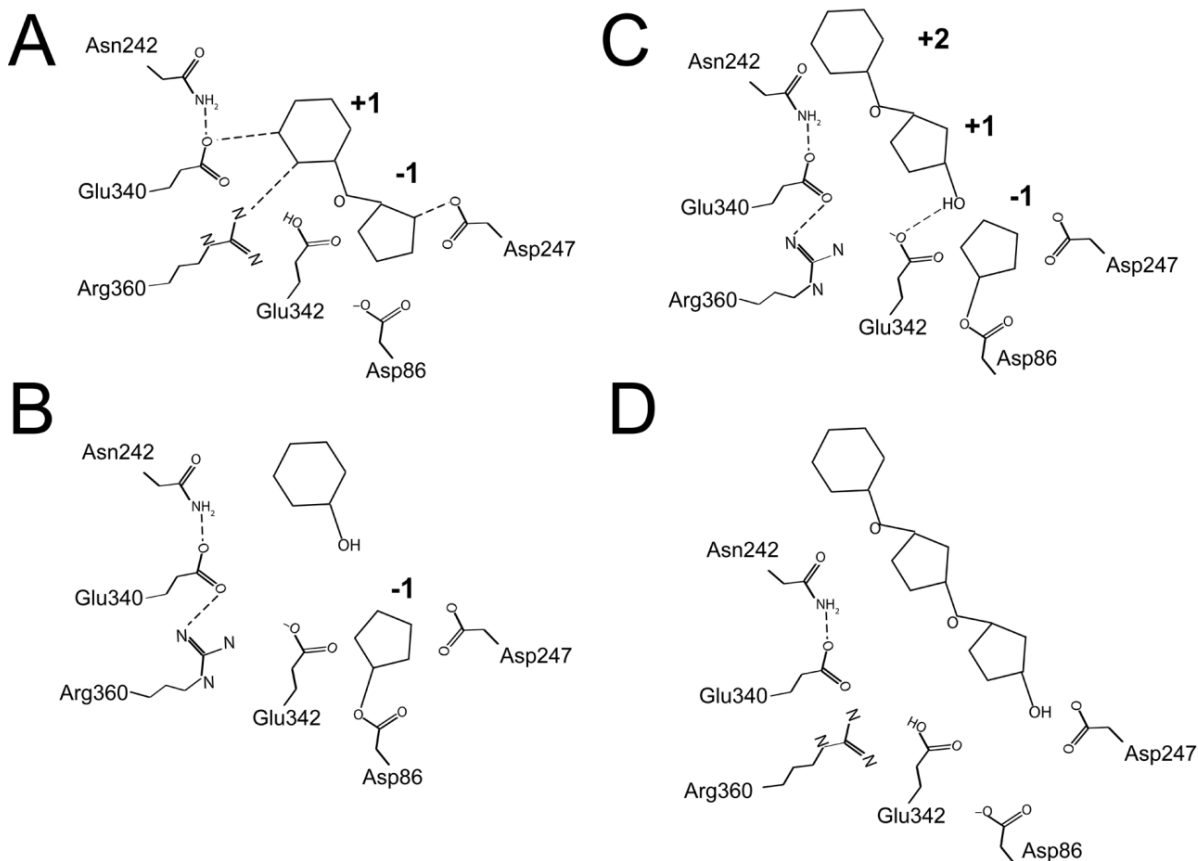


Joonis 2. *B. subtilis*'e levaansukraas SacB (A) ja selle aktiivtsenter (B). Punasega on tähistatud katalüütilisse kolmikusse kuuluvad aminohapped (Asp86, Asp247 ja Glu342) (Lammens *et al.*, 2009).

Levaansukraasidel leidub mitmeid konserveerunud valgujärjestuse motiive, näiteks VWD, EWSG, RDP, D(E/Q)(T/I/V)ER ja TYS (Meng ja Fütterer *et al.*, 2003; Martínez-Fleites *et al.*, 2005). Arg-**A**sp-Pro (RDP) motiivis paiknev aspartaat kuulub katalüütilisse kolmikusse (Lisa 2, Joonis 2). Arginiin ja aspartaat osalevad substraadi sidumises ja moodustavad vesiniksidemeid fruktoosijäägi C3- ja C4-hüdroksüülrühmadega. Aspartaat on oluline substraadi ära tundmisel ja stabiliseerib substraaditaskusse seotud ensüümi-substraadi vaheühendit (Nagem *et al.*, 2004). D(E/Q)(T/I/V)ER motiivi kuuluv glutamaat on alus-hape

katalüüsijaks ja VWD-motiivis paiknev aspartaat on reaktsioonis nukleofiiliks (Meng ja Fütterer, 2003; Martínez-Fleites *et al.*, 2005).

Levaansukraasi reaktsioonimehhanismi sahharoosiga kirjeldab Joonis 3, millel on näidatud esimese (lühima) levaani-tüüpi FOS-i, 6-kestoosi, moodustumine transfruktosüülimisel.



Joonis 3. Levaansukraasi reaktsioon sahharoosiga *B. subtilis*'e SacB valgu näitel. Sahharoos seostub vesiniksidemete abil fruktosüüli doonorina substraaditaskusse, nukleofiil Asp86 deprotoneeritakse ja Glu342 (alus-hape katalüüsija) on protoneeritud (A). Järgnevalt toimub glükosiidsideme hüdrolüüs sahharoosi molekulis, glükoosi jääk vabaneb ja fruktoosijääk jääb kovalentselt seotuks nukleofiiliga Asp86. Arg360 külghel muudab oma rotameerset asetust ja moodustab ioonse sideme Glu340-ga (B). Aktseptorpiirkonda seostub teine sahharoosi molekul: fruktoosijääk seostub +1 ja glükoosijääk +2 alapiirkonnas. Glu342 deprotoneeritakse ja see on valmis moodustama glükosiidsidet ensüümiga seostunud fruktoosijäägiga (C). Moodustub glükosiidside, transfruktosüülimisprodukt 6-kestoos vabaneb substraaditaskust ning Arg360 võtab endise konformatsiooni (D). Mittekovaalentsed sidemed on näidatud katkendliku joonega. Joonis pärineb artiklist Meng ja Fütterer (2008).

Fruktosüüli aktseptorite ring on levaansukraasidel suhteliselt lai ja aktseptoritena toimivad mitte ainult sahharoos ja fruktaaniahelad, vaid ka mitmed teised suhkrud ja alkoholid. Kui aktseptorpiirkonda siseneb veemolekul, siis toimub substraadi hüdrolüüs. Kui aktseptoriks on glükoos, siis toimub vahetusreaktsioon ja produktina moodustub taas sahharoos (Meng ja Fütterer, 2003; Martínez-Fleites *et al.*, 2005; Ozimek *et al.*, 2006; Meng ja Fütterer, 2008). On näidatud, et kui levaansukraasi reaktsioon viia läbi sahharoosi ja mõne teise suhkru

seguga, siis kasutavad *P. syringae* pv. tomato Lsc3 ning *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* LscA valgud fruktosüüli aktseptorina ka alternatiivseid suhkruid, nt D-ksüloosi, D-fukoosi, L- ja D-arabinoosi, D-riboosi, D-sorbitooli, ksülitooli, ksülobioosi, D-mannitooli, D-galakturoonhapet ja metüül- α -D-glükopüranosiidi. Produktidena moodustuvad nii nn tavalised fruktaanid kui ka heterooligofruktaanid (Visnapuu *et al.*, 2011).

Levaansukraasid on võimelised sünteesima nii lineaarseid kui ka hargnenud struktuuriga produkte. Kui levaani põhiahelas on fruktoosijääkide vahel on β -2,6 sidemed, siis hargnemine toimub β -2,1 sidemete kaudu (Han, 1990; Anwar *et al.*, 2010).

1.1.2 Levaansukraaside kristallstruktuurid

Levaansukraasid on praeguse seisuga kõige enam uuritud bakteriaalsed fruktosüültransferaasid. Praeguseks on kristalliseeritud *B. subtilis*'e, *B. megaterium*'i, *G. diazotrophicus*'e ja *E. amylovora* levaansukraasid, kuid viimase struktuuriandmeid ei ole veel PDB andmebaasis kättesaadav (Tabel 1; Meng ja Fütterer, 2003; Martínez-Fleites *et al.*, 2005; Meng ja Fütterer, 2008; Strube *et al.*, 2011; Caputi *et al.*, 2013). Esimesena tehti kindlaks *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB kristallstruktuur (Meng ja Fütterer, 2003). SacB katalüütiliselt inaktiivne mutant Glu342Ala on kristalliseeritud ka koos ligandidega: sahharoosiga ja rafinoosiga (Meng ja Fütterer, 2003; Meng ja Fütterer, 2008). On lahendatud ka *L. johnsonii* inulosukraasi ja *Microbacterium saccharophilum*'i (endine nimetus *Arthrobacter* sp. K-1) β -fruktofuranosidaasi struktuurid (Pijning *et al.*, 2011; Tonozuka *et al.*, 2012; Tabel 1). *M. saccharophilum*'i β -fruktofuranosidaas on järjestuselt ja ehituselt väga sarnane levaansukraasidega ning see ensüüm on kristalliseeritud ka koos fruktoosiga selle aktiivtsentris (Ito *et al.*, 2002; Tonozuka *et al.*, 2012; Ohta *et al.*, 2014). Kristallstruktuuride andmeid saab kasutada teiste sarnaste valkude struktuuri modelleerimiseks, et välja valida valgupiirkondi ja positsioone mutatsioonanalüüsiks. Ka saab neid kasutada valgumutantide omaduste interpreteerimiseks. Meie töögrupis on *P. syringae* pv. tomato levaansukraasi struktuuri modelleerimiseks kasutatud *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi ja *M. saccharophilum*'i β -fruktofuranosidaasi kristallstruktuure (Visnapuu *et al.*, 2001; Mardo, 2011; Mardo *et al.*, 2014 a).

Tabel 1. Kristalliseeritud levaansukraasid (www.rcsb.org; Vaher, 2013).

Valk ja bakter	Valgu tähistus	PDB ID	Ligand	Difraktsiooni määr (Å)	Viide
Levaansukraas <i>Bacillus subtilis</i> 168	SacB	1OYG	–	1.50	Meng ja Fütterer, 2003
		1PT2	sahharoos	2.07	Meng ja Fütterer, 2003
		3BYN	rafinoos	2.03	Meng ja Fütterer, 2008
Levaansukraas <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> SRT4	LsdA	1W18	–	2.5	Martínez-Fleites <i>et al.</i> , 2005
Levaansukraas <i>Bacillus megaterium</i>	SacB	3OM2	–	1.9	Strube <i>et al.</i> , 2011
Inulosukraas <i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC533	InuJ	2YFR	–	1.75	Pijning <i>et al.</i> , 2011
		2YFS	sahharoos	2.60	Pijning <i>et al.</i> , 2011
		2YFT	1-kestoos	1.85	Pijning <i>et al.</i> , 2011
β-frukto-furanosidaas* <i>Microbacterium saccharophilum</i>	MsFFase	3VSR	–	2.0	Tonozuka <i>et al.</i> , 2012
		3VSS	fruktoos	1.97	Tonozuka <i>et al.</i> , 2012

*Struktuurilt sarnane levaansukraasidega

1.1.3 Levaansukraaside mutatsioonanalüüs

Et teha selgeks aminohapete olulisust valgus ja nende rolli katalüüsis, kasutatakse aminohapete asendamist valgus ja saadud mutantse ja algse valgu omaduste võrdlevat analüüsi. On kasulik kui tulemuste interpreteerimisel ja ka muteeritavate positsioonide valikul saab kasutada ka uuritava valgu või mõne sellele hästi lähedase valgu kristallstruktuuri andmeid.

Kasutatakse nii kindlate positsioonide suunatult muteerimist valgus kui ka juhuslikku mutageneesi. Levaansukraasidest on mutatsioonanalüüsiga kõige enam uuritud *Z. mobilis*'e (Yanase *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008), *B. subtilis*'e (Meng ja Fütterer, 2003; Ortiz-Soto *et al.*, 2008) ja *B. megaterium*'i (Homann *et al.*, 2007; Strube *et al.*, 2011) levaansukraase. Mutante on tehtud ja analüüsitud ka *Arthrobacter*'i β-fruktofuranosidaasil (Ohta *et al.*, 2014) ja *G. diazotrophicus*'e levaansukraasil (Martínez-Fleites *et al.*, 2005). Meie grupis on tegeldud *P. syringae* pv. tomato levaansukraaside, peamiselt Lsc3 valgu mutatsioonanalüüsiga, kasutades nii juhuslikku kui ka suunatud mutageneesi (Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo, 2011; Mardo *et al.*, 2014 a; Lisa 1).

G. diazotrophicus'e, *B. subtilis*'e, *B. megaterium*'i ja *L. reuteri* levaansukraasides on kohtsuunatud mutageneesi abil tõestatud valkude katalüütilised nukleofiilid, need on vastavalt Asp135, Asp86, Asp95 ja Asp249 (vt Lisa 2). Nende positsioonide asendamine mõne teise

aminohapetega häirib väga tugevasti katalüüsi (Meng ja Fütterer, 2003; Ozimek *et al.*, 2006; Martínez-Fleites *et al.*, 2005; Homann *et al.*, 2007). Sisuliselt on sellised mutandid katalüütiliselt inaktiivsed (vt ka pt 1.1.1). Katalüütiliselt inaktiivsed mutandid on meie töögrupis tehtud ka *P. syringae* pv tomato Lsc3 (Mardo *et al.*, 2014 a) ja Lsc2 valkudel (Mardo *et al.*, 2014 b). Katalüütiliselt inaktiivseid valgumutante saab kasutada nende kristalliseerimisel koos natiivse substraadiga, sest substraadi seondumisele ei järgne selle kiiret hüdrolyüüsi (vt Tabel 1).

Sageli võib ka juhuslik mutagenees anda valgu kohta olulist informatsiooni. Näiteks juhusliku mutageneesiga sõeluti paljude mutantide seast välja *Z. mobilis*'e levaansukraasi katalüütiliselt inaktiivne mutant Glu278Asp (Yanase *et al.*, 2002). Glu278 on LevU valgus üks katalüütilise kolmiku aminohapetest, alus-hape katalüüsija (vt Lisa 2). Yanase *et al.* (2002) muteerisid *Z. mobilis*'e levaansukraasi plasmiidil asuvat geeni lämmastikushapetega. Seejärel kloneeriti muteeritud geen ümber teise plasmidi ja viidi *E. coli* rakkudesse. *E. coli* transformantide kolooniaid kasvatati sahharoosi sisaldaval söötmel ja jälgiti lima (levaani) teket. LevU valgus Glu278Asp varianti ekspresseeriva *E. coli* kolooniad olid mittelimesed. Mutandi Glu278Asp biokeemiline analüüs näitas, et tema k_{cat} sahharoosile langes üle 30 korra võrreldes algse valguga, samas afiinsus sahharoosile oluliselt ei muutunud. Samas positsioonis tehti ka Glu278 koht-suunatud asendus histidiiniga, mis põhjustas umbes 200-kordse k_{cat} väärtuse alanemise ning ka afiinsus sahharoosile langes märgatavalt, ~2.5 korda. Autorid järeldasid, et Glu278 on oluline glükosiidsideme lõhustamisel substraadis (Yanase *et al.*, 2002). Koht-suunatult uuriti *Z. mobilis*'e levaansukraasi positsiooni His296, milles tehti 9 asendust (Arg; Trp; Lys; Leu; Gln; Ser; Cys; Glu; Tyr). Mutantidel langes afiinsus sahharoosile drastiliselt (8-75 korda) ja mõnede mutantide puhul ei õnnestunud katalüütilist aktiivsust üldse tuvastada. Autorid järeldasid, et His296 ei osale otseselt sahharoosi hüdrolyüüsis ja transfruktosüülimisreaktsioonides, kuid on nende toimumiseks vajalik, sidudes aktiivtsentrisse substraati või aktseptorit (Li *et al.*, 2008). His321 (His296 homoloog) asendamine Lsc3 valgus tõi samuti kaasa väga suure afiinsuse languse sahharoosile ja olulise polümerisatsioonivõime alanemise (Visnapuu *et al.*, 2011). Joonisel 4 on näidatud Arg360 (His296 homoloog *B. subtilis*'e SacB valgus) roll levaansukraasi reaktsioonis.

Mutatsioonianalüüsiga on võimalik tuvastada positsioone, mis võiksid olla olulised sünteesitavate produktide spektris. Näiteks *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB Tyr429 või Arg433 asendusedalaniiniga või Arg360 asendamine seriiniga põhjustas selle, et mutandid ei suutnud enam polümeerset levaani sünteesida (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Li *et al.* (2011) ennustasid *L. reuteri* inulosukraasi kohta ilmunud töö (Ozimek *et al.*, 2006) alusel *Z.*

mobilis'e levaansukraasi substraaditasku -1 alampiirkonda kuuluvaid aminohappeid, konstrueerides vastavad mutandid ja uurides nende omadusi. Trp118Asn, Trp118His ja Arg193Lys mutandid praktiliselt kaotasid võime sünteesida levaani ja nende afiinsus sahharoosile ja ka transfruktosüüliv aktiivsus langes oluliselt. LevU mutantide Trp47Asn ja Trp47His sünteesitud FOS-ide spekter erines suurel määral muteerimata valgu omast – need mutandid ei suutnud sünteesida tri-, tetra- ja pentasahhariide (Li *et al.*, 2011).

Mutatsioonianalüüsiga saab välja selgitada ka valkude (termo)stabiilsuseks olulisi positsioone, et selle kaudu saada stabiilsemaid valke. Näiteks *Arthrobacter* sp. K-1 β -fruktofuranosidaasi termostabiilsus tõusis kui valgus tehti juhusliku mutageneesiga mitmeid asendusi. Mutatsioone viidi sisse vigaderohke PCR-i meetodiga, kasutades Diversity PCR süsteemi (Takara Bio Inc. Otsu, Japan). Nii saadi näiteks mutant, mille jääkaktiivsus pärast 30 min kuumutamist temperatuuril 55°C oli tõusnud 17%-lt (muteerimata valgu vastav väärtus) 84%-ni, samas oli mutandi sahharoosi lõhustav aktiivsus langenud 7 korda (Ohta *et al.*, 2014). Osa selles töös tehtud mutantidest on ka kristalliseeritud (www.pdb.org). Erinevalt gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidest vajavad grampositiivsete bakterite levaansukraasid stabiilsuseks Ca-ioone ja vastavat soola lisatakse alati ensüümi uurimisel kasutatavatesse puhvritesse. Kui *L. reuteri* 121 levaansukraasis muteeriti Ca²⁺ sidumises osalev aspartaatalaniiniks, siis langes ensüümi termostabiilsus ning ka katalüütiline aktiivsus (Ozimek *et al.*, 2005). *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgu muteerimisel selgus, et valgu N-terminaalsesse osasse tehtud asendused Asp31Asn ja Thr41Ile tegid valgu oluliselt termolabiilsemaks (Mardo, 2011; Lisa 1), samas Ca-iooni Lsc3 valgu struktuuri stabiliseerimiseks ei vajata (Visnapuu, 2012).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Kuna *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgul on biotehnoloogilist potentsiaali uudsete ja veel ebapiisavalt uuritud prebiootikumide (levaani ja levaani-tüüpi FOS-ide) sünteesiks, siis on selle ensüümi igakülgne iseloomustamine ja uute perspektiivsete ensüümivariantide konstrueerimine oluline. Selle töö eesmärgiks oli uurida meie poolt väljavalitud aminohapete olulisust ja rolli *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgu katalüüsis ja substraadivalikus, kasutades selleks valgumutantide konstrueerimist ja analüüsi.

Töös püstitati järgmised ülesanded:

- 1) Valida valgujoonduste ja kirjanduse alusel välja muteeritavad positsioonid Lsc3 valgus;
- 2) Konstrueerida, sünteesida ja puhastada mutantsed Lsc3 variandid;
- 3) Iseloomustada mutantsete valkude katalüütilisi ja biokeemilisi omadusi;
- 4) Interpreteerida mutantsete valkude omadusi ja seostada toimunud muutusi muteeritud aminohappe oletatava paiknemisega valgus.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Mutantsete levaansukraaside geenide ekspresseerimiseks kasutati kõrge koopiarvuga pURI3 vektorit (Rivas *et al.*, 2007; Curiel *et al.*, 2011), millesse kloneeriti *P. syringae* pv. tomato DC3000 *lsc3* muteeritud variandid nagu on näidatud artiklis Visnapuu *et al.* (2011) (vt pt 2.2.2). Metsiktüüpi *lsc3* geeni ekspresseerimiseks kasutati plasmidi pURI3-*lsc3* (Visnapuu *et al.*, 2011). Kõikide konstruktide puhul sünteesiti Lsc3 valk koos N-terminaalse His₆-järjestusega, mida kasutati valgu puhastamiseks. Töös kasutatud plasmiidid ja mutantsete variantide sisseviimiseks kasutatud praimerid on esitatud Tabelis 2.

Mutantseid levaansukraase ekspresseeriti *Escherichia coli* tüves BL21 (DE3) [*hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1)*] (Studier ja Moffatt, 1986), mille genoomis on LacUV5 promootor, mis IPTG (isopropüül-β-D-1-tiogalaktopüranosiid) lisamisel aktiveerib T7 polümeraasi sünteesi. Kloneeritud geenile eelneb T7 polümeraasi seondumisjärjestus (Rivas *et al.*, 2007).

Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid. Märgitud on plasmiid, mutatsiooni tekitava praimerini nimetus, praimerini järjestus ja viide allikale. Allajoonitud nukleotiidid tähistavad mutatsiooni asukohta praimeris. Halli taustaga on märgistatud muudetava aminohappe koodon.

Plasmiid	Praimer	Praimeri järjestus	Viide
pURI3	-	-	Rivas <i>et al.</i> , 2007
pURI3-lsc3	-	-	Visnapuu <i>et al.</i> , 2011
pURI3-lsc3W109A	W109ARev	5'-TGTCGATCTTCCC <u>GCGT</u> CACGC-3'	Gromkova, 2013
pURI3-lsc3E110D	E110DRev	5'-ATGTCGATCGT <u>CCC</u> CAGTCACGC-3'	Gromkova, 2013
pURI3-lsc3H113A	H113ARev	5'-CGCGGCCA <u>GCT</u> CGATCTTCC-3'	Gromkova, 2013
pURI3-lsc3E146Q	E146QRev	5'-GGTGTGCCCGCCCA <u>CTG</u> TCGAGTGGTGG-3'	Gromkova, 2013
pURI3-lsc3E236Q	E236QRev	5'-TCACCGGCGACATTGCC <u>CTG</u> AAACACCA-3'	Gromkova, 2013
pURI3-lsc3V248A	V248AFw	5'-TTCGCACACAG <u>CAG</u> GGGGTTGC-3'	Käesolev töö
pURI3-lsc3K322A	K322AFw	5'-CAGTCAC <u>GCGT</u> TCACGTATGCC-3'	Käesolev töö
pURI3-lsc3F323A	F323AFw	5'-AGTCACAAG <u>GCC</u> CACGTATGCC-3'	Käesolev töö
pURI3-lsc3F323H	F323HFw	5'-AGTCACAAG <u>CAC</u> CACGTATGCC-3'	Käesolev töö
pURI3-lsc3D383A	D383AFw	5'-TTCATC <u>GCC</u> CAGCGTGCCACC-3'	Käesolev töö

2.2.2 Mutantide konstrueerimine ja *lsc3* geeni klonimine pURI3 vektorisse

Mutatsioonide *lsc3* geeni viimiseks kasutati PCR-i põhiseid megaprimeri meetodit (Wei *et al.*, 2004). Kõikide muteerimise ja klonimise käigus vajalikes PCR-i etappides kasutati viguparandava aktiivsusega *Pfu* DNA polümeraasi (Thermo Scientific, USA). Megaprimerina kasutatav DNA fragment sünteesiti PCR-iga plasmiidilt pURI3-lsc3. Reaktsioonisegu sisaldas 0.025 U/μl *Pfu* polümeraasi, 1x *Pfu* puhvrit (Thermo Scientific, USA), 0.2 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; Thermo Scientific, USA), 4 mM MgSO₄ ja 0.5 pmol/μl mõlemat praimerit. Megaprimer sünteesiti kasutades muteerimispraimereid, mis on näidatud Tabelis 2). Vastasahela sünteesiks kasutati vastavalt kas päripraimerit T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') või vastupraimerit Ampsaba (5'-CTGAGATAGGTGCCTCAC-3'), sõltuvalt sellest, kas mutatsiooni asukoht on geeni alguses või lõpus. Muteerimispraimerid sisaldavad selliseid lämmastikaluse vahetusi, mis muudavad

vastavates positsioonides koodonit ja aminohappe muutubalaniiniks, aspartaadiks, glutamiiniks või histidiiniks (vt Tabel 2). Sünteesitud PCR-i produktid lahutati elektroforeesiga 1% agarosgeelil 0.5 x TAE puhvril (40 mM Tris-atsetaatpuhver, 1 mM EDTA; pH 8.2) toatemperatuuril pingel 10 V/cm. Agarosgeel sisaldas etiidiumbromiidi (0.35 µg/ml). Proovidele lisati 3 µl glütserooli ja broomfenoolsinist sisaldavat geelivärvi (0.05% broomfenoolsinine 50% glütseroolis). DNA fragmentide pikkuse hindamiseks kasutati GeneRuler™ 1 kb (Thermo Scientific, USA) markerit. DNA fragmente vaadati ultravioletvalguses (312 nm).

Õige pikkusega DNA fragmendid ehk megapraimerid lõigati geelist välja ning puhastati vastavalt tootja protokollile Ultra Clean™ 15 DNA puhastamise komplektiga (MoBio, USA). Kõik DNA fragmentide geelist puhastamised tehti eelpoolmainitud komplekti kasutades. Megapraimereid pikendati PCR-i reaktsiooniga (Wei *et al.*, 2004). Reaktsioonisegu sisaldas lisaks megapraimerile 1x *Pfu* puhvrit, 0.04 mM dNTP, 4 mM MgSO₄ ning 0.05 U/µl *Pfu* DNA polümeraasi. Matriitsina kasutati plasmidi pURI3-lsc3. Programm oli järgmine: 96°C 2 min, 60°C 2 min, 64°C 2 min, 68°C 5 min ning tsüklit korrati 20 korda. Saadud proove töödeldi restriктаasiga *DpnI* (Thermo Scientific, USA) lõppkontsentratsioon 0.2 U/µl 3 tundi temperatuuril 37°C ja seejärel ensüüm inaktiveeriti (20 min, 80°C). Järgnevalt paljundati PCR-iga muteeritud *lsc3* fragmenti (1467 ap). Selleks kasutati päripraimerina Lsc3pURI3Fw ja vastupraimerina Lsc3pURI3Rev (Visnapuu *et al.*, 2011). Produkti olemasolu ja pikkust kontrolliti 1% agarosgeelil ja see puhastati geelist. Järgnevalt kloneeriti mutantsed *lsc3* geenid pURI3 vektorisse PCR-i põhise ligaasivaba kloneerimise meetodiga (Visnapuu *et al.*, 2011; Vaher, 2013). Reaktsioonisegu sisaldas puhastatud *lsc3* geeni, vektorit pURI3, 0.01 mM dNTP, 1x *Pfu* puhvrit, 4 mM MgSO₄ ja 0.05 U/µl *Pfu* DNA polümeraasi. Sünteesiaeg ühes tsüklis oli 3 min. Saadud produkte töödeldi *DpnI*-ga (lõppkonts. 0.2 U/µl). Seejärel DNA puhastati. Puhastatud DNA-d restrikteeriti *NotI*-ga (lõppkonts. 0.2 U/µl; Thermo Scientific, USA). Segu puhastati etanooliga ja elektroporeeriti *E. coli* BL21 (DE3) tüvesse, kolooniad kontrolliti PCR-iga, eraldati plasmiidne DNA ning mutatsiooni asukohta kontrolliti sekveneerimisega (vt pt 2.2.3).

2.2.3 Elektroporatsioon, konstruktide kontrollimine, plasmiidse DNA eraldamine ja sekveneerimine

Mutantset *lsc3* geeni sisaldavad pURI3 plasmiidid viidi *E. coli* rakkudesse elektroporatsiooniga (Sharma ja Schimke, 1996). Bakterirakke kasvatati 5 ml LB (Luria-Bertani) söötmes 37°C loksutil kuni optilise tiheduse (OD₆₀₀) väärtuseni ~0.4. Bakterirakke

tsentrifuugiti 13 200 g 30 s ja rakke pesti 3 korda 10% steriilse glütserooliga, et vabaneda sooladest. Rakud suspendeeriti 50 µl samasuguses glütseroolilahuses. Elektroporatsiooniks pipeteeriti ette valmistatud rakud ja sadestatud kloneerimissegu või plasmiidne DNA steriilsesse elektroporatsiooni küvetti (Bio-Rad, USA) ja elektroporatsioon viidi läbi Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad, USA) süsteemiga pingel 2.5 kV. Seejärel kasvatati rakke 1 ml LB söötmes loksutil 37°C 1 h, tsentrifuugiti 1 min 12 000 g, plaaditi LB Amp (ampitsilliin; lõppkonts. 0.15 mg/ml) selektiivsöötmele ja söötmeplaate inkubeeriti 37°C ~20 h.

Üleöö kasvanud transformantide kolooniad külvati LB Amp tardsöötmele ning fenotüübi kontrollimiseks külvati need ka 10% sahharoosiga LB tardsöötmele, mis sisaldas ampitsilliini ja 1 mM IPTG-d (Lisa 1). Levaansukraasi süntees aktiveerub IPTG toimel ning aktiivse valgu olemasolul hakatakse sahharoosist levaani sünteesima. *lsc3* geeni olemasolu transformantide rakkudes kontrolliti PCR-iga. Reaktsioonisegu sisaldas 0.05 U/µl *Taq* DNA polümeraasi, 0.2 mM dNTP, 6.25 mM MgCl₂, 1x PCR puhvrit (Naxo, Eesti). Mõlema praimeris kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 0.5 pmol/µl. Päripraimerina kasutati Lsc1ja3Fw2 (5'-GCGATCGCCAAAGTACG-3') vastupraimerina Ampsaba (5'-CTGAGATAGGTGCCTCAC-3'). Tekkinud produktide olemasolu ja pikkust (452 ap) kontrolliti 1% agarosgeelil.

Kolooniatest eraldati plasmiidne DNA FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini komplektiga (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) vastavalt valmistajapoolsele protokollile. Selleks, et kindlaks teha mutatsioonide täpset asukohta ja vastavust, sekveneeriti konstrueeritud plasmiidides mutantset *lsc3* geeni sisaldavad piirkonnad. Sekveneerimiseks kasutati BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing *kit*-i (Applied Biosystems, Kanada). Plasmiidset DNA-d matriitsina kasutades tehti PCR, mille segu sisaldas 1x PCR puhvrit, 0.2 mM dNTP, 6.25 mM MgCl₂, 0.05 U/µl *Taq* DNA polümeraasi ja kumbagi praimerit 0.1 pmol/µl. Praimeritena kasutati T7 ja Lsc1ja3Rev1 (5'-TGCGCTTCGGTTTGATAATAGG-3'), millega paljundati *lsc3* geeni esimene pool (760 ap pikkune lõik). Levaansukraasi teine pool pikkusega 938 ap paljundati praimeritega Lsc1ja3Fw1 (5'-GCGATCGCCAAAGTACG-3') ja Ampsaba. Seejärel töödeldi proovid aluselise fosfataasiga FastAP (lõppkonts. 0.07 U/µl; Thermo Scientific, USA) ja eksonukleasiga *ExoI* (lõppkonts. 0.18 U/µl, Thermo Scientific, USA). Proove inkubeeriti 15 min 37°C ja ensüümide inaktiveerimiseks kuumutati 15 min 80°C. Seejärel sadestati DNA etanooliga ja suspendeeriti MQ vees. Proovid valmistati sekveneerimiseks kasutades tootjapoolseid reaktiive, 0.7 µl BigDye premiksi, 2 µl 5x lahjenduspuhvrit, 0.9 µl 4 pmol/µl praimerit, segu maht oli 10 µl. Proovid saadeti sekveneerimisele (TÜMRI teenused) ABI 3130xl Genetic Analyser või ABI 3730xl DNA

Analyser sekvenaatoriga (Applied Biosystems, Kanada). Saadud järjestusi võrreldi metsiktüüpi *lsc3* geeni järjestusega kasutades programmi BioEdit (Hall, 1999).

2.2.4 Levaansukraaside ekspressioon, rakuekstraktide tegemine, valkude puhastamine ja elektroforees

Mutantseid levaansukraase ekspresseervate transformantide kolooniad külvati 5 ml LB Amp vedelsöötmesse ja kasvatati üleöö 37°C loksutil. Bakterikultuurist tehti lahjendus 200 ml LB Amp söötmesse algtihedusega ~0.05 (OD₆₀₀) ja kasvati edasi loksutil temperatuuril 37°C kuni optilise tiheduse väärtuseni ~0.4-0.6. Valgu ekspressiooni indutseerimiseks lisati kultuurile 0.5 mM IPTG-d ja rakke kasvatati loksutil madalal temperatuuril (22°C) ~20 h. Rakud sadestati söötimest tsentrifugimisega (2400 g, 4°C, 10 min), pesti kaks korda 25 ml 100 mM fosfaatpuhvriga (pH 6.0) ning suspendeeriti 10 ml-is sonikeerimispuhvris (puhver A: 10 mM imidasool, 10% glütserool, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl; pH 6.0). Suspensiooni külmutati kolm korda vedelas lämmastikus ja sulatati toatemperatuuril olevas vees, et lõhkuda bakterite rakukesti ja suurendada valgusaagist. Seejärel töödeldi rakke sonikeerimisega (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole-Parmer Instrument Co., USA). Segusid tsentrifugiti 4°C 20 min 2400 g. Supernatant ja kõik valgu puhastamisel kasutatud lahused filtreeriti läbi 0.45 µm poorisuurusega filtrite.

Lsc3 valkude puhastamiseks rakulüsaatidest kasutati vedelikkromatograafia süsteemi ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) ja 1 ml Ni²⁺-afiinsuskromatograafia kolonne (HisTrap™ FF, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi). Ekspresseeritud levaansukraasid sisaldavad valgu N-terminaalses otsas His₆-järjestust, mis seondub kolonnis Ni-iooniga ning valk elueeritakse 700 mM imidasooli sisaldava puhvriga. Valgu puhastamiseks kasutati ÄKTAprime plus masina tootjapoolset metoodikat (programm: *Affinity purification any His-Trap*) ning puhta valgu kolonnist elueerimiseks kasutati puhvrit B (700 mM imidasool, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄; pH 6.0). Fraktsioonid koguti ning analüüsiti SDS-PAGE-il (Sambrook ja Russell, 2001). SDS-geeli lahutav osa sisaldas 10% polüakrüülamiidi. Proovid suspendeeriti 5 µl 2 x Laemmli puhvris, mis sisaldas 0.125 M Tris-i (pH 6.8), 0.001% broomfenoolsinist, 2% SDS-i, 20% glütserooli ning kuumutati 96°C 5 min. Valgud lahutati Mini-PROTEAN Tetra süsteemiga (BIO-RAD, USA) pingel 14 V/cm. Valkude suuruse hindamiseks kasutati valkude suurusmarkerit PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA). Geeli värviti Coomassie Brilliant Blue G250-ga ja värvitustati metanooli ja äädikhapet sisaldava pesulahusega.

SDS-geeli tulemuste alusel valiti välja Lsc3 valku sisaldavad fraktsioonid ja need liideti. Imidasooli sisaldava puhvri asendamiseks proove dialüüsi 12-14 kDa poorisuurusega ServaPor® membraanis (SERVA Electrophoresis GmbH, Saksamaa) McIlvaine'i puhvris (0.04 M sidrunhape, 0.13 M Na₂HPO₄, 0.02% Na-asiid; pH 6.0) 4°C. Puhvrit vahetati ~24 h jooksul kaks korda, et saada puhtam valgupreparaat. Seejärel kontsentreeri valgulahus Amicon Ultra (*M_w cutoff* 10 kDa, Millipore, Iirimaa) tsentrifugifiltritega (2400 g; 20 min; 4°C). Saadud preparaati kasutati puhta valguna.

2.2.5 Valgu kontsentratsiooni määramine

Valkude kontsentratsioonid (mg/ml) rakuekstraktides määrati Folini reaktiiviga Lowry meetodil (Lowry *et al.*, 1951) ning puhastatud valkudel määrati see spektrofotomeetriliselt (OD₂₈₀) ekstinktsioonikoeffitsendi (ϵ) järgi mikroplaadil (NanoQuantPlate; Tecan Group Ltd., Šveits), kasutades Tecan infinite M200 PRO™ (Tecan Group Ltd., Šveits) mikroplaadilugejat. 2 μ l valgulahust pipeteeriti mikroplaadile ja selle mõõdeti selle optiline tihedus (OD₂₈₀). Kontsentratsioonide arvutamisel kasutati valemit $C=A/\epsilon L$, kus C on kontsentratsioon (mg/ml), A on optilise tiheduse väärtus, ϵ on ekstinktsioonikoeffitsient ($\epsilon=1.665$) ja L on kihi paksus (0.05 cm). Ekstinktsioonikoeffitsendi väärtus arvutati valgujärjestuse alusel ExPasy serveris ProtParam tööriista abil (www.expasy.org) (Lisa 1).

2.2.6 Levaansukraasi koguaktiivsuse, kineetiliste parameetrite ja levaani tekke mõõtmine

Levaansukraasi koguaktiivsuse määramine glükoosi eraldumise järgi

Levaansukraasi koguaktiivsust mõõdeti glükoosi eraldumise algkiiruse järgi sahharoosi lõhustumisel. Selleks kasutati Glucose Liquicolor'i reaktiivi (Human GmbH, Saksamaa) ja eelnevalt väljatöötatud meetodit (Visnapuu *et al.*, 2008; Lisa 1). Reaktsioon viidi läbi 37°C termostaadis ja reaktsioonisegu sisaldas Na-asiidiga (0.02%) McIlvaine'i puhvrit (pH 6.0) ja sobivat kogust puhastatud valku. Sahharoosi kontsentratsioon varieeriti vahemikus 5-300 mM. Kindlatel ajapunktidel võeti välja 50 μ l proovi. Reaktsiooni peatamiseks pipeteeriti see 150 μ l Tris puhvrile (200 mM; pH 8.3) ja kuumutati 5 min 96°C Seejärel proovid jahutati jääl, neile lisati 800 μ l Glucose Liquicolor'i reaktiivi ja inkubeeriti 5 min temperatuuril 37°C. Glükoosi hulk proovis määrati spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 500 nm ning arvutusteks kasutati sama meetodiga saadud glükoosi kaliibrit (T. Visnapuu). Levaansukraasi koguaktiivsus väljendati sahharoosi lõhustamisel vabanenud glükoosi kogusena mikromoolides minutis mg valgu kohta (μ mol/min x mg ehk U/mg). Puhastatud mutantsete

levaansukraaside afiinsus sahharoosile (K_m ; mM) ja maksimaalne reaktsioonikiirus (V_{max} ; U/mg) arvutati algkiiruste kaudu Michaelis-Menten'i võrrandi alusel, kasutades programmi SigmaPlot 2001 (SYSTAT, USA) ensüümikineetika lisamoodulit (Enzyme Kinetics Module 1.1).

Substraadispetsiifika määramine redutseerivate suhkrute tekke järgi

Levaansukraasi substraadispetsiifikat hinnati sahharoosi ja rafinoosi lõhustamise algkiiruste järgi, mida määrati substraatidest vabanevate redutseerivate suhkrute moodustamise alusel. Selleks kasutati 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNS) reaktiivi (Miller, 1959). Reaktsioonisegu (1.5 ml) sisaldas 100 mM sahharoosi või rafinoosi, Na-asiidiga McIlvaine'i puhvrit (pH 6.0), kuhu oli lisatud sobiv kogus valku. Reaktsioon viidi läbi temperatuuril 37°C. Erinevatel aegadel võeti välja 200 µl proovi ning segati 400 µl DNS reaktiiviga. Proove kuumutati 5 min 100°C, jahutati jääl ja lisati 800 µl MQ vett ning nende optiline tihedus mõõdeti lainepikkusel 540 nm ning redutseerivate suhkrute kogus arvutati glükoosi lahusega tehtud kaliibergraafiku alusel. Levaansukraasi aktiivsus väljendati substraadist moodustunud redutseerivate suhkrute hulgana mikromoolides, mis tekkis 1 minuti jooksul 1 mg valgu kohta ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ ehk U/mg). Selle alusel arvutati rafinoosi ja sahharoosi kasutamise suhe, mis väljendati protsendina.

Mutantsete levaansukraaside afiinsus (K_m ; mM) rafinoosile ja maksimaalne reaktsioonikiirus (V_{max} ; U/mg) määrati DNS reaktiiviga, kasutades reaktsioonisegudes 50-300 mM rafinoosi kontsentratsioone. Kuna rafinoosi lõhustamisel vabaneb produktina melibioos ($\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Glcp}$), siis ei saa selle kiiruse mõõtmiseks kasutada sama meetodit nagu sahharoosi lõhustamise puhul, mil kvantiteeriti glükoosi vabanemist. Seetõttu mõõdeti rafinoosist redutseerivate suhkrute moodustumise algkiirusi 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNS) reaktiiviga. Rafinoos ja sahharoos on mitteredutseerivad suhkrud, nende lõhustamisproduktid, vastavalt melibioos ja fruktoos ning glükoos ja fruktoos, on aga redutseerivad suhkrud. Kuna lõhustamisel moodustub kaks molekuli redutseeruvat suhkrut, siis tuleb saadud V_{max} väärtus jagada kahega. Kineetilised parameetrid arvutati Michaelis-Menten'i võrrandi alusel nagu on kirjeldatud eespool.

Levaani sünteesi uurimine

Levaani sünteesi kineetikat vaadeldi mikrotiiterplaadil (Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol; CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Saksamaa) (Visnapuu *et al.*, 2011). Reaktsioon toimus mikroplaadi kannukestes mahuga 200 µl ja sisaldas erinevates kontsentratsioonides (300, 600 või 1200 mM) sahharoosi, McIlvaine'i puhvrit ja 2 µg (10

µg/ml) puhastatud valku. Mikrotiiterplaati inkubeeriti temperatuuril 37°C ja registreeriti polümeerse levaani teket 20 tunni jooksul lainepikkusel 400 nm Tecan infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Šveits) mikroplaadilugejal (Tecan Group Ltd., Šveits). Hägu teket mõõdeti iga 15 min tagant. Andmed koguti Tecan i-control™ 1.7 (Tecan Group Ltd.) programmiga (Lisa 1). Levaani kogus reaktsioonisegus arvutati puhastatud ja kuivatatud levaaniga tehtud kaliibergraafiku alusel, mille koostas Triinu Visnapuu. Arvutamiseks kasutati valemit $C \text{ (mg/ml)} = OD_{400} \times 18.3$

Transfruktosüüliva aktiivsuse määramine ja reaktsiooniproductide kromatograafiline analüüs

Levaansukraasi transfruktosüüliv (TA) ehk polümeriseeriv aktiivsus näitab sahharoosi või rafinoosi lõhustamisel eraldatud fruktoosijääkide protsenti, mis reaktsioonis polümeriseeritakse. Selle määramiseks toimiti järgmiselt. Segati kokku lõppkontsentratsiooniga 1200 mM sahharoosi (410.8 mg/ml) või 300 mM rafinoosi (151.3 mg/ml) ja 2.7 U/ml puhastatud levaansukraasi McIlvaine'i puhvril (pH 6.0; 0.02% Na-asiidiga). Lisatav valgu kogus sõltus mutantse valgu koguaktiivsusest, mis oli määratud 100 mM sahharoosiga 37°C-l. Proovi inkubeeriti 37°C 20 h ja reaktsioon peatati proovi kuumutamise temperatuuril 96°C 5 min. Seejärel tehti proovist sobiv lahjendus ja moodustunud produktid määrati kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga (HPLC) (Lisa 1). Vedelikkromatograafia ja esialgse andmeanalüüsi viis läbi meie töögrupi koostööpartner Heiki Vija Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudist (KBFI, Tallinn). Levaansukraasi transfruktosüüliv aktiivsus (TA) sahharoosi puhul arvutatakse valemiga $([Glc]-Fru_v)/[Glc] \times 100$, milles [Glc] näitab glükoosi ja [Fru_v] vaba polümeriseerimata fruktoosi kontsentratsiooni reaktsioonisegus. Rafinoosi puhul arvutatakse TA valemiga $([Mel]-Fru_v)/[Mel] \times 100$, milles [Mel] näitab melibioosi ja [Fru_v] vaba polümeriseerimata fruktoosi kontsentratsiooni reaktsioonisegus.

Õhukese kihi kromatograafia (*Thin Layer Chromatography* – TLC) tegemiseks kasutati sama reaktsioonisegu kui TA määramise puhul. 0.5 µl eelnevalt MQ vees 4 korda lahjendatud proovi kanti kontsentreeriva tsooniga TLC plaadi (TLC Silica gel 60 F₂₅₄; Merck, Saksamaa) stardijoonele ning seejärel plaat kuivatati. Suhkrumarkeriteks kasutati Lsc3 levaani (PA >7), nüstoosi (PA 4), 1-kestoosi (PA 3), sahharoosi (PA 2) ja fruktoosi (PA 1). TLC plaati voolutati segus kloroform:äädikhape:vesi (60:70:10) kaks korda plaadi ülemise servani, seda vahepeal kuivatades (Mardo *et al.*, 2014 b). Seejärel töödeldi plaati urea reaktiiviga (3% urea, 1 M fosforhape veega küllastatud butanoolis), et teha nähtavaks fruktoosi sisaldavad suhkrud (St. John *et al.*, 1996; Visnapuu *et al.*, 2009). Selleks, et detekteerida glükoosi sisaldavaid produkte (nt glükoosi, rafinoosi ja melibioosi), värviti plaati aniliini reaktiiviga

(1.2 g difenüülamiin, 1.2 g aniliinhüdrokloriid, 100 ml metanool, 10 ml konts. ortofosforhape). Plaati kuumutati ~10 min 120°C kuni suhkrulaikude värvumiseni.

2.2.7 Valkude termostabiilsuse määramine

Valkude termostabiilsuse mõõtmiseks kasutati Thermofluor'i meetodit (Pantoliano *et al.*, 2001). Valge Roche LightCycler® mikroplaadi kannukestesse pipeteeritud segu (kokku 20 µl) sisaldas 2 µM valku, 5x SYPRO® Orange (Sigma-Aldrich, Saksamaa) fluorestseeruvat värvi ja puhvrit (lõppkontsentratsioonid: 100 mM MES, pH 6.5; 150 mM NaCl). Mikroplaati tsentrifuugiti 20 s 136 g, et eemaldada õhumulle. Töötlus viidi läbi reaalaja PCR masinat LightCycler® 480 System (Roche, Šveits). Proovide temperatuuri tõsteti 25°C kraadist kuni 95°C kraadini ja samaaegselt mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust (465-580 nm) (Lisa 1). Andmed koguti LightCycler® 480 software (1.5.0 SP3) tarkvaraga ja neid töödeldiprogrammiga *Excel*. Valkude sulamistemperatuuriks T_m nimetatakse temperatuuri, mille juures pooled lahuses olevad valgumolekulid on denatureerunud.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Lsc3 valgu mutatsioonanalüüs: muteeritavate positsioonide valik

Meie töögrupis on uuritud ja põhjalikult iseloomustatud mitmeid erinevaid *P. syringae* DC3000 pv. tomato Lsc3 levaansukraasi mutante (Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo *et al.*, 2014 a; Lisa 1), sealhulgas on katseliselt kindlaks tehtud katalüütilise kolmiku (aktiivtsentri) aminohapped. Oleme näidanud, et Lsc3 aktiivtsentrisse kuuluvad Asp62, Asp219 ja Glu303, mis on vastavalt nukleofiil, vaheühendi stabiliseerija ja alus-hape katalüüsija. Nende aminohapete asendaminealaniiniga muudab valgu katalüütiliselt inaktiivseks (Elmi, 2011; Mardo *et al.*, 2014 a; Lisa 1). On kirjeldatud ka mutante, mille polümeriseerimisvõime on oluliselt langenud. Näiteks mitmed asendused Lsc3 valgu C-terminaalses piirkonnas nagu Gln301Ala, Thr302Pro ja His321Arg/Ser/Lys/Leu vähendasid oluliselt oligosahhariidide ja levaani sünteesi (Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo *et al.*, 2014 a). Seni on Lsc3 valgus iseloomustatud 22 positsiooni (publitseeritud on andmed 36 erineva mutandi kohta), mille asendamine mõjutab ensüümi katalüüsivõimet, afiinsust substraadile ja stabiilsust (Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo *et al.*, 2014 a; Lisa 1)

Käesolevas magistritöös analüüsin Lsc3 valgu 10 mutandi omadusi, võrreldes neid algse muteerimata valgu omadega. Muteeritud positsioone on kokku 9, ühes positsioonis tehti kaks asendust. Mitmete muteeritud positsioonide valikul tugineti kirjanduse andmetele. Nii asendati näiteks aminohappeid positsioonides, mida oli muteeritud *Z. mobilis*'e levaansukraasis LevU ja millega kaasnes valgu oluline omaduste muutus (Yanase *et al.*, 2002). Kõigist levaansukraasidest on LevU valku muteerimise kaudu ilmselt kõige põhjalikumalt analüüsitud. Kahjuks ei ole LevU valgu kristallstruktuur lahendatud ning seetõttu ei saa Yanase grupis tehtud mutatsioonide mõju otseselt siduda nende asukohaga valgus. Ka ei ole LevU valk järjestuselt eriti sarnane *B. subtilis*'e SacB ja *G. diazotrophicus*'e LsdA valkudele, mille kristallstruktuurid on olemas (vt Tabel 1). LevU identsus LsdA-ga aminohappelise järjestuse alusel on 43% ja SacB-ga ainult 25% (Vaher, 2013). Mõnede mutantide tegemisel lähtuti ka aminohapete konserveerumise määradest erinevates levaansukraasides (Mardo, 2011; Mardo *et al.*, 2014 a; vaata ka Lisa 1) ja aminohappe ennustatud paiknemisest Lsc3 valgus struktuuri modelleerimise andmete põhjal. Kõik selles töös muteeritud positsioonid on tähistatud 24 levaansukraasi ClustalW programmiga tehtud joondusel (Joonis 4, Joonis 6, Lisa 2). Samal Joonisel on tähistatud ka positsioonide konserveerumise analüüsi (Mardo, 2011; Mardo *et al.*, 2014 a) tulemusel saadud erinevate positsioonide konserveerumise astmed (KA). Järgnevalt põhjendan lähemalt Lsc3 valgus tehtud mutatsioonide valikut.

Positsioon **Trp109** valiti muteerimiseks *Z. mobilis*'e levaansukraasi LevU Trp80Arg mutandi (Yanase *et al.*, 2002) järgi. Lsc3 valgus vastab Trp80-le Trp109 (Joonis 5). LevU mutant Trp80Arg pärines juhuslikust mutageneesist (Yanase *et al.*, 2002). Selle positsiooni KA levaansukraasides on 6 (maksimaalne KA väärtus on 9). Joonduse alusel on teistes levaansukraasides vastavas positsioonis enamasti kas Trp või Phe, arhedel Pro (Joonis 4). LsdA visualiseeritud struktuuri alusel võiks Trp109 (vastab LsdA positsioonile Phe168) asuda aktiivtsentri lähedal (Joonis 5). Trp109 asendati Lsc3 valgusalaniiniga.

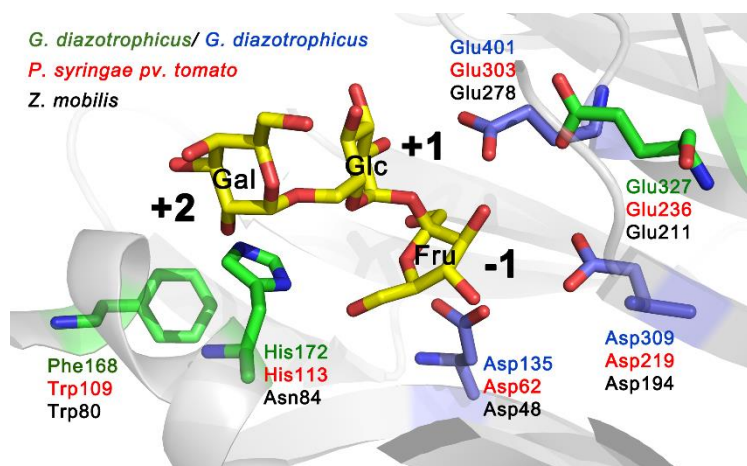
Positsioon **Glu110** paikneb struktuuriennustuse järgi aktiivtsentri suudme lähedal, lisaks ta on ta valgujärjestuses Trp109 kõrval ja valgumudelil ka His113 vahetus läheduses. Konserveerumisaste on sel positsioonil siiski suhteliselt madal, ainult 5. Selles positsioonis oleva glutamaadi asendamine aspartaadiga ei olnud juhuslik: vastavas positsioonis *G. diazotrophicus*'e ja *Arthrobacter* sp. K-1 levaansukraasides on aspartaat ja sisseviidud mutatsioon võiks Lsc3 valgu muuta nendele ensüümidele sarnasemaks (Joonis 4).

Konserveerimisaste	7378734365	7995494864	888579----	-----4	5924695874	5756-----	---4467898		
Q88BN6_Lsc3	101	GRYDIKRDWE	DREGRARMCY	WYSRTC----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREA	148
182678986_B.indica	139	-----YVFD	DREVHARIGF	FYRRACIPAN	Q---RPIDG	GWYGGHLFP	DGSSVKVFGN	VPMTQNAEWS	190
B2JVY2_B.phymatum	149	-----YTFD	DREVHARIGF	FYRRACIPAS	Q---RPANG	GWYGGHLFP	DGASVKVFGT	SPMTDNAEWS	200
Q3JGQ0_B.pseudomallei	144	-----YTFD	DREVHARIGF	FYRRACIPAS	Q---RPANG	GWYGGHLFP	DGASAKVFGT	APMTNNAEWS	195
Q8VW87_A.sp.K-1	151	-----FD	DREVEAKIGY	FYRPAQVPAE	E---RPENG	GWYGGHLVFK	EGVTGQIFED	QSFHSQTOES	200
304364376_A.viscosus	215	-----YTFD	DRETHARLGF	FYRKACTQTS	SADGANSSNG	GWYGGHVFP	DGASGSIFED	QSFSAQTEWS	270
302555562_S.viridochromogenes	126	-----FG	DREWYAKIGY	FYSRDA----	-----K	SWKYGGDLFP	ACTS-----	---FGSREA	157
296131231_C.flavigena	147	-----FG	DREWQARIQY	FYSQDA----	-----Q	NWYGGDLFP	AGSS-----	---FGSREA	178
Q93FU9_P.aurantiaca	92	GNYDITRDWN	DREGRARMCY	WYSRTC----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTAREA	139
Q43998_G.diazotrophicus	174	-----YGFD	DREVHARIGF	FYRRACIPAS	R---RPVNG	GWYGGHLFP	DGASAQVYAG	QTYTNQAEWS	225
Q46654_E.amylovora	85	GNYDITRDWE	DREGRARMCY	WYSRTC----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVA-----	---PTTREA	132
O54435_R.aquatilis	85	GNYDITSDWN	NREGRARMCY	WYSRTC----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTSREA	132
C3K8D6_P.fluorescens	85	GRYDIKRDWE	DREGRARMCY	WYSRTC----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREA	132
D1RZ84_S.odorifera	85	GNYDIKRDWE	DREGRARMCY	WYSRTC----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREA	132
Q48JY3_P.s.pv.phas	85	GRYDIKRDWE	DREGRARMCY	WYSRTC----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREA	132
Q48BC9_P.s.pv.phas	101	GRYDIKRDWE	DREGRARMCY	WYSRTC----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREA	148
Q60114_Z.mobilis	87	-----KYGWH	NRNDGARIGY	FYSRGG----	-----S	NWIFGGHLLK	DGAN-----	---PRSWEWS	119
58039338_G.oxydans	91	-----DTVEGWH	SRNYSYIGY	YYSRTC----	-----NGA	DWKEGGRVVK	EGAN-----	---SRSWEWS	130
15895050_C.acetobutylicum	110	-----FN	KRDVAEISY	FCSTDC----	-----E	NWYKGLAYN	VEDA-----	---LGSROFA	141
B9LT89_H.lacusprofundi	89	-----PG	KRDVAEIRC	FYSADG----	-----K	RWHDAGPVFD	GGA-----	---LGRQFA	119
300710312_H.jeotgali	56	-----PG	KRDVAEIRY	FYSRDC----	-----E	TWFDGGPVFE	GCTR-----	---GSRQFA	116
C7P4M9_H.mukohataei	92	-----PG	KRDVAEIRY	FYSADG----	-----R	TWQEGGVVFE	EP-----	---LGRQFA	121
Q5V249_H.marismortui	92	-----PG	KRDVAEIRC	FYSDDG----	-----R	NWKNACPVFE	EP-----	---LGRQFA	121
D5DC07_B.megaterium	134	-----	---NDTSVYL	FYKKAQ----	-----DKSID	SRKNACRVFK	DSDKFVPNDP	HLKNGTOEWS	173
P05655_B.subtilis	125	-----	---DDTSIYM	FYQKVE----	-----ETSID	SRKNACRVFK	DSDKFDANDS	ILKQDQTOEWS	164

Joonis 4. Väljavõte *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgu joondusest *Burkholderia indica*, *Burkholderia phymatum*'i, *Burkholderia pseudomallei*, *Arthrobacter* sp. K-1, *Actinomyces viscosus*'e, *Streptomyces viridochromogenes*'e, *Cellulomonas flavigena*, *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* (LscA), *G. diazotrophicus*'e (LsdA), *E. amylovora*, *Rahnella aquatilis*'e, *P. fluorescens*, *Serratia odorifera*, *P. syringae* pv. phaseolicola (Q48JY3), *P. syringae* pv. phaseolicola (Q48BC9), *Z. mobilis*'e, *G. oxydans*'i, *Clostridium acetobutylicum*'i, *Halorubrum lacusprofundi*, *Haloalkalicoccus jeotgali*, *Halomicrobium mukohataei*, *Haloarcula marismortui*, *B. megaterium*'i (SacB), *B. subtilis*'e (SacB) levaansukraasidega. Rohelisega on tähistatud magistritöös tehtud ja analüüsitud mutandid. Täispikk joondus asub Lisas 2.

Positsiooni **His113** KA on väga kõrge (9). *Z. mobilis*'e, *G. oxydans*'i levaansukraasi vastavas positsioonis on Asn (Joonis 4). Eelnevalt oli meie töögrupis uuritud mutanti His113Gln. See mutatsioon avastati Lsc3 valgu juhusliku mutageneesiga isoleeritud kaksikmutandis His113Gln/Val195Ile selle järgi, et *E. coli*'s ekspresseerituna ei moodustunud sahharoosiga

söötmele limaseid bakterikolooniaid (Mardo, 2011). Visualiseeritud *G. diazotrophicus*'e LsdA valgu struktuuris on homoloogilisel positsioonil His172, see paikneb aktiivtsentri lähedal, valgu β -propelleri I β -lehe 2. ja 3. β -ahela vahelisel lühikesel α -heeliksil (Joonis 5) ning tema kõrvalahel on suunatud aktiivtsentri poole. Tegin oma magistritöö jaoks mutandi His113Ala, et uurida traditsioonilise asenduse mõju Lsc3 valgule.



Joonis 5. *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi LsdA (PDB ID: 1W18) PyMOL programmiga visualiseeritud katalüütiline tsepter. Katalüütiline kolmik (Asp135, Asp309 ja Glu401) on tähistatud sinise värviga. Rafinoosi molekul pärineb *B. subtilis*'e rafinoosiga kompleksis kristalliseeritud levaansukraasist (PDB ID: 3BYN). Joonisel on näidatud levaansukraasi Lsc3 positsioonid Trp109, His113 ja Glu236. Vastavad positsioonid erinevates bakterite levaansukraasides on tähistatud erinevate värvidega: *Z. mobilis*'e levaansukraas LevU (must), *P. syringae* pv. *tomato* Lsc3 (punane) ja *G. diazotrophicus* LsdA (roheline ja sinine) (Lisa 1).

Mutandid **Glu146Gln** ja **Glu236Gln** tehti *Z. mobilis*'e LevU muutunud omadustega mutante aluseks võttes (Yanase *et al.*, 2002). Glu146 (vastab LevU valgus Glu117-le) asub valguahelas Trp147 kõrval. Lsc3 valgu Trp147 vastab *B. subtilis*'e SacB valgu Trp163-le, mis paikneb aktiivtsentri -1 alampiirkonnas ja aitab substraadi seostumistasku jaoks moodustada hüdrofoobset pinda (Homann *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011). Glu246 vastab *Z. mobilis*'e LevU valgus Glu211-le. Need mõlemad positsioonid, Glu146 ja Glu236, võiksid mõjutada polümerisatsiooni, aga ka ensüümi võimet substraati siduda ja lõhustada, sest asuvad aktiivtsentri piirkonnas ja on kõrgelt konserveerunud (Joonised 4, 5 ja 6).

Konserveerumisaste	9889	77416	8	23124	7988989988	69598	88	5561						
Q88BN6_Lsc3	235	FEEN	-----VAGER	C-----SHTVG	249	313	YYLFTSHKRF	323	376	-----LVDSF	-----ID	SVPT	-----	387
182678986_B.indica	302	FEEN	-----TAVQR	C-----SRST	316	387	YYLFTSHRRT	397	468	-----LVDSF	-----ID	AIGT	-----	479
B2JVY2_B.phymatum	300	FEEN	-----TGGPR	C-----ARTCT	314	385	YYLFTSHRRT	395	466	-----LVDSF	-----ID	AIGS	-----	477
Q3JGQ0_B.pseudomallei	295	FEEN	-----TGGPR	C-----ARTCT	309	380	YYLFTSHRRT	390	461	-----LVDSF	-----ID	AIGA	-----	472
8QVW87_A.sp.K-1	299	FEEN	-----SAMQR	E-----TATCN	313	384	SVLFTSHRC	394	465	-----LVDSF	-----ID	TIGT	-----	476
304364376_A.viscosus	384	FEENSAFVRE	QQYVDAAKA	CONTAVATC	413	484	YYLFTSHRRE	494	565	-----LVDSF	-----ID	SIGG	-----	576
302555562_S.viridochromogenes	256	FEEN	-----TGFTA	C-----SYOCT	270	334	YYLFTSHKRF	344	397	-----LVDSF	-----ID	TVPT	-----	408
296131231_C.flavigena	278	FEEN	-----NGGVA	C-----SHRCD	392	356	YYLFTSHRMT	366	419	-----LVDSF	-----ID	TVPT	-----	430
Q93FU9_P.aurantiaca	226	FEEN	-----VAGER	C-----SHKVG	240	304	YYLFTSHRFT	314	367	-----LVDSF	-----ID	SVPT	-----D	379
Q43998_G.diazotrophicus	326	FEEN	-----TAGQR	C-----VANCT	340	411	YYLFTSHRRT	421	492	-----LVDSF	-----ID	TVEN	-----	503
Q46654_E.amylovora	219	FEEN	-----VAGER	C-----SHEIT	233	297	YYLFTSHKY	307	360	-----LVDSF	-----ID	SVPW	-----	371
O54435_R.aquatilis	219	FEEN	-----VAGER	C-----SHVIG	233	297	YYLFTSHKRF	307	360	-----LVDSF	-----ID	NVPT	-----	371
C3R8D6_P.fluorescens	219	FEEN	-----VAGER	C-----THEVG	233	297	YYLFTSHKRF	307	360	-----LVDSF	-----ID	SVPT	-----	371
D1RZ84_S.odorifera	219	FEEN	-----VAGDR	C-----SHVVG	233	297	YYLFTSHKRF	307	360	-----LVDSF	-----ID	SVPT	-----	371
Q48JY3_P.s.pv.phas	219	FEEN	-----VAGER	C-----THTVG	233	297	YYLFTSHKRF	307	360	-----LVDSF	-----ID	SVPT	-----	371
Q48BC9_P.s.pv.phas	235	FEEN	-----VAGER	C-----SHTVG	249	313	YYLFTSHKRF	323	376	-----LVDSF	-----ID	SVPT	-----	387
Q60114_Z.mobilis	210	FEEN	-----VAMER	C-----TVAVG	224	288	YYLFTSHHS	298	352	-----LVDSF	-----ID	TIPS	-----	363
58039338_G.oxydans	221	FEEN	-----VPMR	C-----DFTIG	235	303	YYLFTSHHS	313	367	-----LVDSF	-----ID	TLPPQSADP	-----	384
15895050_C.acetobutylicum	238	FEEN	-----KGGK	-----IEKMK	250	316	YYLFTSHKRF	326	379	-----LVDSF	-----ID	EYHF	-----	390
B9LT89_H.lacusprofundi	215	FEEN	-----	-----	218	281	YYLVCSLHV	291	345	EEVLQSEFLN	YYDFAGDSL	ADAD	-----LP	370
300710312_H.jeotgali	213	FEEN	-----TPIPE	C-----AGACG	227	278	YYLVVSSHHD	288	342	EELVSEFFN	YYDLGLLTD	DVAT	-----LS	367
C7P4M9_H.mukohataei	216	FEEN	-----TPVPA	A-----SDACG	230	282	YYLVVSSHHD	292	346	EEVLQSEFFN	YYDFEADSD	RVAD	-----LP	371
Q5V249_H.marismortui	217	FEEN	-----TPVPE	C-----SDVCG	231	283	YYLTISSHLH	293	347	DEVLQSEFFN	YYDFGETD	EIAH	-----LS	382
D5DC07_B.megaterium	271	FEEN	-----TGTED	CYQGEDSLN	289	362	YYLFTSRGS	372	432	DNVVTSY	-----MT	NRGF	-----	445
P05655_B.subtilis	261	FEEN	-----TGTED	CYQGEESLN	279	352	YYLFTSRGS	362	422	NNVVTSY	-----MT	NRGF	-----	435

Joonis 6. *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgu joondus *Burkholderia indica*, *Burkholderia phymatum*'i, *Burkholderia pseudomallei*, *Arthrobacter* sp. K-1, *Actinomyces viscosus*'e *Streptomyces viridochromogenes*'e, *Cellulomonas flavigena*, *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* (LscA), *G. diazotrophicus*'e (LsdA), *E. amylovora*, *Rahnella aquatilis*'e, *P. fluorescens*, *Serratia odorifera*, *P. syringae* pv. phaseolicola (Q48JY3), *P. syringae* pv. phaseolicola (Q48BC9), *Z. mobilis*'e, *G. oxydans*'i, *Clostridium acetobutylicum*'i, *Halorubrum lacusprofundi*, *Haloalkalicoccus jeotgali*, *Halomicrobium mukohataei*, *Haloarcula marismortui*, *B. megaterium*'i (SacB), *B. subtilis*'e (SacB) levaansukraasidega. Rohelisega on tähistatud magistritöös käsitletud mutandid.

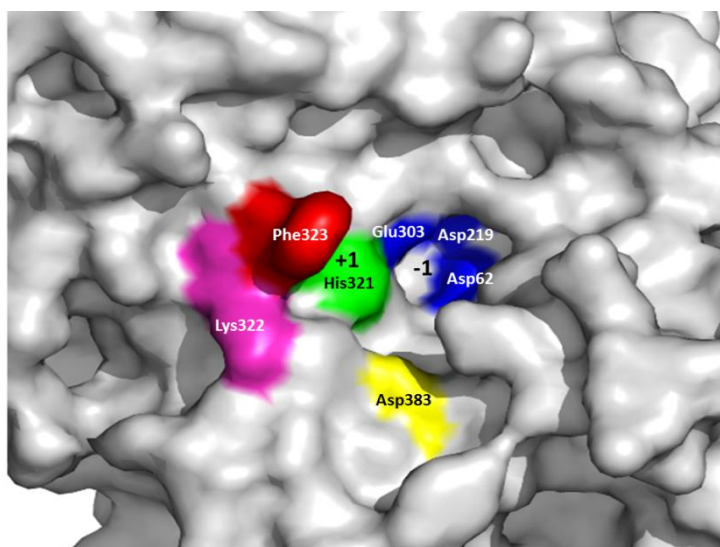
Positsioon **Val248** valiti muteerimiseks *Z. mobilis*'e LevU mutandi (Val223Ala) alusel. Val248 ei ole konserveerunud, selle positsiooni KA on levaansukraasides 4 (Joonis 6). Teistes levaansukraasides on selles positsioonis näiteks Ile, Cys, Met, Tyr või Phe. Vastavas positsioonis *G. diazotrophicus*'e LsdA valgus on Cys (Cys339). Kristallstruktuuri järgi moodustavad Cys339 ja Cys395 disulfiidsilla ja stabiliseerivad sellega valku. Tsüsteiini asendaminealaniiniga alandas sahharoosi lõhustamise katalüütilist konstanti LsdA valgul umbes 60 korda (Martínez-Fleites *et al.*, 2005). Kuna Lsc3 valgus S-S sillad ennustuse kohaselt puuduvad (Visnapuu *et al.*, 2008), võib Val248 siiski olla oluline valgu stabiliseerimiseks.

Positsioon **Lys322** paikneb Lsc3 valgujärjestuses polümeerisatsiooniks väga olulise histidiini (His321; Visnapuu *et al.*, 2011) kõrval ja vastab joonduse alusel *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB aminohappele Gly361 (Joonis 6). See positsioon ei ole levaansukraasides konserveerunud (KA 3). Teistel levaansukraasidel on selles positsioonis kas His, Arg, Gly, Asp, Leu või Met.

Positsioon **Phe323** (KA 5) ei ole levaansukraasides konserveerunud (Joonis 6). Phe323 paikneb Lsc3 valgu struktuuri mudeli alusel valgu pinnal ja polümeerisatsiooniks vajalikule positsioonile His321 (Visnapuu *et al.*, 2011) suhteliselt lähedal (Joonis 7). Seega võiks antud positsioon kuuluda substraaditasku +1 alampiirkonda. Phe323-ga joondub *B. megaterium*'i

levaansukraasil Ser372, mille asendaminealaniiniga selles levaansukraasis ei toonud esile suurt erinevust katalüüsis võrreldes algse valguga (Strube *et al.*, 2011). Aga arvestades seda, et Lsc3 on SacB-ga väga vähe sarnane ja et see positsioon ei ole levaansukraasides eriti konserveerunud, ei pruugi joonduva positsiooni muteerimine anda sama tulemust. Teistel levaansukraasidel on selles positsioonis näiteks Tyr, Ser, Thr, halobakteritel aga His (Joonis 6). Otsustasime asendada Phe323 Lsc3 valgus Ala ja His-ga.

Asp383 (KA 8) (Joonis 6) asub Lsc3 valgumudelil samuti suhteliselt lähedal His321-le (Joonis 7). Oletasime, et ta võiks kuuluda substraaditasku kas +1 või +2 alampiirkonda. Otsustasime selle aminohappe asendadaalaniiniga. Selle positsiooni mutanti pole levaansukraasides varem uuritud.



Joonis 7. Lsc3 valgumudelil aktiivtsentri ümbruses ennustatuna *G. diazotrophicus*'e LsdA kristallstruktuuri baasil (PDB ID: 1W18). Sinisega on tähistatud katalüütilise kolmiku aminohapped (Asp62, Asp219 ja Glu303), rohelisega His321, roosaga Lys322, punasega Phe323 ja kollasega Asp383. Lsc3 struktuuri modelleeris K. Mardo.

2.3.2 Levaansukraasi Lsc3 mutantide iseloomustamine ning struktuuri ja funktsiooni vahelised seosed

Valitud Lsc3 positsioonide muteerimiseks kasutati kohtsuunatud PCR-põhist meetodikat (pt 2.2.2; Lisa 1). Mutantset *lsc3* geeni sisaldavad konstruktid viidi *E. coli* BL21 (DE3) tüvesse ning valgumudelil ekspresseeriti IPTG-ga (pt 2.2.4). Kõik valgud olid tugeva ekspressiooniga ja valdav enamik neist puhastusid efektiivselt, kuigi ühe mutandi (Glu110Ala) puhul ei olnud puhastamine võimalik. Mutandi Glu110Ala ekspressioon oli tugev, kuid ta ei seondunud valgumudelil puhastamise kolonnile. Oletame, et glutamaadi asendaminealaniiniga antud positsioonis muudab valgumudelil struktuuri nii, et valgumudelil histidiinisaba ei ole enam pinnal eksponeeritud ja seetõttu ei saa seonduda Ni²⁺-ga. Puhastamisel selgus, et mutandid

Phe323Ala, Phe323His ja Asp383Ala sadenevad valgu kontsentreerimisel, seega võiksid need positsioonid olla olulised valgu lahustuvuses ja stabiilsuses.

2.3.2.1 Mutantsete valkude substraadispetsiifika ja kineetilised parameetrid

Kineetiliste parameetrite määramiseks mõõdeti mutantsetel Lsc3 variantidel sahharoosi ja rafinoosi lõhustamise algkiirusi substraadi erinevatel kontsentratsioonidel ja andmeid töödeldi nagu kirjeldatud peatükis 2.2.6. Tulemused on kokku võetud Tabelis 3 ja Joonisel 8.

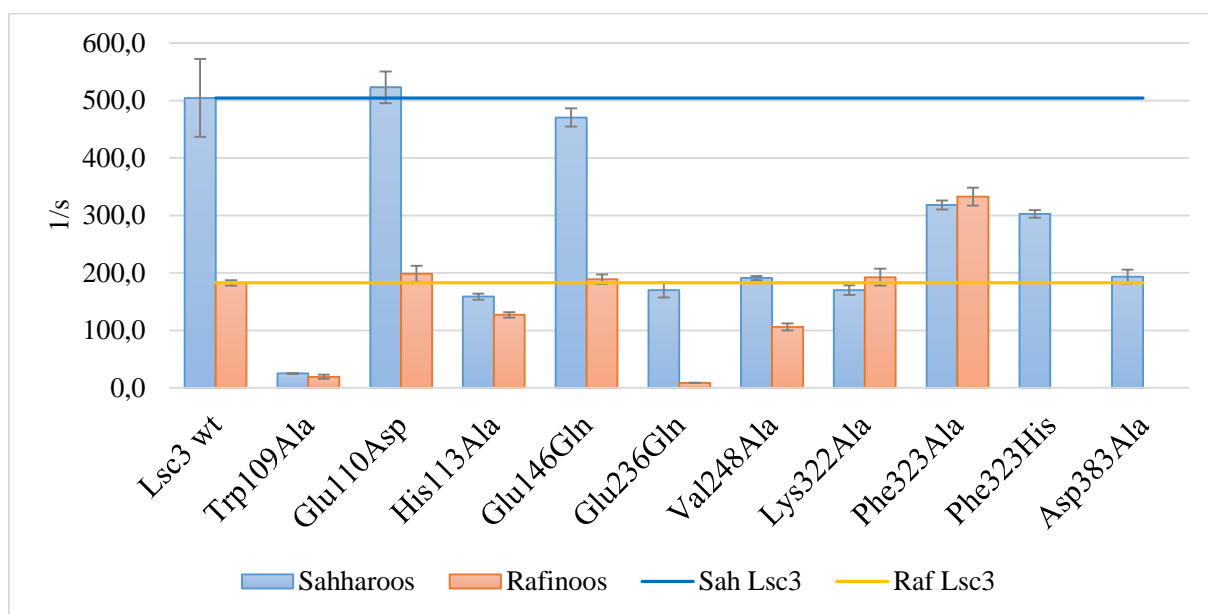
Tabel 3. Lsc3 valgu mutantide sahharoosi ja rafinoosi lõhustamise kineetilised parameetrid: afiinsus (K_m), maksimaalne reaktsioonikiirus (V_{max}) ja katalüütiline efektiivsus (k_{cat}/K_m). Võrdluseks toodud muteerimata Lsc3 valgu (Lsc3 wt) andmed on saadud T. Visnapuult.

Valk	Sahharoos			Rafinoos		
	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	k_{cat}/K_m (1/mM x s)	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	k_{cat}/K_m (1/mM x s)
Lsc3 wt	18.5 ± 2.5*	610.5 ± 82.0*	27.3 ± 3.7	44.8 ± 3.4 ^b	221.1 ± 5.7 ^b	4.1 ± 0.2
Trp109Ala	29.8 ± 3.3 ^a	30.2 ± 0.8	0.84 ± 0.1	146.4 ± 44.9	23.5 ± 2.2	0.1 ± 0.02
Glu110Asp	57.6 ± 9.7 ^a	633.2 ± 33.2	9.1 ± 1.0	80.7 ± 13.1	240.5 ± 17.7	2.5 ± 0.3
His113Ala	170.4 ± 17.0 ^a	192.2 ± 6.4	0.9 ± 0.1	113.2 ± 13.2	153.9 ± 5.8	1.1 ± 0.1
Glu146Gln	40.6 ± 5.0 ^a	569.2 ± 19.2	11.6 ± 0.9	53.8 ± 9.7	228.5 ± 10.2	3.5 ± 0.4
Glu236Gln	267.1 ± 40.2 ^a	206.0 ± 16.0	0.6 ± 0.1	66.5 ± 7.7	10.3 ± 0.3	0.1 ± 0.01
Val248Ala	14.1 ± 1.1 ^a	240.0 ± 4.5	13.5 ± 0.7	30.4 ± 5.6	133.2 ± 7.7	3.5 ± 0.4
Lys322Ala	17.8 ± 3.3	206.0 ± 10.6	9.6 ± 1.1	76.8 ± 14.0	233.2 ± 17.7	2.5 ± 0.3
Phe323Ala	12.4 ± 1.3	358.5 ± 9.4	25.7 ± 1.7	87.6 ± 10.0	402.6 ± 18.7	3.8 ± 0.3
Phe323His	14.1 ± 1.3	366.9 ± 8.2	21.5 ± 1.2	-	-	-
Asp383Ala	23.5 ± 4.7	234.5 ± 14.3	8.3 ± 1.1	-	-	-

*, Visnapuu *et al.*, 2011; ^a, Lisa 1; ^b, T. Visnapuu avaldamata andmed; -, ei saanud määrata.

Tabelist 3 ilmneb, et sahharoosi lõhustamise katalüütiline efektiivsus on kõige enam (27-40 korda) langenud mutantidel Trp109Ala, His113Ala ja Glu236Gln. Neile vastavad positsioonid on tähistatud ka LsdA struktuuril (Joonis 5). Kõik need positsioonid võiksid olla substraaditaskusse seostuvale sahharoosile (ja rafinoosile) väga lähedal ja osaleda selle fikseerimises. Mutantide His113Ala ja Glu236Gln puhul on näha väga tugevat afiinsuse

langusest sahharoosile (Tabel 3), mutandi Trp109Ala puhul on afiinsus langenud vähem, kuid k_{cat} väärtus palju rohkem (~20 korda) (Tabel 3; Joonis 8).



Joonis 8. Sahharoosi ja rafinoosi lõhustamise k_{cat} (1/s) väärtused. Sinisega on märgitud sahharoosi ja oranžiga rafinoosi vastavad väärtused. Lsc3 wt valguga k_{cat} tasemed on märgitud vastavalt sinise ja oranži joonega.

Meie varasemad tulemused on näidanud, et kui Trp109 asendada arginiiniga, siis on sahharoosi kasutamine veel tugevamalt häiritud kui mutandil Trp109Ala. Mutandil Trp109Arg tõusis K_m sahharoosile 249 mM-ni ning katalüütiline efektiivsus langes võrreldes algse valguga 450 korda (Lisa 1). Trp109-le vastavas positsioonis on gramnegatiivsete bakterite levaansukraasides kas Trp või Phe (Joonis 4). Järeldame, et selles positsioonis peaks normaalseks katalüüsiks olema hüdrofoobne aromaadne aminohape, kas Trp või Phe, mille asendaminealaniiniga võimaldab vähest katalüüsi, samas selle asendamine hüdrofiilse positiivse laenguga aminohappega (Arg) muudab valguga praktiliselt katalüütiliselt inaktiivseks. Sellega on heas kooskõlas see, et meie poolt varem tehtud Lsc3 valguga mutant Trp109Phe oli sahharoosi lõhustamiselt suhteliselt sarnane muteerimata Lsc3 valguga (Lisa 1). LevU mutandil Trp80Arg nii drastilist muutust katalüüsis ei olnud: sahharoosi lõhustamise katalüütiline efektiivsus langes 2.5 korda ja K_m suurenes 1.5 korda (Yanase *et al.*, 2002). Rafinoosi kasutamine LevU mutandil Trp80Arg vähenes 10% võrra. Ka Lsc3 mutandil Trp109Arg puhul alanen rafinoosi kasutamise võime, kuid palju rohkem – üle 2 korra (T. Visnapuu, avaldamata andmed). Kokkuvõttes võib öelda, et positsioon Trp109 on väga oluline Lsc3 valgus nii rafinoosi kui ka sahharoosi kasutamisel. Oletame, et Trp ja Phe võivad osaleda substraaditasku hüdrofoobse pinna moodustamisel. Hüdrofoobsete aminohapete rolli substraaditasku voorderdamisel on GH32 ja GH68 perekondade valkudel ka varem kirjeldatud (Lammens *et al.*, 2009).

His113-le vastav positsioon on konserveerunud gramnegatiivsete bakterite ja arhede levaansukraasides (Joonis 4) ning Glu236-le vastav positsioon ka grampositiivsete bakterite levaansukraasides (Joonis 6). Meie grupis varem konstrueeritud His113Gln mutandil oli sahharoosi lõhustamise k_{cat} üle 10 korra langenud (Mardo, 2011; Lisa 1). Seega mõjus asendus glutamiiniga valgu katalüüsivõimele drastilisemalt kui asendusalaniiniga, mille tagajärjel alanes k_{cat} ~3 korda (Tabel 3). *Z. mobilis*'e levaansukraasi Glu211Gln mutandil (vastab Lsc3 Glu236-le) oli katalüütiline efektiivsus sahharoosi lõhustamisel langenud 22 korda (Yanase *et al.*, 2002). Seega on selle mutandi fenotüüp võrreldav Lsc3 valgu Glu236Gln omaga. Järeldame, et nii His113 kui ka Glu236 on olulised Lsc3 valgus nii sahharoosi sidumisel kui ka lõhustamisel.

Kui hinnata rafinoosi kasutamist, siis on ka see näitaja uuritud 10-st Lsc3 variandist kõige rohkem häiritud mutantidel Trp109Ala, His113Ala ja Glu236Gln. Rafinoosi lõhustamise katalüütiline efektiivsus on neil ~35 korda vähenenud võrreldes algse valguga. Rafinoosi lõhustamise k_{cat} langes kõige enam (~20 korda) mutandil Glu236Gln. Meie andmetel on mutantidel His113Ala ja Glu236Gln veidi muutunud ka substraadikasutus: kuigi His113Ala kasutab nii sahharoosi kui rafinoosi algsest valgust palju halvemini, on tema k_{cat} ja katalüütiline efektiivsus rafinoosi lõhustamisel langenud vähem kui sahharoosi puhul. Mutandil Glu236Gln on afiinsus sahharoosile langenud palju rohkem (14 korda) kui rafinoosile (1.4 korda) (Tabel 3; Joonis 8).

Mutantide **Glu110Asp** ja **Glu146Gln** afiinsused sahharoosile ja rafinoosile olid langenud 2-3 korda (Tabel 3). *Z. mobilis*'e levaansukraasi mutant Glu117Gln, mis on homoloogne Lsc3 mutandile Glu146Gln, oli rohkem mõjutatud: afiinsus sahharoosile langes 4 korda ja katalüütiline efektiivsus 4.5 korda (Yanase *et al.*, 2002). Mutandil Glu146Gln puhul on näha ka muutus substraadivalikus: tema katalüütiline efektiivsus rafinoosi lõhustamisel oli langenud vähem kui sahharoosi lõhustamisel (Tabel 3). Proovisime ennustada *B. subtilis*'e kristalliseeritud levaansukraasi struktuuri abil Glu146 asukohta valgus. Glu146-le homoloogiline positsioon *B. subtilis*'e levaansukraasis asub aktiivtsentrist veidi eemal ning tema külghel on suunatud aktiivtsentrist eemale. See asetus ei pruugi kehtida Lsc3 valgu kohta, sest SacB ja Lsc3 valk on järjestuselt väga erinevad. Igal juhul mõjutas Glu146Gln asendus nii sahharoosi kasutamist (katalüütiline efektiivsus langes, kuid FOS-e sünteesiti rohkem) kui ka substraadieelistust, mis muutus rafinoosi kasuks (Tabel 3, Joonis 8). Glu110-le homoloogilist positsiooni pole varem levaansukraasides muteeritud. Kuna Glu110Ala valku ei õnnestunud meil puhastada, siis selle puhul määrati sahharoosi lõhustamise aktiivsust

rakulüsaadis. Määramine näitas ca 10-kordset aktiivsuse langust võrreldes metsiktüüpi valguga.

Lsc3 valgu **Val248Ala** mutandil oli afiinsus nii sahharoosile kui ka rafinoosile veidi suurem kui muteerimata valgul. Sahharoosi lõhustamise katalüütiline efektiivsus oli alanenud rohkem kui rafinoosi lõhustamise oma, seega oli muutunud mutandi substraadieelistus rafinoosi kasuks (Tabel 3). Levaansukraasides on Val248-le vastavas positsioonis küll vaid hüdrofoobsed aminohapped, kuid positsiooni konserveerumisaste on suhteliselt madal, vaid 5 (Joonis 6). Vastav *Z. mobilis*'e levaansukraasi mutatsioon Val233Ala põhjustas tunduvalt suuremaid muutusi kui meie tähendasime Lsc3 valgu puhul. Sellel mutandil oli afiinsus sahharoosile alanenud 8 korda ja katalüütiline efektiivsus liigikaudu 90 korda (Yanase *et al.*, 2002).

Lys322 asendaminealaniiniga alandas sahharoosi lõhustamise katalüütilist konstanti ja efektiivsust ligikaudu kolm korda. *B. subtilis*'e levaansukraasis on tehtud mutant, kus Gly361 (vastab Lsc3 Lys322-le) asendati fenüülalaniiniga. See asendus mõjutas katalüüsi rohkem: afiinsus sahharoosile langes üle 35 korra ja katalüütiline efektiivsus üle 100 korra. Lisaks oli valk ebastabiilne ja sünteesis algsest valgust rohkem FOS-e ja vähem polümeerset levaani (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Samas Lsc3 valgus Lys322 muteeriminealaniiniks FOS-ide sünteesi ja spektrit ning levaani teket märkimisväärselt ei mõjutanud (Joonis 9 ja 11). Huvitaval kombel oli Lsc3 Lys322Ala mutandil rafinoosi lõhustamise k_{cat} suurem kui sahharoosi lõhustamise k_{cat} (Joonis 8), seega oli tema substraadieelistus võrreldes muteerimata valguga tunduvalt muutunud. Ka katalüütilise efektiivsuse järgi kasutas ta rafinoosi paremini kui sahharoosi (Tabel 3). Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasides on selles positsioonis tüüpiliselt kas Lys või Arg, kuid näiteks *Z. mobilis*'e LevU valgus ja *E. amylovora* levaansukraasis on seal His. Need on kõik positiivselt laetud aminohapped. Kui *E. amylovora* kristallstruktuuri andmed publitseeritakse, siis on ilmselt võimalik selle positsiooni paiknemist (Joonis 7) Lsc3 valgus täpsemalt ennustada.

Phe323Ala ja **Phe323His** positsioonide mutandid on sahharoosi lõhustamise poolest omavahel üsna sarnased: mõlemad seovad sahharoosi hästi ja reaktsiooni katalüütiline efektiivsus oli alanenud võrreldes algse valguga ainult 1.7 korda. Suur erinevus metsiktüüpi valgust tuleb neil esile rafinoosi kasutamisel. Mutandi Phe323Ala afiinsus rafinoosile oli langenud umbes 2 korda võrreldes muteerimata valguga, samas rafinoosi lõhustamise k_{cat} oli tõusnud peaaegu 2 korda. Phe323His mutandi K_m rafinoosi lõhustamisel ei saanud määrata, sest kõrgematel rafinoosi kontsentratsioonidel ei olnud ensüüm reaktsioonivõimeline. Arhede

levaansukraasides (Joonis 6) on vastaval positsioonil His, kuid kuna neid levaansukraase ei ole valgu tasemel üldse uuritud, ei ole teada, kas ja kui hästi nad rafinoosi lõhustavad.

Mutant **Asp383Ala** sarnanes sahharoosi ja rafinoosi lõhustamise mustri poolest mutandiga Phe323His. Mutandi Asp383Ala afiinsus sahharoosi lõhustamisel oli peaaegu sama, mis Lsc3 metsiktüüpi valgul, katalüütiline konstant ja efektiivsus olid langenud ~3 korda (Tabel 3). Samas rafinoosi lõhustamise kineetikat oli võimatu analüüsida, sest kõrgema rafinoosi sisalduse korral ensüüm inaktiveerus. Huvitav on see, et mõlemad mutandid, Phe323His ja Asp383Ala lõhustasid madalamal kontsentratsioonil (5-50 mM) rafinoosi hästi. Oletame, et rafinoos seondub väga tugevasti aktiivsentrissse ja blokeerib reaktsiooni siis kui substraati on palju. Asp383-le vastav positsioon on levaansukraasides kõrgelt konserveerunud (KA 8). Batsillide levaansukraasides asub sellel positsioonil siiski Thr (Joonis 6). Lsc3 valgu Phe323 ja Asp383 võiksid paikneda valgu struktuuri mudeli kohaselt substraadi seondamistasku ääres, kuuluda seostumisalas kas +1 või +2 alapiirkonda ning osaleda nii sahharoosi kui ka rafinoosi sidumisel substraaditaskusse (Joonis 7). Igal juhul mõjutab nende positsioonide muteerimine tugevamini rafinoosi kasutamist, muutes seda selles töös tehtud asenduste korral efektiivsemaks. Positsioone, mis vastavad Phe323-le ja Asp383-le Lsc3 valgus ei ole levaansukraasides varem muteeritud.

Varem oli meie töögrupis muteeritud ka mõningaid teisi positsioone Lsc3 C-terminaalsest piirkonnast: Phe381Ala, Phe381Asn ja Val385Ala (Vaher, 2013). Ka Phe381Asn mutandil oli muutunud substraadieelistus: see valk kasutas rafinoosi sahharoosist paremini, kuigi mõlema substraadi kasutamise efektiivsus oli väga madal. Val385 asendaminealaniiniga mõjus vastupiselt – alandas rafinoosi kasutamist võrreldes sahharoosi kasutamisega (Vaher, 2013).

Mutantsetel levaansukraasidel on rafinoosi kasutamise võimet vaadeldud vaid üksikutes publikatsioonides. Peamiselt on seda uuritud *Z. mobilis*'e levaansukraasil LevU, mis erineb substraadispetsiifika poolest oluliselt Lsc3 valgust (Visnapuu *et al.*, 2008). Sahharoosi ja rafinoosi kasutamise suhe LevU valgul on 100:117, seega eelistab ta rafinoosi sahharoosile. Kui LevU valgus muteeriti Val223 (vastab Val248-le Lsc3 valgus)alaniiniks, siis vastav suhe tõusis väärtuseni 100:129, seega rafinoosi kasutamine paranes (Yanase *et al.*, 2002). Sarnane tendents oli näha ka Lsc3 Val248Ala mutandil. *Z. mobilis*'e levaansukraasi mutandil Glu117Gln oli rafinoosi kasutamine tugevasti alanenud (Yanase *et al.*, 2002). Vastaval Lsc3 mutandil Glu146Gln oli aga substraadivalik kaldunud just rafinoosi suunas (Tabel 3).

2.3.2.2 Mutantsete levaansukraaside polümeerisatsiooniproductide iseloomustamine

Polümeeriseeriv ehk transfruktosüüliv aktiivsus (TA, %) määrati reaktsiooniproductide HPLC analüüsil (pt 2.2.6). Selleks inkubeeriti ensüümi 1200 mM sahharoosiga või 300 mM rafinoosiga temperatuuril 37°C 20 h (pt 2.2.6). Kuna rafinoos lahustub halvemini ning mõned mutantsed valgud ei talunud kõrget rafinoosi kontsentratsiooni, siis kasutati reaktsioonis sahharoosiga võrreldes vähendatud rafinoosi sisaldust. Samadest proovidest määrati ka reageerimata jäänud sahharoosi või rafinoosi sisaldus ning kvantiteeriti moodustunud FOS-id. Sahharoosiga reaktsioonidest saadud tulemused on esitatud Tabelis 4.

Tabel 4. Levaansukraaside transfruktosüüliv aktiivsus (TA, %) sahharoosiga, reaktsiooniproductide hulk ja spekter ning reageerimata jäänud sahharoosi kogus.

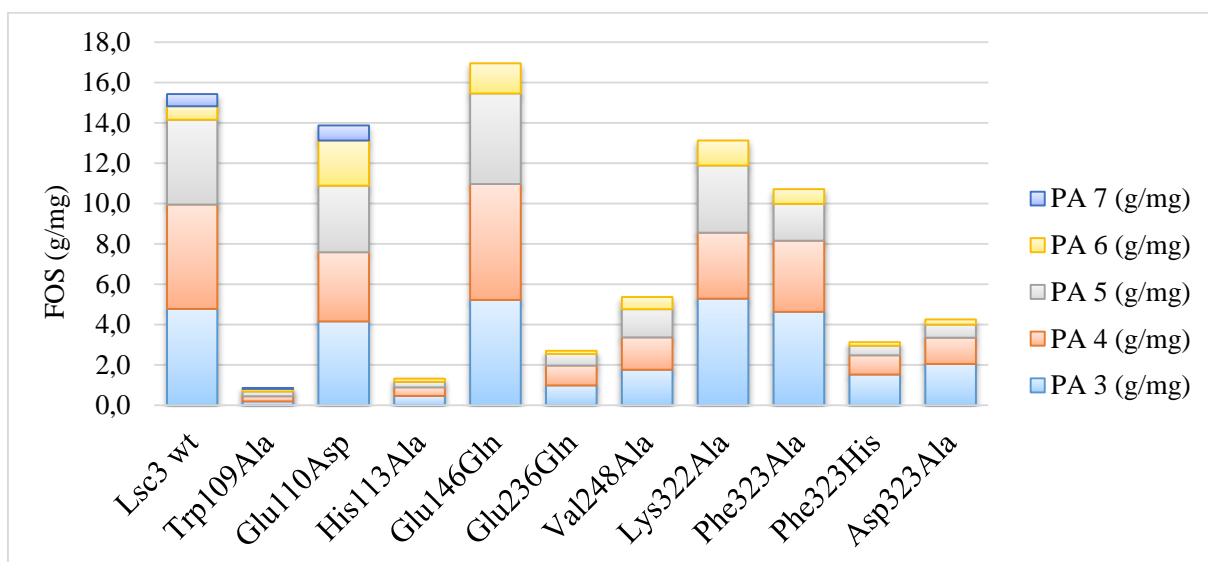
Valk	TA (%)	FOS (PA)	Jääksahharoos (mg/ml)
Lsc3 wt	73.6 ± 0.9	3-7	37.0 ± 6.4
Trp109Ala	76.9 ± 1.3	3-7	36.4 ± 0.1
Glu110Asp	69.8 ± 1.3	3-7	25.0 ± 2.3
His113Ala	38.1 ± 4.5	3-6	18.1 ± 3.3
Glu146Gln	75.5 ± 1.1	3-6	35.3 ± 1.9
Glu236Gln	50.0 ± 3.8	3-6	53.7 ± 4.3
Val248Ala	72.9 ± 0.3	3-6	24.3 ± 1.1
Lys322Ala	72.8 ± 0.8	3-6	30.8 ± 3.6
Phe323Ala	69.4 ± 1.1	3-6	20.4 ± 2.2
Phe323His	63.1 ± 1.5	3-6	29.2 ± 2.8
Asp383Ala	60.7 ± 1.4	3-6	21.0 ± 1.0

2.7 U/ml puhastatud levaansukraasi inkubeeriti 1.2 M sahharoosiga (410.4 mg/ml) McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) temperatuuril 37°C 20 h.

Tabelist 4 on näha, et mutandid His113Ala, Glu236Ala, Phe323His ja Asp383Ala erinevad TA poolest algsest valgust. Sahharoosi polümeeriseeriv aktiivsus oli kõige enam langenud mutantidel His113Ala ja Glu236Ala, vastavalt 35% ja 24% võrra. See näitab, et need valgud on algsega võrreldes palju hüdrolüütilisemad – kannavad suure osa sahharoosist pärinevatest fruktoosijääkidest mitte sahhariidsele aktseptorile vaid veele. His113Ala ja Glu236Ala mutantide hüdrolüütilisus on näha ka polümeerisatsiooniproductide analüüsil: FOS-e ja levaani moodustub vähe ja TLC analüüsil on näha palju vabanevat fruktoosi (Joonis 9; Lisa 1 ja 3). Sarnast tendentsi näitas ka *Z. mobilis*'e levaansukraasi mutant Glu211Gln (vastab Lsc3 Glu236Gln-le), mille transfruktosüüliv aktiivsus oli langenud 54% võrra. FOS-e sünteesis vähe ka mutant Trp109Ala, kuid tema puhul tulenes see ilmselt väga tugevast k_{cat} langusest sahharoosi lõhustamisel, kuna TA väärtus oli tal isegi suurem kui algse Lsc3 valgul (Tabel 4; Joonis 8).

LevU mutandil Gln117Gln tõusis TA 65%-lt 81%-ni (Yanase *et al.*, 2002). Sellele vastaval Lsc3 mutandil Glu146Gln tõusis TA väärtus samuti, kuigi mitte nii suurel määral (Tabel 4).

Ka sünteesitud FOS-ide kogus 1 mg valgu kohta oli mutandil Glu146Gln suurem kui algsel valgul (Joonis 9). Kui LevU mutandil Val233Ala (vastab Lsc3 Val248Ala-le) langes TA 15% võrra (Yanase *et al.*, 2002), siis Lsc3 homoloogse mutandi puhul TA väärtus ei langenud. Samuti oli *B. subtilise*'e SacB mutant Gly361Phe oli palju hüdrolüütilisem kui algne valk (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Lsc3 valgus vastab sellele positsioonile joonduse alusel Lys322, mille asendamine näiteksalaniiniga ei mõjutanud TA väärtust (Tabel 4). Tundub, et polümerisatsiooniks vajalikke aminohappeid ei ole võimalik ainult joonduste alusel ennustada, seda enam, et selles töös võrdluseks kasutatud levaanskraaside identsus Lsc3 valguga on madal. Näiteks Lsc3 ja SacB valkudel on see vaid 25% (Vaher, 2013). Jääksahharoosi kogus oli kõige suurem mutandil Glu236Gln. Mutant His113Ala kasutas 20 tunni jooksul isegi rohkem sahharoosi ära kui algne muteerimata valk, kuid toimus peamiselt sahharoosi hüdrolüüs – TA väärtus oli tugevalt alanenud (Tabel 4).



Joonis 9. 1.2 M sahharoosist 20 h jooksul sünteesitud fruktooligosahhariidide kogused ja spekter.

Joonisel 9 on esitatud FOS-ide kogused, mida levaansukraasid sünteesisid sahharoosist 20 h jooksul 1 mg valgu kohta. Kõige vähem FOS-e 1 mg valgu kohta toodavad mutandid Trp109Ala, His113Ala ja Glu236Gln (Joonis 9). Nendel mutantidel oli ka katalüütilise efektiivsus sahharoosi lõhustamisel selles töös uuritud mutantidest kõige enam (üle kümne korra) langenud (Tabel 3). FOS-ide sünteesi langust täheldati ka mutantidel Val248Ala, Phe323His ja Asp383Ala (vähenemine üle 10 g/mg kohta). Kõige sarnasemad algele Lsc3 valgule olid oligomeersete produktide sünteesi osas mutandid Glu110Asp ja Glu146Gln. Joonis 9 näitab ka sahharoosist sünteesitud fruktooligosahhariidide spektrit. Ainult mutandid Trp109Ala ja Glu110Asp sünteesisid muteerimata valgule sarnaselt kuni seitsme suhkrujäägi pikkusi FOS-e, teised mutandid sünteesisid FOS-e polümerisatsiooniastmeni 6. Mutant

Glu146Gln sünteesis FOS-e isegi rohkem kui algne valk ja tema puhul tõusnud lühemate FOS-ide hulk. Seetõttu võiks see mutant valk leida rakendust biotehnoloogias. Näiteks inuliini-tüüpi FOS-ide puhul on näidatud, et probiootilised bakterid suudavad paremini kasutada just lühikesi FOS-e (Gibson *et al.*, 2010).

Samade reaktsioonisegude koostist analüüsiti ka õhukese kihi kromatograafiaga (TLC). Kromatogrammid on esitatud Lisas 3. HPLC analüüsil ei saa sünteesitud levaani kogust hinnata, sest meetod sobib mono- ja oligosahhariidide kvantiteerimiseks, kuid TLC analüüs võimaldab seda. Levaani sünteesi vähenemist (heledam levaani laik kromatogrammil) oli näha mutantidel Glu110Asp, His113Ala, Glu236Gln, Phe323Ala ja Asp383Ala. Mutantidel His113Ala ja Asp383Ala oli vähenenud ka lühemate polümerisatsiooniproduktide hulk. Teistel mutantidel suuri erinevusi algse valguga polümerisatsiooniproduktide TLC analüüsil näha ei olnud.

Polümerisatsiooniproduktide teket rafinoosist esialgul uuriti mutantidel Val248Ala, Lys322Ala, Phe323Ala, Phe323His ja Asp383Ala. Teistel mutantidel (Trp109Ala, Glu110Ala, His113Ala, Glu146Gln ja Glu236Gln) on plaanis seda tulevikus määrata. Rafinoosi polümeriseerimise andmed mutantidel on esitatud Joonisel 10 ja Tabelis 5.

Tabel 5 näitab, et TA väärtuse poolest oli kõige sarnasem muteerimata valgule mutant Phe323Ala. Mutandi Lys322Ala TA oli tõusnud 6% võrra ning mutantide Asp383Ala ja Val248Ala TA langes vastavalt 4% ja 8% võrra. Jääkrafinoosi kogus oli suurim mutantidel Phe323Ala ja Asp383Ala ning väiksem mutantil Val248Ala.

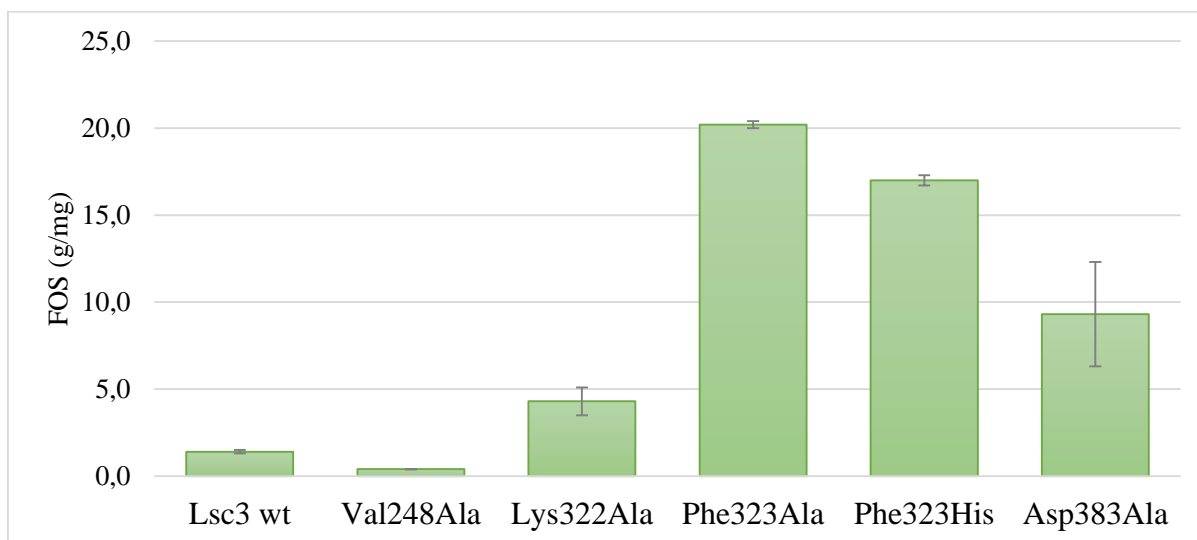
Tabel 5. Levaansukraaside rafinoosi polümeriseeriv aktiivsus (TA) ja jääkrafinoosi kogus reaktsioonisegus.

Proov	TA (%)	Jääkrafinoos (mg/ml)
Lsc3 wt	64.2 ± 0.1	12.2 ± 1.9
Val248Ala	56.0 ± 1.3	8.0 ± 0.4
Lys322Ala	70.2 ± 0.4	19.1 ± 3.3
Phe323Ala	63.9 ± 1.3	35.4 ± 7.8
Phe323His	67.6 ± 0.9	14.4 ± 10.1
Asp383Ala	59.8 ± 0.6	55.0 ± 3.7

2.7 U/ml levaansukraasi inkubeeriti 300 mM rafinoosiga McIlvaine'i puhvril (pH 6.0) temperatuuril 37°C 20 h.

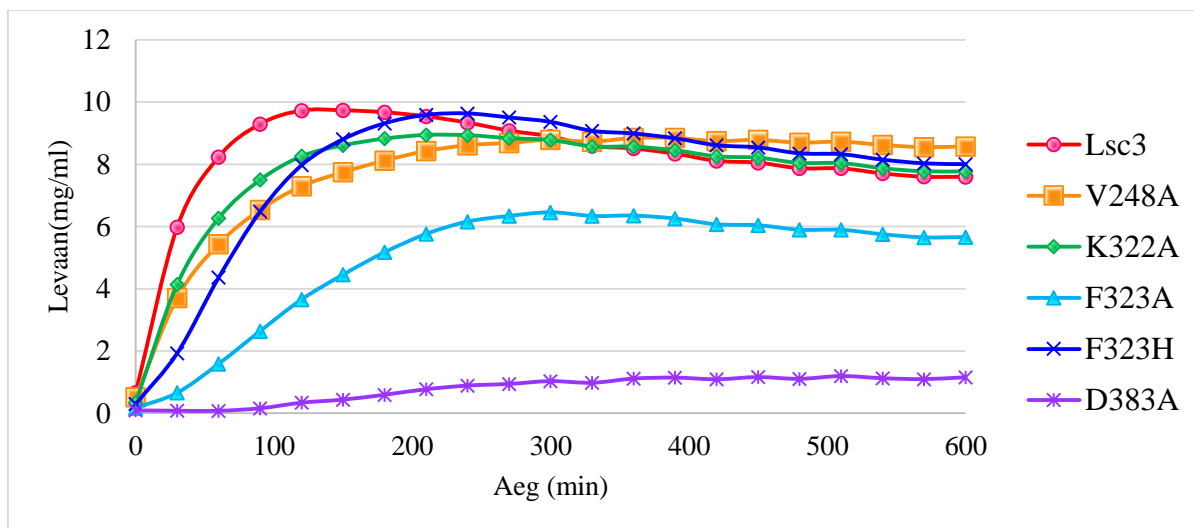
Metsiktüüpi Lsc3 sünteesib rafinoosist 20 h jooksul 1.4 g FOS-e ühe mg valgu kohta, mis on peaaegu 10 korda väiksem kogus võrreldes sahharoosist sünteesitud FOS-ide hulga (Joonis

10). Seega on Lsc3 valgu võime sahharoosist FOS-e sünteesida palju suurem kui rafinoosi puhul. Rafinoosist toodetud FOS-ide hulga (g/mg valgu kohta) poolest eristusid mutandid Phe323Ala, Phe323His ja Asp383Ala, mille FOS-ide tootmise võime rafinoosist oli suurem kui metsiktüüpi valgul, ületades seda vastavalt 14, 12 ja üle 6 korra (Joonis 10). TLC analüüs (Lisa 3) näitas, et võrreldes algse valguga oli levaani rafinoosist moodustunud vähem mutantidel Val248Ala, Phe323Ala ja Asp383Ala. Seega tundub, et mutandil Asp383Ala on FOS-ide süntees rafinoosist suurenenud levaani sünteesi arvelt. Mutandil Val248Ala oli oluliselt vähenenud ka lühemate polümerisatsiooniproductide tootmine nii sahharoosist kui rafinoosist (Lisa 3), mida peegeldab ka vähenenud TA (Tabel 5). Mutantide Lys322Ala, Phe323Ala, Asp383Ala rafinoosist sünteesitud FOS-ide TLC analüüsil oli näha ka produkte (PA 4), mida metsiktüüpi valk ei sünteesi. See võiks viidata nende valkude muutunud substraaditaskule, kuhu aktseptorid võivad seonduda teistel viisidel ning saavad moodustuda teistsuguse sidemetüübiga või hargnenud ahelaga produktid. Kirjanduses on näidatud, et *B. subtilis*'e levaansukraasi puhul võib lisaks rafinoosile ka reaktsioonis tekkiv melibioos toimida fruktosüüli aktseptorina (Seibel *et al.*, 2006), samuti on aktseptoriteks sellises reaktsioonis tekkinud FOS-id (rafinoos ja melitriios).



Joonis 10. Rafinoosist sünteesitud fruktooligosahhariidide kogused 1 mg valgu kohta. 2.7 U/ml levaansukraasi inkubeeriti 300 mM rafinoosiga McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) temperatuuril 37°C 20 h.

Polümeerse levaani teket reaktsiooni käigus saab jälgida spektrofotomeetriliselt. Levaan moodustab hägu, mille teket saab jälgida ajas kas spektrofotomeetri küvetis või mikrotiiterplaadil. Mõõtsime levaani moodustumist 600 mM sahharoosist mikrotiiterplaadil (Joonis 11). Moodustunud levaani hulk arvutati puhastatud polümeerse levaaniga tehtud kaliibri alusel, mille koostas T. Visnapuu. Teiste selles töös käsitletud mutantide levaani sünteesi graafikud on esitatud Lisas 1.



Joonis 11. Levaani süntees (mg/ml) mikroplaadil 600 mM sahharoosist 10 h jooksul. Reaktsioonisegu sisaldas 10 µg/ml puhastatud levaansukraasi.

Jooniselt 11 on näha, et muteerimata Lsc3 valg saavutas levaani tekke maksimumi juba 150. minutil ja sünteesis maksimaalselt 9.7 mg/ml levaani. Algsest valgust erinesid kõige rohkem mutandid Phe323Ala ja Asp383Ala. Viimane sünteesis levaani väga vähe ja väga aeglaselt – 1.2 mg/ml 510 minutiga. Need tulemused korreleeruvad ka TLC analüüsiga (Lisa 3). Levaani sünteesi poolest oli metsiktüüpi valguga kõige sarnasem mutant Phe323His, mis toodab levaani maksimaalselt 9.6 mg/ml, aga natuke aeglasemalt. Vähe ja väga aeglaselt sünteesisid levaani ka mutandid Trp109Ala, His113Ala ja Glu236Gln (Gromkova, 2013; Lisa 1). Samas LevU mutandi Trp80Arg (vastab Trp109-le Lsc3 valgus) transfrüktoosüüliv aktiivsus oli samasugune nagu metsiktüüpi valgul, aga mutant ei sünteesinud pika ahelaga polümeeri – levaani (Yanase *et al.*, 2002).

2.3.2.3 Mutantsete valkude termostabiilsus

Valkude termostabiilsuse hindamiseks kasutati fluorimeetria meetodit (Pantoliano *et al.*, 2001; pt 2.2.7), mille kaudu saab kindlaks teha temperatuuri, mille mõjul pool analüüsitava valgust on denatureerunud. Seda temperatuuri defineeritakse sulamistemperatuurina (T_m). Metsiktüüpi Lsc3 valgu T_m on 65.5°C (Tabel 6; Lisa 1). Seega on see levaansukraas suhteliselt termostabiilne valk. Samal meetodil on määratud termostabiilsust ka *E. amylovora* levaansukraasil ja selle valgu T_m väärtuseks saadi 57°C (Caputi *et al.*, 2013). See näitab, et Lsc3 võiks olla termostabiilsem ja seega sobivam biotehnoloogilisteks rakendusteks. Tabel 6 näitab, et uuritud mutantide T_m väärtused olid üsna sarnased muteerimata valgule, välja arvatud Val248Ala ja Lys322Ala, mille sulamistemperatuurid langesid vastavalt 16°C ja 6°C kraadi võrra. Sarnane tulemus saadi *B. subtilis*'e levaansukraasi mutandil Gly361Phe (vastab Lsc3 Lys322-le), mille termostabiilsus oli oluliselt langenud. Seda seletati mutatsiooni tõttu

aminohapete Arg360 ja Ile374 vahel moodustunud β -juuksenõela destabiliseerumisega (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Mutantide Trp109Ala, Glu110Asp, His113Ala, Glu146Gln, Glu236Gln ja Val248Ala termostabiilsust määras Karin Mardo ning tulemused on esitatud Lisas 1.

Tabel 6. Lsc3 levansukraasi ja mutantsete valkude sulamistemperatuurid koos standardhälvetega.

Valk	T _m
Lsc3 wt	65.5 ± 1.0
Trp109Ala	63.8 ± 0.01
Glu110Asp	65.4 ± 0.3
His113Ala	65.5 ± 0.3
Glu146Gln	63.6 ± 0.5
Glu236Gln	66.1 ± 0.3
Val248Ala	49.2 ± 0.5
Lys322Ala	59.7 ± 1.3
Phe323Ala	66.7 ± 1.4
Phe323His	64.6 ± 1.6
Asp383Ala	64.9 ± 1.3

KOKKUVÕTE

Levaansukraasid on bakteriaalsed ekstratsellulaarsed ensüümid, mis kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside perekonda 68. Nad on multifunktsionaalsed, katalüüsides nii hüdrolüüsi kui ka biosünteesi reaktsioone. Levaansukraasid sünteesivad sahharoosist kõrge polümerisatsiooniastmega β -2,6 sidemega levaani ja ka lühema ahelaga fruktooligosahhariide. Levaansukraaside geene leidub nii grampositiivsetel kui ka -negatiivsetel bakteritel, aga ka mõnel arhel. Levaansukraaside valkude järjestused ja pikkused on erinevad, kuid neis on ka mitmed konserveerunud alasid. Kristallstruktuuride andmetel on levaansukraasidel viielabalise β -propelleri kuju. Valgul on tsentraalne negatiivselt laetud õõnsus, mille põhjas asub kolmest happelisest aminohappest koosnev reaktsioonitsenter.

Levaansukraaside uuringud on olulised, sest nende reaktsiooniproductidel on leitud mitmeid biotehnoloogilisi rakendusi. Näiteks toimivad levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid prebiootiliselt – nad stimuleerivad bifidobakterite ja laktobatsillide kasvu (Porras-Domínguez et al., 2014) ning võiks seetõttu mõjuda positiivselt inimese tervisele.

Käesolevas magistritöös töös keskenduti *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi Lsc3 koht-suunatud muteerimisele ja vastavate mutantide analüüsile, et teha kindlaks positsioone, mis mõjutavad valgus katalüütilisi omadusi, sh substraadivalikut ja võimet sünteesida FOS-e.

Töö põhitulemused olid järgmised:

1. Trp109, His113, Glu236 on Lsc3 katalüüsis üliolulised: nende muteerimine alandab drastiliselt nii sahharoosi kui ka rafinoosi lõhustamise efektiivsust kui ka polümerisatsiooniproductide teket. Ennustuse kohaselt võiksid need aminohapped kuuluda Lsc3 substraaditaskusse ja osaleda substraadi sidumisel valgule. Positsiooni His113 olulisust levaansukraaside katalüüsis on seni näidatud vaid Lsc3 valgus puhul ja meie töögrupis.
2. Positsioonid His113 ning Glu236 on olulised aktseptorsubstraadi seondumises ja/või sellele järgnevas transfruktosüülimises, sest mutantide His113Ala ja Glu236Ala hüdrolüütiline aktiivsus oli võrreldes algse valguga tugevasti suurenenud, samas sahharoosi lõhustamise aktiivsus oli langenud vaid ~3 korda.
3. Positsioonid Phe323, Asp383, Val248 ja Lys322 võiksid osaleda valgus konformatsiooni säilitamises. Mutandid Phe323Ala, Phe323His ja Asp383Ala sadenesid valgus kontsentreerimisel ning mutantidel Val248Ala ja Lys322Ala alanes termostabiilsus.

4. Glu146, Val248, Lys322, Phe323 ja Asp383 on olulised Lsc3 substraadivalikus. Kui metsiktüüpi Lsc3 eelistab substraatidest sahharoosi rafinoosile, siis mutantidel Glu146Gln, Val248Ala, Lys322Ala, Phe323Ala, Phe323His ning Asp383Ala oli substraadivalik muutunud rafinoosi kasuks. Mutandid Phe323Ala, Phe323His ja Asp383Ala polümeriseerisid rafinoosi oluliselt paremini kui sahharoosi.
5. Esimest korda oleme kirjeldanud Lsc3 valgu mutante, mis mõnes aspektis olid metsiktüüpi valgust tõhusamad: sünteesisid rafinoosist rohkem FOS-e kui algne muteerimata valk. Näiteks Lsc3 mutandi Phe323Ala abil saaks rafinoosist sünteesida FOS-e, et uurida nende prebiootilisi efekte.

Structure-function analysis of *Pseudomonas syringae* pv. tomato levansucrase Lsc3 using site-directed mutagenesis

Maria Gromkova

SUMMARY

Levansucrases are bacterial extracellular enzymes belonging to glycoside hydrolase family 68. These enzymes are multifunctional catalyzing both substrate hydrolysis and transfer of a fructosyl residue from a donor substrate to a variety of acceptors. Levansucrases synthesize highly polymeric β -2,6 linked fructan levan and short-chain fructooligosaccharides (FOS) using sucrose as main substrate. Levansucrase genes are present in Gram-positive and -negative bacteria as well as in archaea. Levansucrases have a five-blade β -propeller fold. The central pocket of the enzyme harbors three conserved catalytic amino acids: two aspartates and a glutamate.

Levansucrase studies are important due to their polymerization products which have several biotechnological applications. For example, recently their prebiotic effect on beneficial gut bacteria was demonstrated (Porrás-Domínguez *et al.*, 2014) and thus they should have positive impact on human health.

The aim of this study was to disclose amino acid positions of Lsc3 that affect catalytic properties of the protein, including substrate specificity and ability to produce FOS.

The main results of this study are as follows:

1. Among studied positions, Trp109, His113 and Glu236 were shown as most important for the catalysis: their substitution most seriously affected sucrose and raffinose cleavage as well as synthesis of polymerization products from these substrates. According to the prediction, these amino acids may reside close to the active site pocket and participate in substrate binding. Notably, significance of a highly conserved position equivalent to His113 in Lsc3, was shown for the first time in our studies.
2. Positions His113 and Glu236 are important for acceptor binding and/or following transfructosylating reaction as mutants His113Ala ja Glu236Ala were largely hydrolytic whereas their ability to cleave sucrose and raffinose was decreased only ~3 times.
3. Phe323, Asp383, Val248 and Lys322 are probably involved in stabilization of protein conformation. Mutants Phe323Ala, Phe323His ja Asp383Ala were prone to

precipitation when concentrated and mutants Val248Ala and Lys322Ala had reduced thermostability.

4. Glu146, Val248, Lys322, Phe323 ja Asp383 are involved in selective usage of substrates by the Lsc3. If wild-type Lsc3 preferres sucrose over raffinose, the mutants Glu146Gln, Val248Ala, Lys322Ala, Phe323Ala, Phe323His, Asp383Ala prefer raffinose over sucrose. Also, the mutants Phe323Ala, Phe323His ja Asp383Ala produce much more FOS from raffinose than from sucrose.
5. For the first time we have obtained Lsc3 mutants that show certain improved catalytic properties when compared to wild-type protein. In this study Lsc3 variants were described that synthesized from raffinose much more FOS than the wild-type enzyme. For example, the mutant Phe323Ala can be used to produce FOS from raffinose for the study of their prebiotic efficiency.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Anwar, M. A., Kralj, S., Pique, A. V., Leemhuis, H., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2010). Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan product. *Microbiology* 156: 1264-1274.
- Caputi, L., Cianci, M., Benini, S. (2013). Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of EaLsc, a levansucrase from *Erwinia amylovora*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69: 570–573.
- Curiel, J. A., Rivas, B. de Las, Mancheño, J. M., Muñoz, R. (2011). The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Express Purif* 76: 44–53.
- Elmi, T. (2011). *Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraasi Lsc3 katalüütillise tsentri aminohapete kindlakstegemine mutatsioonanalüüsiga. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E. F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *IFIS Functional Foods Bulletin* 7: 1–19.
- Gromkova, M. (2013). *Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraasi Lsc3 transfruktosüülimisreaktsiooniks oluliste aminohapete kindlakstegemine mutatsioonanalüüsiga. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- van Geel-Schutten, G. H., Faber, E. J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M. R., Ten Brink, B., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F. G., Dijkhuizen, L. (1999). Biochemical and structural characterisation of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl Environ Microbiol* 65: 3008-3014.
- 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.
- Han, Y. W. (1990). Production and characterization of microbial levan. *J Agricult Food Chem* 38: 393-396.
- Hettwer, U., Gross, M., Rudolph, K. (1995). Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol* 177: 2834-2839.
- 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: 621-630.
- Homann, A., Biedendieck, R., Gotze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J* 407: 189-198.
- Ito, T., Fujita, K., Hara, K., Tonozuka, T., Sakano, Y. (2002). Cloning and expression of β -fructofuranosidase gene from *Arthrobacter* sp. K-1. *J Appl Glycosci* 49: 291-296.
- Kang, H-K., Nguyen, T. T. H., Jeong, H-N., Park, M-E., Kim, D. (2014). Molecular cloning and characterization of a novel glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LM34. *Biotechnol Bioprocess Eng* 19: 605-621.

- Korakli, M., Pavlovic, M., Gänzle, M. G., Vogel, R.F. (2003). Exopolysaccharide and Kestose Production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl Environ Microbiol* 69: 2073-2079.
- Kyono K, Yanase H, Tonomura K, Kawasaki H, Sakai T. (1995). Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 289-93.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., van Laere, A., Rabijns, A., van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J Exp Bot* 60: 727-740.
- Li, H., Ullrich, M. S. (2001). Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 183: 3282-3292.
- Li, S.Y., Chen, M., Li, G., Yan, Y.L., Yu, H.Y., Zhan, Y.H., Peng, Z.X., Wang, J., Lin, M. (2008). Amino acid substitutions of His296 alter the catalytic properties of *Zymomonas mobilis* 10232 levansucrase. *Acta Biochim Pol* 55: 201-206.
- Li, S., Y., 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: 2437-2443.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Mardo, K. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 struktuuri modelleerimine ja mutantide iseloomustamine. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Elmi, T., Alamäe, T. (2014 a). 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* 61: 11-22.
- Mardo, K., Mardo, K., Visnapuu, T., Gromkova, M., Alamäe, T. (2014 b). Experimental verification of catalytic triad residues of *Pseudomonas syringae* pv. tomato levansucrase Lsc2. In: Proceedings of the 10th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience: 10th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, Prague, Czech Republic, 22-24.10.2014. (Toim.) Copikova, J, Šarka, E. Prague, Czech Republic: Czech Chemical Society, 84-87.
- Martínez-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.
- Meng, G., Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Struct Biol* 10: 935-941.
- Meng, G., Fütterer, K. (2008). Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct Biol* 8: 16-28.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Nagem, R. A. P., Rojas, A. L., Golubev, A. M., Korneeva, O. S., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Neustroev, K. N., Polikarpov, I. (2004). Crystal structure of exoinulinase

- from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *J Mol Biol* 344: 471–80.
- Ohta, Y., Hatada, Y., Hidaka, Y., Shimane, Y., Usui, K., Ito, T., Fujita, K., Yokoj, G., Mori, M., Sato, S., Miyazaki, T., Nishikawa, A., Tonozuka, T. (2014). Enhancing thermostability and the structural characterization of *Microbacterium saccharophilum* K-1 β -fructofuranosidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 6667-6677.
- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Opalvera, 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., Euverink, G. J. W., van der Maarel, M. E. C. and Dijkhuizen, L. (2005). Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett* 579: 1124-1128.
- Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology* 152: 1187-1196.
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S.; Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B.A., Lane, P., Salemme, F.R. (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J Biomol Screen* 6: 429–440.
- 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.
- Rivas, B. de las, 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: 680-686.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning*, 3rd edition, by. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sharma, R. C. and Schimke, R. T., (1996). Preparation of electro-competent *E. coli* using saltfree growth medium. *Biotechniques* 20: 42-4.
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'ammieh, S., Pawlowski, A., Hecht, H. J. (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohyd Res* 341: 2335-2349.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-130.
- Strube, C. P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., Heinz D. W. (2011). Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J Biol Chem* 286: 17593-17600.
- Tieking, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F., Gänzle, M. G. (2005) Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis*. TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 655-663.
- 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 Microbial Technol.* 51: 359-365.

- Vaher, M. (2013). Asp333, Phe381 ja Val385 olulisus *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 katalüüsile. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Visnapuu, T., Mäe, A., Alamäe, T. (2008). *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter with sigma 70-like elements is feasible for *Escherichia coli*-based biotechnological applications: Expression of three genomic levansucrase genes of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Process Biochem* 43: 414-422.
- Visnapuu, T., Zamfir, A. D., Mosoarca, C., Stanescu, M. D., Alamäe, T. (2009). Fully automated chip-based negative mode nanoelectrospray mass spectrometry of fructooligosaccharides produced by heterologously expressed levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23: 1337-1346.
- Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarcab, C., Zamfir, A., 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 Biotech* 155: 338-349.
- Visnapuu, T. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasid: ekspressioon, biokeemiline iseloomustamine, mutatsioonanalüüs ja polümerisatsiooniproduktide spekter. Doktoritöö, Tartu Ülikool.
- Wei, D., Li, M., Zhang, X., Xing, L. (2004). An improvement of the site-directed mutagenesis method by combination of megaprimer, one-side PCR and *Dpn I* treatment. *Anal Biochem* 331: 401-403.
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., Okamoto, K. (2002). Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J Biochem* 132: 565-572.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

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

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

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

Article

High-throughput Assay of Levansucrase Variants in Search of Feasible Catalysts for the Synthesis of Fructooligosaccharides and Levan

Karin Mardo ¹, Triinu Visnapuu ¹, Maria Gromkova ¹, Anneli Aasamets ¹, Katrin Viigand ¹, Heiki Vija ² and Tiina Alamäe ^{1,*}

¹ Department of Genetics, Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia 23,

51010 Tartu, Estonia; E-Mails: kmardo@ut.ee (K.M.); triinu.visnapuu@ut.ee (T.V.); talamae@ebc.ee (T.A.).

² National Institute of Chemical Physics and Biophysics, Akadeemia tee 23, 12618 Tallinn, Estonia; E-Mail: heiki.vija@kbf.ee

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: talamae@ebc.ee; Tel.: +372-5-295-378; Fax: +372-7-420-286.

Received: / Accepted: / Published:

Bacterial levansucrases polymerize fructose residues of sucrose to β -2,6 linked fructans – fructooligosaccharides (FOS) and levan. While β -2,1 linked FOS are widely recognized as prebiotics, health-related effects of β -2,6 linked FOS are scarcely studied as they are not commercially available. Levansucrase Lsc3 (Lsc-3) of *Pseudomonas syringae* pv. tomato has very high catalytic activity and stability making it a promising biotechnological catalyst for FOS and levan synthesis. In this study we evaluate feasibility of several high-throughput methods for screening and preliminary characterization of levansucrases using thirty six Lsc3 mutants as a test panel. Heterologously expressed and purified His-tagged levansucrase variants were studied for 1) sucrose-splitting activity, 2) FOS production, 3) ability and

kinetics of levan synthesis, 4) thermostability in a novel Thermofluor assay. Importantly, we show that sucrose-splitting activity as well as the ability to produce FOS can both be evaluated using permeabilized levansucrase-expressing *E. coli* transformants as catalysts. For the first time we demonstrate key importance of Trp109, His113, Glu146 and Glu236 for the catalysis of Lsc3. Economical methods presented here are applicable not only in levansucrase assay, but have a potential to be adapted for high-throughput (automated) study of other enzymes.

Keywords: levansucrase; fructooligosaccharides; levan *Pseudomonas syringae*; cell permeabilization; Thermofluor; prebiotics

1. Introduction

Levansucrases (EC 2.4.1.10) are bacterial extracellular enzymes that convert sucrose into β -2,6 linked fructooligosaccharides (FOS) of varied chain length and high-molecular levan [1]. These enzymes are present in many plant-related bacteria such as *Pseudomonas syringae* [2-4], *Gluconacetobacter diazotrophicus* [5], *Zymomonas mobilis* [6] and *Erwinia amylovora* [7-8], but also in *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* [9-10] and several lactic acid bacteria such as *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. reuteri* and *Leuconostoc mesenteroides* [11-13].

FOS which are derived from plant storage polysaccharide inulin (a β -2,1 linked fructan) are already widely recognized as prebiotics [14-15]. They are industrially produced from plant sources and used in various food- and health-related products. On the contrary, other types of FOS are not commercially available and due to that their biological effects are scarcely studied. Still, few papers, for example [16], report that β -2,6 linked (levan-type) FOS are selectively fermented by bifidobacteria showing even stronger prebiotic effect than β -2,1 linked counterparts. Neokestose, a fructosylglucosylfructoside produced from sucrose by a fungus *Xanthophyllomyces dendrorhous*, also showed a bifidogenic effect on human gut microbiota [17]. Notably, a recent paper by Marsh and coworkers states that water kefir grains originating from different regions of the world contain *Z. mobilis* as main bacterial component [18]. As *Z. mobilis* possesses a levansucrase, water kefir, a popular healthy drink produced by fermentation of sucrose-containing water with water kefir grains as a starter, certainly contains levan and FOS. Prebiotic effect of polymeric fructans (inulin and levan) on lactobacilli and bifidobacteria is most probably assisted by other bacteria in the gut that degrade these large molecules to oligomers. For further study of physiological effects of β -2,6

linked FOS and levan, biotechnologically feasible production systems applying wild-type enzymes or selected mutant variants should be established.

We have cloned and heterologously expressed three genomic levansucrase genes *lsc1*, *lsc2* and *lsc3* (also designated as *lsc-1*, *lsc-2* and *lsc-3*) from a plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato [4]. Respective proteins have highly similar sequence and general catalytic properties [4, 19]. We have shown that purified Lsc3 protein has very high catalytic constant (k_{cat} 504.4 1/s) [20]. Higher k_{cat} (2272 1/s) has been recorded only for the levansucrase of *B. megaterium* [10] whereas levansucrases of *G. diazotrophicus* and *Z. mobilis* have respectively 8 and 18 times lower k_{cat} values than Lsc3 [5-6]. Lsc3 is a very efficient polymerizer, producing from sucrose two types of fructans: high-molecular levan and short-chain FOS [20-21]. The spectrum of FOS produced by Lsc3 is highly similar to that of a prebiotic inulin-type FOS mixture (P95 from Orafit, Beneo, Belgium) as verified using different analysis methods: thin layer chromatography (TLC), nanoelectrospray ionization mass spectrometry (nanoESI MS) analysis [21] and high-performance liquid chromatography (HPLC) ([22] and our unpublished data). Importantly, Lsc3 transfructosylated eleven out of twelve nonconventional acceptor substrates tested by us. Among them, sorbitol, xylobiose, galacturonic acid, mannitol, xylitol and methyl-glucopyranoside were shown to serve as fructosyl acceptors for levansucrases for the first time [20].

In search, isolation and characterization of levansucrase mutants, we have elaborated and applied several high-throughput methods. Firstly, for the selection of random mutants of Lsc3 protein, we introduced a microplate-based assay of levansucrase activity on permeabilized cells of levansucrase-expressing *E. coli* as catalyst. This method was further applied for preliminary study of site-directedly mutated Lsc3 variants [20]. As majority (88%) of levansucrase activity is detected in cytoplasmic fraction of levansucrase-expressing *E. coli* and only 12% in the periplasm [4], permeabilization is needed to disclose also the activity of cytoplasmic fraction of the protein [19]. Secondly, we introduced a microplate-based assay of levan production kinetics to characterize polymerization ability of Lsc3 mutants [20]. Thirdly, for the first time we applied NanoMate robot-assisted electrospray ionization coupled with high-capacity ion trap mass spectrometry method for the analysis of Lsc3-produced homo- and heterooligofructans in underivatized form [20-21].

In current work we introduce a set of high-throughput and cost-saving methods feasible for levansucrase assay. These methods will be evaluated on a panel of random and site-specifically constructed Lsc3 mutants. Several of these mutants have been described earlier, but novel variants are included as well. The wild-type Lsc3 will be used as reference. We will assay following biochemical properties of purified levansucrases: 1) sucrose-splitting activity,

also referred to as total activity, 2) the amount and spectrum of produced FOS, 3) ability and kinetics of levan synthesis, 4) thermal stability of levansucrases. Aside of this, we will evaluate some of these characteristics using permeabilized cells of levansucrase-expressing *E. coli* as catalysts. The data retrieved from high-throughput assays will be compared with those of conventional more laborious methods.

2. Results and Discussion

2.1. Panel of Lsc3 Mutants of This Study

Lsc3 variants addressed in the study include the wild-type Lsc3 and thirty six mutants. Twenty two of them have been previously characterized by us. Among those are inactive mutants of catalytic triad Asp62Ala, Asp219Ala and Glu303Ala [22], mutants with significantly decreased polymerizing ability (Thr302Pro, Gln301Ala and substitution mutants of His321) [20, 22], mutants Trp61Ala, Trp61Asn, Arg304Cys and Arg304Ala which are strongly hampered in sucrose-splitting as well as polymerization abilities [22] and some others exhibiting moderate changes compared to wild-type Lsc3. Fourteen mutants of Lsc3 are described here for the first time. Among those are so-called ‘Yanase mutants’. Inspired by a superior paper by Yanase *et al.* [6] on mutational analysis of the *Zymomonas mobilis* levansucrase (LevU), we constructed homologues of Trp80Arg, Glu117Gln, Glu211Gln, Val223Ala and Asp308Asn mutants of *Z. mobilis* enzyme. Corresponding mutants of Lsc3 are Trp109Arg, Glu146Gln, Glu236Gln, Val248Ala and Asp333Asn. To gain more information on function of these positions, some additional substitutions were made. So, Trp109 in Lsc3 was replaced also with Ala and Phe, and Asp333 with Ala. Several novel mutants of Lsc3 studied here originate from random mutagenesis, method of which is described by us earlier [20]. All Lsc3 variants addressed in this work and respective mutagenic oligonucleotides are listed in supplementary Table S1. Mutant variants are also designated on Figure 1 above the alignment of the levansucrases. The mutant *lsc3* genes were cloned into pURI3 vector for overexpression in *E. coli* as N-terminally His₆-tagged fusion proteins ([23-24]; see sections 3.1 and 3.2).

Figure 1. Lsc3 mutants with substituted positions designated as # above the MUSCLE [25] alignment of levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Lsc3), *Erwinia amylovora*, *Rahnella aquatilis*, *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Bacillus subtilis*.

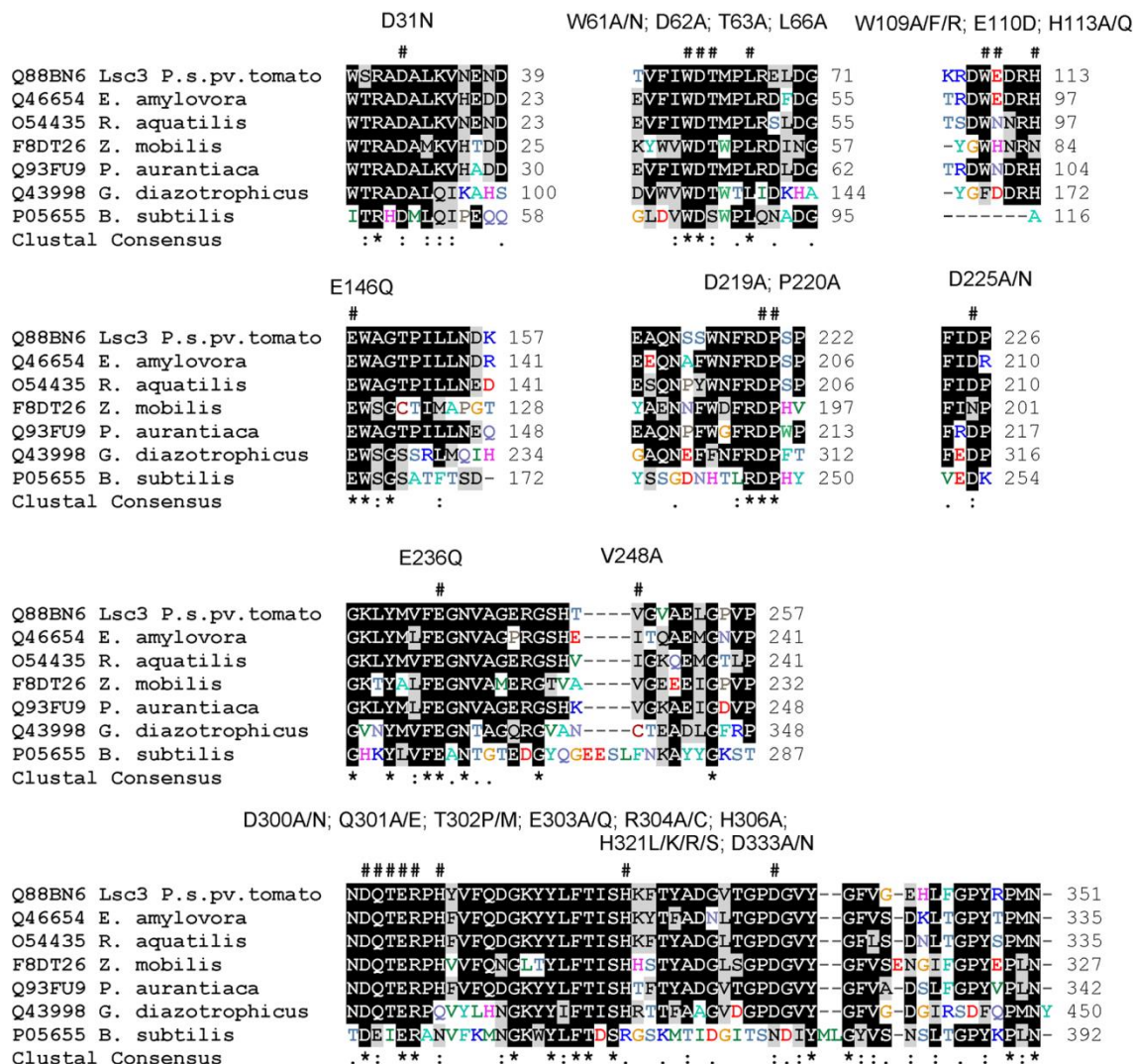
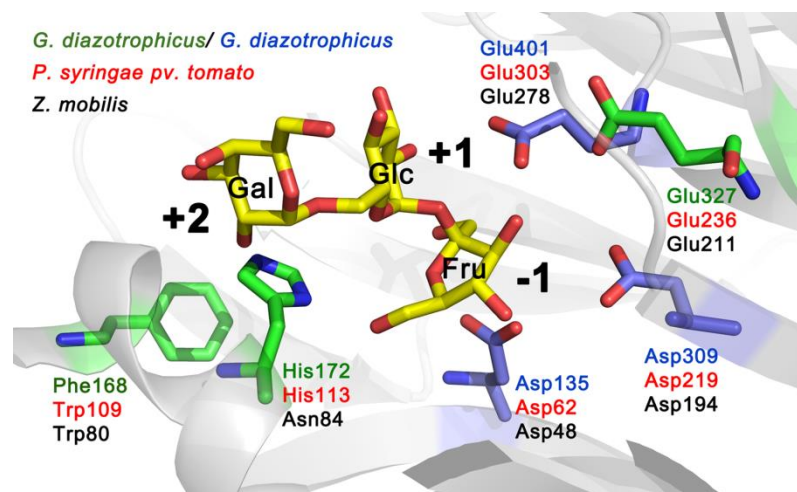


Figure 2 shows the location of amino acids equivalent to Trp109, His113 and Glu236 of Lsc3 on a 3D model of *G. diazotrophicus* enzyme LsdA. Trp109 and Glu236 correspond to Trp80 and Glu211 in *Z. mobilis* levansucrase (Figure 1). The Glu211Gln mutant showed largely reduced polymerizing ability and Trp80Arg mutant was unable to synthesize polymeric levan [6]. As we show in this study, mutation of His113 in Lsc3 (we studied His113Gln and His113Ala substitutions) has a strong negative effect on the catalysis (section 2.3; for further discussion see section 2.7). The importance of above-mentioned positions can be predicted from the location of respective residues in substrate-binding pocket (Figure 2).

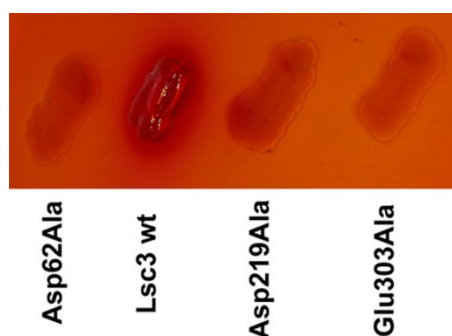
Figure 2. Catalytic centre of *G. diazotrophicus* levansucrase LsdA (PDB ID: 1W18; [5]) with side chains of catalytic triad residues (Asp135, Asp309 and Glu401) indicated in blue. Structure of the protein was visualized using PyMol [26]. Raffinose molecule (consists of galactose, glucose and fructose residues) shown in substrate-binding pocket originates from the structure of *B. subtilis* levansucrase SacB in complex with raffinose (PDB ID: 3BYN) that was superposed with the LsdA structure. Positions of LsdA equivalent to Trp109, His113 and Glu236 of Lsc3 of *P. syringae* pv. tomato are shown on the model. Respective amino acids of levansucrases of different bacteria are shown in different colour: LevU of *Z. mobilis* (black), Lsc3 of *P. syringae* pv. tomato (red) and LsdA of *G. diazotrophicus* (green and blue).



2.2. The Simplest Way to Detect Levansucrase Activity – Assay of Growth Phenotype of Levansucrase-Expressing Bacteria on Agar Plate Containing Sucrose

Levansucrase-possessing bacteria have mucoid colonies when grown on sucrose-containing agar plate due to the synthesis of levan. This feature can be used to detect and specify bacteria that have levansucrases, but also to select levansucrase mutants through heterologous expression in *E. coli* [6, 19, 27]. We have used this simple and informative method in cloning the *lsc1*, *lsc2* and *lsc3* genes of *P. syringae* pv. tomato [4] and selection of random mutants of the Lsc3 protein [20]. Figure 3 shows growth phenotype of *E. coli* transformants expressing wild-type Lsc3 and its catalytic triad mutants growing on MacConkey medium containing 10% sucrose. Only wild-type Lsc3 produces levan giving a mucoid phenotype to streaks of respective host bacteria. Also, only in case of wild-type Lsc3 expression, acidification of the medium (pink colour around the streak) due to sugar fermentation is visible.

Figure 3. Levan synthesis phenotype of *E. coli* BL21(DE3) expressing wild-type Lsc3 and alanine replacement mutants of the catalytic triad amino acids. Transformants were streaked onto MacConkey + Amp medium containing 10% sucrose and 1 mM IPTG to induce the T7 polymerase and grown at 37 °C (see section 3.2).



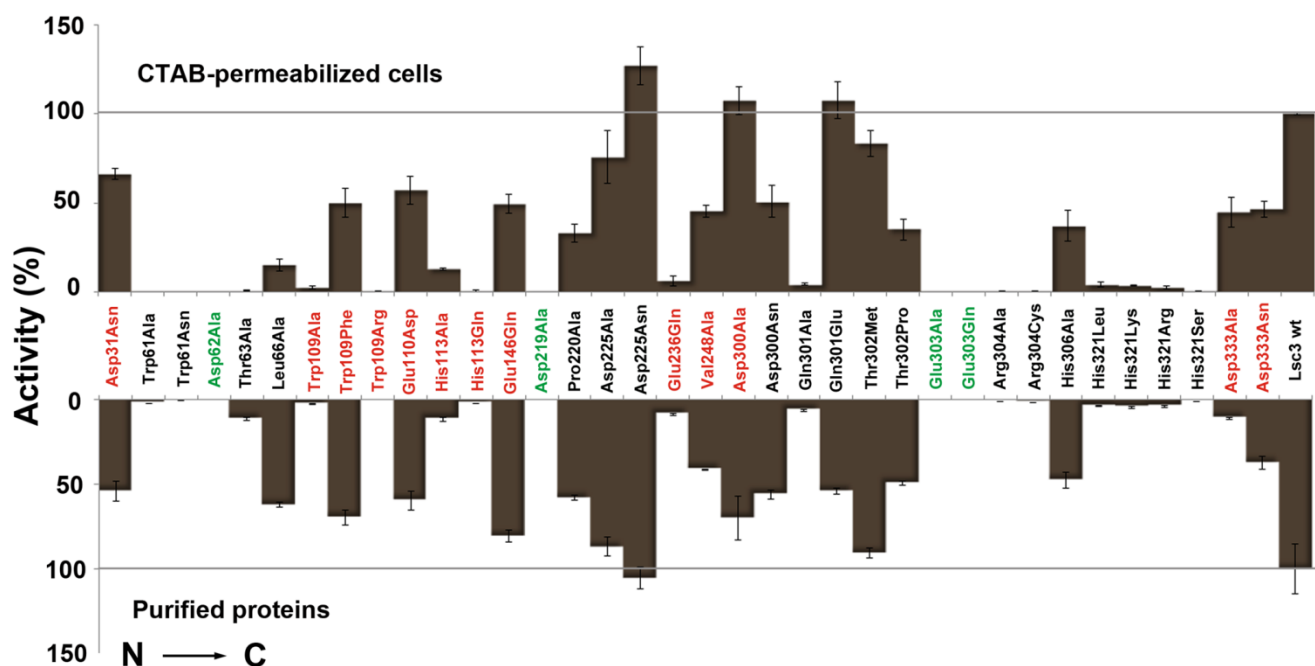
2.3. Total Levansucrase Activity Can Be Reliably Measured on Microplates not only using Purified Proteins, but also Implementing Permeabilized *E. coli* Transformants as Catalysts

Most often, enzyme activities are measured by performing reaction in a volume of 1-2 mL. This approach needs a high amount of protein and chemicals, is usually quite time-consuming and costly. Microplate-aided assays save time, money and can be robotized. Total activity of levansucrases is traditionally evaluated according to velocity of sucrose-splitting reaction. This reaction is required for both, sucrose hydrolysis as well as transfructosylation reaction. Each act of sucrose splitting releases a glucose molecule that can be quantified in several ways. We have been using the Glucose liquicolor assay. As described by the manufacturer (Human GmbH, Germany), this procedure relies on oxidation of glucose by glucose oxidase, yielding hydrogen peroxide which reacts under catalysis of peroxidase with phenol and 4-aminophenazone to a reddish quinoneimine product, concentration of which is measured at 500 nm. We routinely determine kinetic constants of sucrose-splitting reaction of levansucrases by performing reaction in Eppendorf tubes with 1 mL volume of reaction mixture. At fixed time points, small samples are withdrawn for the estimation of liberated glucose. We have earlier used this approach to determine the K_m and V_{max} values of sucrose-splitting reaction of levansucrases [4, 20, 22] and will apply the same method here (see section 3.8). Using a set of thirty six Lsc3 mutants with largely varied catalytic activity, we show here that sucrose-splitting activity of levansucrases can be reliably measured in a high-throughput way, i.e. on microplates. Moreover, we demonstrate that sucrose splitting by a levansucrase can also be evaluated on permeabilized *E. coli* transformants expressing respective protein. Figure 4 compares the results obtained by these two methods. One can see that they correlate fairly well. Our levansucrase assay on permeabilized *E. coli* transformants presumes similar expression level for different Lsc3 variants in the host. Therefore, all induced *E. coli* cultures subjected to levansucrase activity assay were studied for levansucrase expression using SDS-PAGE and similar expression levels for different levansucrase variants were detected (data not shown).

To permeabilize the *E. coli* cells, we used 0.1% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (section 3.3) that has only minimal activity-reducing effect on levansucrases. Notably, we have earlier used this surfactant not only for levansucrase activity assay on recombinant *E. coli* [22], but also to evaluate activities of maltase, β -glucuronidase and enzymes of methanol oxidation in yeast cell suspensions [28-29]. Earlier, de Abreu *et al.* [30] have described a high-throughput microplate assay of *Schwanniomyces occidentalis* β -fructofuranosidase mutants. Gene library of respective genes was expressed in an invertase-negative mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to reveal protein variants with enhanced transfructosylation ability [30]. In that case, permeabilization of yeast cells was not required as invertase is a cell surface-bound protein.

Figure 4 indicates that even a simple levansucrase activity assay on permeabilized *E. coli* clearly discloses catalytically disabled mutants Trp61Ala, Trp61Asn, Asp62Ala, Asp219Ala, Glu303Ala, Glu303Gln, Arg304Ala, Arg304Cys and His321 substitution mutants [20, 22]. Concerning novel mutants, Trp109Ala, Trp109Arg, His113Gln and Glu236Gln stick out as variants with significantly reduced sucrose-splitting ability. For comparison, V_{\max} values of sucrose-splitting reaction determined with purified proteins are presented on Figure 5. Some Lsc3 mutants, for example Glu236Gln and substitution mutants of His321, have highly reduced affinity for sucrose (Table 1). In consequence of that sucrose-splitting ability of these mutants is somewhat underestimated in microplate assay which was conducted with 100 mM sucrose (Figure 4, Table 1).

Figure 4. Quantitative evaluation of sucrose-splitting (total) levansucrase activity on microplates. Either CTAB-permeabilized *E. coli* transformants expressing a certain Lsc3 variant (upper panel) or respective purified proteins (lower panel) were used as catalysts. Respective methods are described in sections 3.3 and 3.4. Mutants of catalytic triad positions are designated in green and Lsc3 mutants studied for the first time in red. Mutant Glu303Gln falls into both categories. The activities of mutant enzymes are expressed as percentage of respective value of wild-type Lsc3 taken for 100% (grey lines). Total activity of purified wild-type Lsc3 protein was 461.6 ± 95.5 U/mg. In assay on permeabilized cells, the absorption values at 500 nm indicating glucose concentration were normalized to cell suspension densities and obtained value of wild-type Lsc3 was taken for 100%. At least three parallel measurements for each levansucrase variant were made and mean values with respective standard deviations are shown.



2.4. The Ability of FOS Production by Levansucrases Can Be Evaluated on Microplates

Production of β -2,6 linked FOS is important, because their biological (prebiotic) effects are poorly studied. They are not produced commercially and therefore practically impossible to purchase. The β -2,6 linked FOS have been produced for prebiotic efficiency studies in small amounts by controlled chemical hydrolysis of bacterial levan and isolation of oligosaccharidic fraction [16]. However, some levansucrases, for example LsdA of *G. diazotrophicus*, produce from sucrose mostly short-chain products and only a low amount of levan [31-33]. Levansucrases with that ability are potential catalysts for large-scale synthesis of β -2,6 linked FOS. We showed that Lsc3 protein of *P. syringae* pv. tomato is capable of FOS synthesis from sucrose, raffinose and sugar beet molasses. A high substrate concentration (600 mM and higher) and prolonged reaction time are required for FOS synthesis. The pattern of produced FOS was analysed by us using TLC and nanoESI mass spectrometry [21], and FOS quantitation was performed by HPLC [22]. In search of FOS-producing levansucrases, high-throughput analysis methods are preferred. We show here that the ability of levansucrases to produce FOS can be evaluated on microplates. Moreover, even permeabilized *E. coli* cells expressing a levansucrase can be reliably applied for FOS production assay (see Figure S1). Indeed, if a levansucrase-expressing *E. coli* was permeabilized by 0.1% CTAB and incubated on a microplate in buffer with 1 M of sucrose for 20 h, FOS were produced. The FOS spectrum characteristic for Lsc3 variants of our panel was specified by HPLC (see 3.9) and results are presented in Table 1. Respective spectra from reactions with purified proteins are

given for comparison. Table 1 also shows transfructosylating activity (TA) of the levansucrases.

Table 1. Affinity (K_m) for sucrose and polymerizing properties of Lsc3 and its mutants. Affinity and transfructosylating activity (TA) were determined as described in section 3.8 and reaction products were analysed by HPLC (3.9). Degree of polymerization (DP) and TA range of detected FOS are presented. Reactions were performed either with purified proteins (see 3.6) or permeabilized cells of levansucrase-expressing *E. coli* (see 3.5). The mean values and standard deviation values of at least two independent experiments are shown.

Levansucrase	K_m (mM)	Transfructosylation activity (TA; %) permeabilized cells / purified protein	Degree of polymerization (DP) permeabilized cells / purified protein
Lsc3 wt	18.5 ± 2.5	71 ± 1 / 74 ± 1 ^a	3-7 / 3-7 ^a
Asp31Asn	14.9 ± 4.6	65 ± 4 / 70 ± 3	3-6 / 3-6
Trp61Ala	143.4 ± 6.1	ND / 69 ± 1 ^a	ND / 3-6 ^a
Trp61Asn	869.3 ± 104.0	ND / 51 ± 1 ^a	ND / 3-4 ^a
Asp62Ala	20.7 ± 2.1	ND / ND	ND / ND
Thr63Ala	15.9 ± 1.8	75 ± 3 / 71 ± 3 ^a	3-6 / 3-7 ^a
Leu66Ala	27.3 ± 4.2	69 ± 4 / 73 ± 2 ^a	3-6 / 3-7 ^a
Trp109Ala	29.8 ± 3.3	72 ± 6 / 77 ± 1	3-5 / 3-7
Trp109Phe	9.6 ± 0.6	62 ± 3 / 74 ± 1	3-7 / 3-7
Trp109Arg	249.1 ± 38.5	ND / 40 ± 1	ND / 3
Glu110Asp	57.6 ± 9.7	57 ± 4 / 70 ± 1	3-7 / 3-7
His113Ala	170.4 ± 17.0	43 ± 1 / 41 ± 6	3-5 / 3-6
His113Gln	190.1 ± 28.3	65 ± 5 / 51 ± 3	3-5 / 3-6
Glu146Gln	40.6 ± 5.0	63 ± 5 / 76 ± 1	3-6 / 3-6
Asp219Ala	43.4 ± 10.2	ND / ND	ND / ND
Pro220Ala	23.9 ± 2.3	71 ± 2 / 75 ± 2 ^a	3-6 / 3-6 ^a
Asp225Ala	13.7 ± 1.2	61 ± 1 / 71 ± 2 ^a	3-6 / 3-7 ^a
Asp225Asn	18.8 ± 0.8	57 ± 2 / 71 ± 2 ^a	3-6 / 3-7 ^a
Glu236Gln	267.1 ± 40.2	46 ± 1 / 50 ± 4	3-5 / 3-6
Val248Ala	14.1 ± 1.1	63 ± 2 / 72 ± 1	3-7 / 3-6
Asp300Ala	19.4 ± 1.3	53 ± 4 / 58 ± 1	3-7 / 3-8
Asp300Asn	50.7 ± 5.4	52 ± 2 / 60 ± 1 ^a	3-9 / 3-10 ^a
Gln301Ala	313.7 ± 30.0	24 ± 5 / 24 ± 1 ^a	3-4 / 3-4 ^a
Gln301Glu	23.6 ± 1.7	34 ± 8 / 45 ± 1 ^a	3-5 / 3-5 ^a
Thr302Met	15.1 ± 1.8	56 ± 1 / 70 ± 1 ^a	3-6 / 3-6 ^a
Thr302Pro	42.5 ± 6.7	39 ± 5 / 52 ± 5 ^a	3-6 / 3-6 ^a
Glu303Ala	27.1 ± 5.5	ND / ND	ND / ND
Glu303Gln	129.6 ± 9.6	ND / ND	ND / ND
Arg304Ala	66.0 ± 9.8	ND / 70 ± 2 ^a	ND / 3-6 ^a
Arg304Cys	12.5 ± 1.1	ND / 69 ± 1 ^a	ND / 3-4 ^a
His306Ala	21.2 ± 2.4	70 ± 5 / 72 ± 1 ^a	3-7 / 3-7 ^a
His321Leu	352.1 ± 41.7	17 ± 1 / 20 ± 5	3 / 3
His321Lys	529.5 ± 68.3	30 ± 1 / 27 ± 2	3-4 / 3-4
His321Arg	451.0 ± 36.8	36 ± 1 / 25 ± 1	3 / 3-4
His321Ser	503.3 ± 87.8	31 ± 4 / 23 ± 3	3-4 / 3-4
Asp333Ala	27.0 ± 2.9	65 ± 3 / 68 ± 1	3-5 / 3-5
Asp333Asn	41.3 ± 4.2	67 ± 3 / 80 ± 1	3-7 / 3-7

^a data from Ref [22]

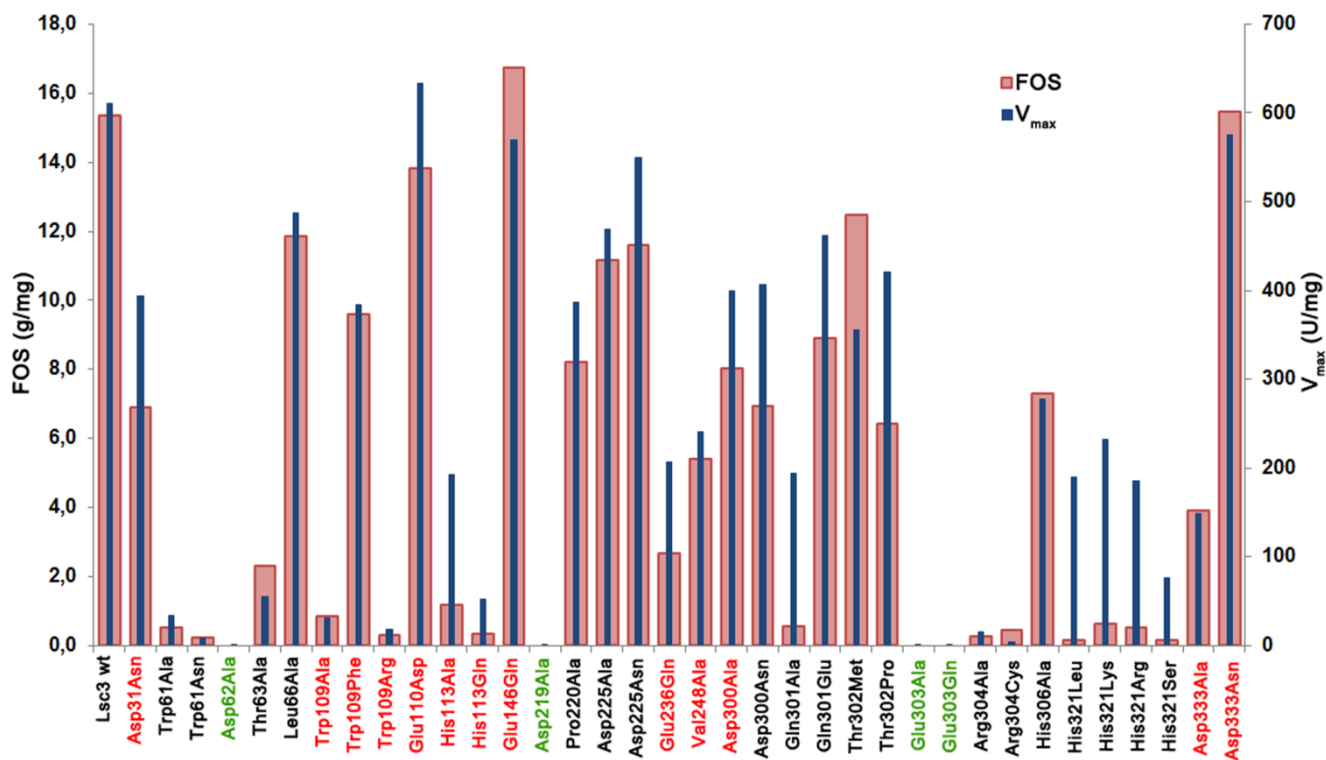
ND – not detected; value under detection limit

TA indicates percentage of fructosyl residues resulting from sucrose-splitting reaction that is used for transfructosylation – to produce polymerization products, FOS and levan [20].

Low TA means a high hydrolytic activity of the levansucrase – transfer of fructosyl residues to water.

Table 1 shows that the size range of produced FOS can be specified by both high-throughput methods. For example, the Asp300Asn mutant stands out in both assays as producer of FOS with extended chain length, up to degree of polymerization (DP) 9-10. The mutants synthesizing only short-chain FOS, with DP up to 4 (e.g. Gln301Ala and substitution mutants of His321) were also disclosed in both assays. In several cases, FOS production could not be detected in assay on permeabilized transformants. In case of mutants with largely decreased catalytic activity, such as Trp61Ala, Trp61Asn, Trp109Arg, Arg304Ala and Arg304Cys (see activity data on Figure 4 and V_{\max} data in Figure 5), FOS were detected only in reactions that were performed with increased amount (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of purified protein. Figure 5 shows data on total FOS production by Lsc3 variants per 1 mg of pure protein. V_{\max} values of sucrose splitting for respective mutants are also included. Comparison of these two characteristics indicates that in case of mutants Asp31Asn, Glu110Asp, His113Ala, Glu236Gln, Asp300Ala, Asp300Asn, Gln301Ala, Thr302Pro and substitution mutants of His321, FOS production is substantially more affected than the ability to split sucrose, meaning that these positions are specifically important for polymerization reaction. The mutants Glu146Gln, Thr302Met and Asp333Asn with fairly good sucrose-splitting activity and slightly enhanced FOS production (Figure 5) can be considered as promising candidates for enzymatic synthesis of FOS for biotechnological applications.

Figure 5. The amount of total FOS (g/mg of protein) produced from 1.2 M sucrose in a 20 h reaction by purified wild-type Lsc3 and thirty six mutant proteins. Mutants of catalytic triad positions are shown in green and the mutants studied in this work for the first time are in red. V_{\max} (U/mg) of sucrose-splitting reaction is plotted for comparison. Mean values of at least two independent experiments are shown. Standard deviation was less than 15%.

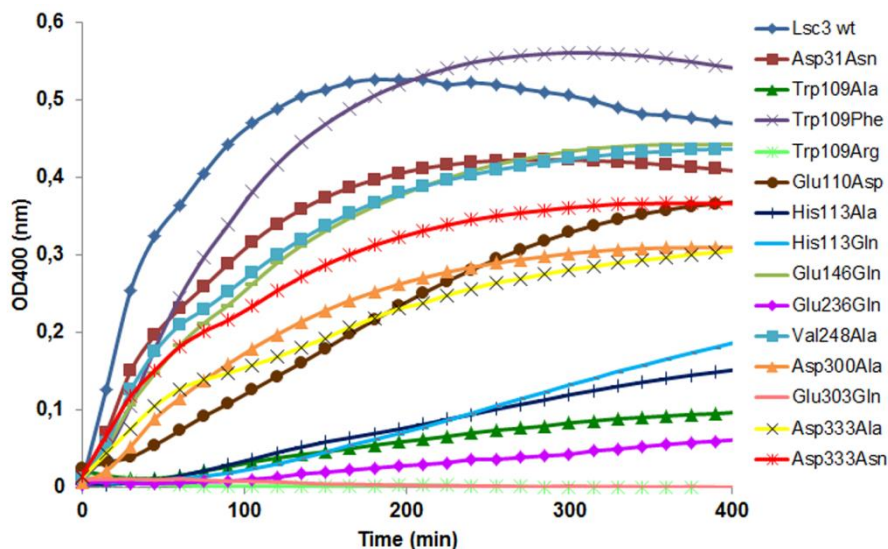


2.5. Online Assay of Levan Synthesis Kinetics on a Microplate

In this high-throughput procedure, increase of turbidity due to levan formation is recorded online [20]. Here, we will present data on levan synthesis kinetics of fourteen novel Lsc3 mutants. Figure 6 shows that two mutants, Trp109Arg and Glu303Gln, do not produce levan. Glu303 is acid-base catalyst of Lsc3 [22] that explains behaviour of the Glu303Gln mutant. Retarded levan synthesis by Trp109Arg mutant was also expected as equivalent mutant of *Z. mobilis* levansucrase (Trp80Arg) is also hampered in levan synthesis [6]. However, Trp109 replacement with Phe restored the ability for levan synthesis, achieving even increased production level of the fructan compared to wild-type Lsc3 (Figure 6). Levan production was very slow in case of mutants Trp109Ala, His113Ala, His113Gln and Glu236Gln. The Glu110Asp, Asp300Ala, Asp333Ala and Asp333Asn mutants were also somewhat hampered in levan synthesis (Figure 6).

Figure 5 shows that substitution of Asp333 in Lsc3 does not specifically reduce FOS production. Yet, levan synthesis is significantly decreased even in case of Asp333Asn mutant which behaves quite similar to wild-type protein regarding the V_{\max} of sucrose-splitting reaction and FOS production (Figures 5 and 6). Thus Asp333 can be specifically important for prolongation of the fructosyl chain.

Figure 6. Time course of levansucrase synthesis by wild-type Lsc3 protein (Lsc3 wt) and fourteen mutants. Reaction was conducted at 37 °C on flat-bottom polystyrene microplates in total volume of 200 μ L per well. Reaction mixture contained 600 mM of sucrose in McIlvaine's buffer (pH 6.0) and 10 μ g/mL of purified protein. Increase of turbidity was measured at 400 nm every 15 minutes using Infinite M200 PRO microplate reader. Mean values of four parallel measurements are shown. Standard deviation was less than 10%.



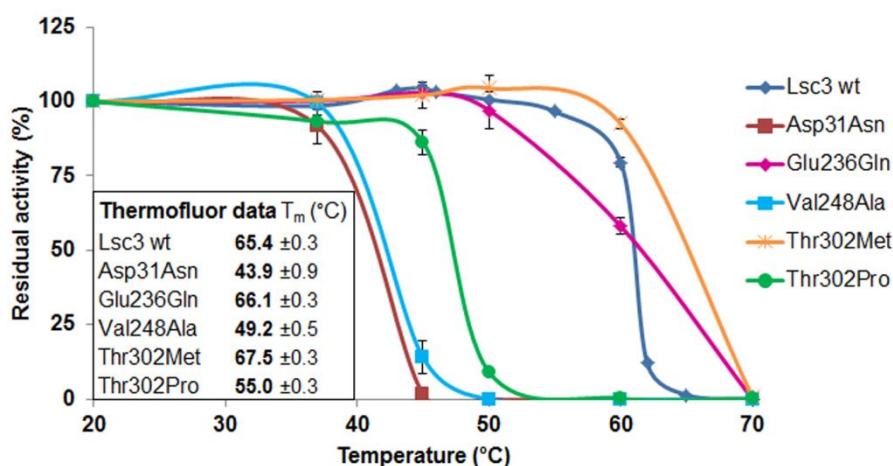
2.6. Thermostability Assay of Levansucrases Using Two Different Approaches

Enzymes applied in biotechnology should possess high catalytic activity and long shelf-life. Bacterial extracellular proteins (including levansucrases) are suited for commercial applications as in nature they have to withstand harsh environmental conditions. We have shown earlier that Lsc3 protein has very high catalytic activity and long-term stability [20]. Previously we evaluated stability of the Lsc3 preparation during 30 days of storage at 37 °C in McIlvaine's buffer (pH 6.0) with no loss of catalytic activity [20]. In current study we further extended the storage time and report that during 140 days of incubation at 37 °C, Lsc3 retained 50% of initial sucrose-splitting activity. If the same preparation was kept at 50 °C, catalytic activity dropped more rapidly – after 32 days respective residual activity was only 6% from the initial. In current experiments, we kept the protein in 100 mM MES buffer (pH 6.5) supplemented with 150 mM NaCl. This buffer that was also used in a Thermofluor assay and it had no inhibitory effect on levansucrases (data not shown).

Thermofluor is a novel high-throughput method for protein characterization based on differential scanning fluorimetry [34]. In case of levansucrases, it has earlier been used for optimization of crystallization conditions of *Erwinia amylovora* levansucrase [8]. After having determined the optimal buffer conditions for wild-type Lsc3 we performed a Thermofluor assay on the panel of thirty seven levansucrase variants. Thermofluor assay allows to specify the melting temperature (T_m) of the protein. Increase of temperature

promotes unfolding of the protein and T_m is defined as the midpoint of the unfolding transition. A shift in T_m indicates a change in stability of the protein. The T_m for Lsc3 according to Thermofluor assay was 65.4 °C. Respective value of *E. amylovora* levansucrase was 57 °C and unfolding of this protein started at temperature over 45 °C [8]. In the assay, buffer conditions (100 mM HEPES buffer; pH 7.5 with 100 mM NaCl) were slightly different than those of our assay. When we conducted the Thermofluor assay of Lsc3 in 100 mM HEPES buffer (pH 7.5), the T_m value of it was only one degree lower than in 100 mM MES buffer (pH 6.5). Based on that we assume that Lsc3 is substantially more thermostable than levansucrase of *E. amylovora*.

Figure 7. Thermal inactivation assay of purified wild-type Lsc3 and mutant proteins Asp31Asn, Glu236Gln, Val248Ala, Thr302Met and Thr302Pro. After incubation of 5 μ M of a levansucrase protein in McIlvaine's buffer (pH 6.0) at a selected temperature, residual levansucrase activity was measured according to release of glucose from 100 mM sucrose [4]. The activity of a preparation kept at 20 °C, was used as reference for 100% of activity. Inner panel shows T_m values obtained by Thermofluor assay. The mean values of at least two parallel experiments and respective standard deviations are shown.



Most Lsc3 mutants of the test panel had T_m values close to wild-type protein, ranging from 62-66 °C. The mutants Asp31Asn, Val248Ala and Thr302Pro had much lower T_m values than the wild-type Lsc3, whereas the mutant Thr302Met occurred more stable than the wild-type Lsc3 – its T_m was 67.5 °C. We then performed a traditional thermal inactivation assay with wild-type Lsc3 and the mutants Asp31Asn, Glu236Gln, Val248Ala, Thr302Met and Thr302Pro. The proteins were incubated in McIlvaine's buffer (pH 6.0) for 30 min at a temperature ranging from 20 to 70 °C, cooled on ice and residual catalytic activity was determined by measuring release of glucose from 100 mM sucrose at 37 °C (see section 3.10). As a result, mutants with reduced T_m values according to Thermofluor assay also showed decreased thermostability in a traditional thermal inactivation study (Figure 7). We therefore

conclude that Thermofluor can be used as a high-throughput tool to evaluate thermostability of levansucrases and their mutant variants.

2.7. Structure-Function Analysis of Novel Lsc3 Mutants

In current work we introduce fourteen novel mutants of the Lsc3 protein of *P. syringae* pv. tomato DC3000. Phenotype of these mutants will be discussed according to location of mutated residue, starting from N- terminus of the protein.

The Asp31Asn substitution originates from a random multiple mutant of Lsc3, MutG. *E. coli* expressing MutG from a plasmid had nonmucoid colonies on sucrose-containing agar medium. This mutant Lsc3 variant had four substitutions: Asp31Asn, Glu252Gly, Asp300Asn and Cys371Trp [20]. Based on MutG, two single mutants, Asp300Asn [20] and Asp31Asn were designed. Position corresponding to Asp31 is not strictly conserved – levansucrases of different bacteria and archaea have also His, Ala, Asn or Glu at this position (data not shown). The Asp31Asn mutant has lowest thermostability from mutants of current work (Figure 7). It suggests that N-terminal domain of Lsc3 plays a role in stability of the whole protein. The Asp31Asn substitution probably interferes with proper folding of the protein. According to crystal structure data of *G. diazotrophicus* and *B. subtilis* levansucrases, stable folding of levansucrases is provided through coordinated packing of N- and C-termini of the polypeptide. Similarly to *B. subtilis* levansucrase, the N-terminus of the *G. diazotrophicus* LsdA protein runs along the perimeter of blade IV forming a clamp-like loop that adds a fifth β -strand to blade III [5]. Notably, the amino acids of LsdA that comprise additional stabilizing β -strand to blade III are in close proximity of the ‘RADAL’ motif [5] that harbours aspartate (underlined) corresponding to Asp31 of Lsc3.

The Trp109Arg mutant of Lsc3 is a counterpart of Trp109Arg mutant of *Z. mobilis* levansucrase, which displayed largely reduced levan synthesis [6]. We also made additional Trp109 substitutions with Ala and Phe. Figures 5 and 6 show that the Trp109Arg and Trp109Ala mutants display drastic reduction of levan and FOS synthesis. Some levansucrases, such as the *G. diazotrophicus* LsdA (see Figure 1), have a Phe at respective position. This explains why substitution of Trp109 with Phe restored the wild-type phenotype to Lsc3. Replacement of Trp109 with Phe even slightly enhanced levan synthesis (Figure 6). According to Betts and Russell [35], change of Trp to Phe is favoured in proteins, whereas change to Ala or Arg is not. We assume that Trp109 participates in forming of +2 subsite of substrate-binding pocket of Lsc3 (see Figure 2). As sucrose-splitting activity of Trp109Arg and Trp109Ala mutants is also strongly reduced (Figures 4 and 5), Trp109 is probably also involved in binding of the substrate at +1 and/or -1 subsites or contributing to substrate

cleavage reaction. This assumption is supported by the fact that the Trp109Arg mutant has strongly reduced affinity for sucrose – the K_m is increased to 249 mM (Table 1).

The Glu110Asp mutant was designed by us to study catalytic significance of a neighbour position of Trp109. As shown in Figure 1, this position is not conserved in levansucrases. For example, respective residue in LsdA of *G. diazotrophicus* is Asp. Our data on catalytic properties of Glu110Asp mutant show no considerable changes compared to wild-type protein. Yet, velocity of levan synthesis was reduced and K_m for sucrose was increased about 3 times (Figure 6, Table 1). Importantly, when Glu110 was changed to Ala, the protein completely precipitated and could not be purified by Ni^{2+} -affinity chromatography (data not shown) suggesting the importance of the position.

The His113Gln substitution was detected by us in a random double mutant (MutE) of Lsc3. Similarly to Trp80Arg mutant of *Z. mobilis* levansucrase [6], the His113Gln mutant was isolated from random mutagenesis. This mutant carried an additional substitution, Val195Ile, and *E. coli* expressing this protein had nonmucooid colonies on sucrose-containing agar plate. We chose to design the His113Gln mutant due to its proximity to a nucleophile Asp62 on the 3D model and a high conservation score. Figure 2 shows that homologues of His113 residue in levansucrases reside close to fructose residue (binds at -1 subsite) and galactose residue (binds at +2 subsite) of the raffinose molecule bound to the enzyme. Crystal structure of *Arthrobacter* sp. K-1 fructosyltransferase in complex with fructose (PDB: 3VSS; [36]) also shows that His147 in *Arthrobacter* sp. K-1 enzyme (a homologue of His113 of Lsc3) is at hydrogen-bondage distance from bound fructose. Notably, the *Arthrobacter* sp. K-1 enzyme is structurally similar to levansucrases [22, 36]. To verify the importance of His113 in the catalysis, we additionally constructed the His113Ala mutant. Similarly to His113Gln substitution, it had very strong effect on sucrose-splitting reaction and levan synthesis (Figure 4 and 6). Notably, the Gln substitution had even stronger negative effect on sucrose cleavage and FOS synthesis (Figure 5). We predict that His113 participates in binding of both fructosyl donor (at -1 subsite) and acceptor (at +2 subsite) to Lsc3. Importantly, this is the first report of catalytic importance of this position in levansucrases.

The Glu146Gln variant of Lsc3 was constructed to mimic the Glu117Gln mutant (see Figure 1) of *Z. mobilis* levansucrase. The Glu117Gln mutant had decreased affinity for sucrose and increased transfructosylating activity [6]. According to our results, the Glu146Gln mutant of Lsc3 displayed two-fold increase in K_m towards sucrose, whereas significantly enhanced transfructosylation was not detected (Table 1; Figure 6). Still, our assay showed that the Glu146Gln mutant produced more FOS per mg of protein than the wild-type Lsc3 (Figure 5), whereas levan production was reduced (Figure 6). Typically, levansucrases have a Glu at

position corresponding to Glu146 of Lsc3, but the *Arthrobacter* sp. K-1 β -fructofuranosidase which has a high transfructosylating activity, has a Gln [36]. We conclude that substitution of Glu146 in Lsc3 with Gln favours synthesis of FOS at the expense of levan.

The Glu236Gln mutant of Lsc3 corresponds to Glu211Gln mutant of *Z. mobilis* levansucrase which retained only 28% of hydrolyzing activity and 17% of transfructosylating activity of the wild-type protein [6]. The Glu236Gln mutant of Lsc3 showed decreased transfructosylation and ability to bind sucrose – the K_m was increased 14.4-fold (see Table 1 and Figures 5-6). The position corresponding to Glu236 in Lsc3 is completely conserved among levansucrases (see Figures 1 and 2). In-depth analysis of crystal structures of *B. subtilis* levansucrase SacB complexed with substrates (PDB IDs: 1PT2 in complex with sucrose and 3BYN with raffinose [9, 37]) revealed that Glu262 locates close to Arg246 of the RDP motif that participates in binding of the substrate at both, -1 and +1 subsites. According to both crystal structures, Glu262 forms hydrogen bonds with Arg246 and also with fructose and glucose residues of the substrate over a water molecule. We assume that Glu236 contributes to stabilization of the substrate in the active site.

The Val248Ala mutant of Lsc3 is a counterpart of Val223Ala mutant of *Z. mobilis* levansucrase that displayed tenfold decrease of k_{cat} whereas the TA value remained the same [6]. The V_{max} of sucrose-splitting reaction of Val248Ala mutant of Lsc3 comprised 39% of the wild-type level when measured at 37 °C (Figure 5). However, the T_m value of the Val248Ala mutant was 16 degrees lower than of the wild-type enzyme and its reduced thermostability was also clearly seen in a traditional thermal inactivation assay (Figure 7). We assume that Val248Ala substitution affects folding of Lsc3 protein and thereby its stability and catalytic activity.

We have previously described the Asp300Asn mutant originating from random mutagenesis [20]. This substitution slightly reduces the affinity of the protein for sucrose. An interesting feature of the Asp300Asn mutant is production of long-chain FOS, with DP up to 10, whereas the wild-type Lsc3 synthesizes FOS with DP up to 7 [20, 22]. The Asp300Ala mutant addressed in current work behaved similarly to wild-type Lsc3, producing FOS with DP up to 8 (Table 1). Thus, for yet unknown reason, presence of Asn at position 300 of Lsc3, promotes synthesis of long-chain FOS.

The Asp333Asn mutant of Lsc3 was constructed to mimic the Asp308Asn mutant of *Z. mobilis* levansucrase. The Asp308Asn mutant had slightly decreased transfructosylation ability and about four-fold decreased affinity for sucrose [6]. Respective position is highly conserved in levansucrases (Figure 1). Yet, in *Arthrobacter* sp. K1 enzyme, a Glu, and in *B. subtilis* SacB an Asn (Asn372) is found on the same position (Figure 1). Aside of making the

Asp333Asn mutant, we also constructed respective Ala substitution variant. V_{\max} of sucrose-splitting reaction of the Asp333Ala mutant was four-fold lower compared to wild-type enzyme and levan synthesis was also significantly reduced. The Asp333Asn mutant behaved much more similarly to wild-type Lsc3 than the Asp333Ala (Figures 5 and 6). We suppose that Asp333 can be involved in substrate binding and elongation of the fructan chain.

3. Experimental Section

3.1. Construction of Levansucrase Mutants

Mutant variants of levansucrase *lsc3* gene were constructed using primer-based site-specific mutation strategy as shown earlier [20, 22]. Mutagenic oligonucleotides and respective amino acid replacements are listed in Table S1. Cloning of the genes into the expression vector pURI3 [38] was performed as shown in [20] and [22]. Plasmid DNA was purified using FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) and the mutations were verified by DNA sequencing.

3.2. Cultivation of Bacteria and Purification of Recombinant Levansucrases

Transformed *E. coli* was grown in LB broth containing ampicillin (Amp) 0.15 mg/mL at 37 °C. Mutated and wild-type Lsc3 proteins were overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) [39]. Purification of N-terminally His-tagged proteins was performed as in [20]. For phenotypic evaluation of *E. coli* BL21(DE3) transformants expressing levansucrase variants, they were grown overnight at 37 °C on MacConkey + Amp medium containing 10% sucrose and 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The plates were further kept at room temperature (23 °C) until levan synthesis (slime production) and acid production (pink colour) from the sugar became evident.

3.3. Permeabilization of *E. coli* Cells and Sucrose-Splitting Activity Assay of Levansucrases on Permeabilized Bacteria

Levansucrase-expressing transformants of *E. coli* BL21(DE3) were grown overnight in LB-Amp broth on a sterile 96-well flat-bottom transparent polystyrol microplate (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Germany) at 37 °C on a shaker (900 rpm) with 200 μ L of the culture per well. Overnight cultures were diluted in LB-Amp broth to $OD_{600\text{ nm}}$ of ~ 0.016 (respective value measured in a 1 cm-pathway cuvette is 0.05) and were further agitated on a shaker at 37 °C for 2 h. To induce levansucrase expression, IPTG was added to the wells (final concentration 0.5 mM) and a microplate was further incubated on a shaker at 22 °C for 20 h. Then, $OD_{600\text{ nm}}$ values of the cultures were measured and they were diluted approximately 10 times in McIlvaine's buffer (pH 6.0) to obtain the $OD_{600\text{ nm}}$ value of

approximately ~0.067 (respective value measured in a 1 cm-pathway cuvette is 0.2).

Undiluted culture was used in case of clones with severely reduced sucrose-splitting activity.

Next, the cells were permeabilized with 0.1% CTAB (cetyltrimethylammonium bromide). Briefly, 50 μ L of microplate-grown and appropriately diluted *E. coli* BL21(DE3) cultures were combined with 50 μ L of 0.2% CTAB solution in McIllvaine's buffer (pH 6.0) in wells of a new microplate and agitated (900 rpm) for 10 min at room temperature to permeabilize cellular membranes. Levansucrase reaction was then started by adding 50 μ L of 300 mM sucrose (final concentration 100 mM) in McIllvaine's buffer (pH 6.0). Reaction was conducted at 37 °C for 5 min and then stopped by transferring 10 μ L of the reaction mixture into a new well containing 30 μ L of Tris buffer (200 mM, pH 8.3), subsequently heated at 96 °C for 5 min and cooled on ice. Released glucose was visualized by adding 160 μ L of Glucose liquicolor reactive (Human GmbH, Germany) and incubating the plate for 5 min at 37 °C. Absorbance of the reddish complex was measured at 500 nm. All absorbance values were recorded using Infinite M200 PRO microplate reader (Tecan Group Ltd., Switzerland) equipped with Tecan i-control 1.7 software. *E. coli* culture BL21(DE3) carrying the empty pURI3 plasmid served as negative control for the assay. The sucrose-splitting activity was normalized to OD_{600 nm} value of cell suspension in the well and was expressed as percentage from respective normalized activity of the wild-type Lsc3.

3.4. Sucrose-splitting Activity Assay on Microplates Using Purified Levansucrases

To measure sucrose-splitting activity of purified levansucrases, proteins were diluted in McIllvaine's buffer to contain 2 U/mL of the enzyme. Unit values were calculated from sucrose-splitting activity measurements with 100 mM sucrose at 37 °C [4, 20]. Assay was conducted as in case of using permeabilized cells (see section 3.3), but instead of cells, appropriately diluted purified proteins were used. 50 μ L of purified protein preparation (final concentration in reaction mixture 0.67 U/mL; approximately 1.7 μ g/mL in case of wild-type Lsc3) were combined with equal amount of McIllvaine's buffer (pH 6.0). In case of mutants with extremely low sucrose-splitting activities, 10 μ g of protein per well (66.7 μ g/mL) were used. Reaction was started by adding 50 μ L of 300 mM sucrose (final concentration 100 mM) in McIllvaine's buffer and conducted for 5 min at 37 °C. Stopping of the reaction and measurement of glucose content were performed as described above (see section 3.3). Glucose released from sucrose was quantified from respective calibration curve. Activity unit expresses the content of glucose in μ moles produced per min per mg of levansucrase protein (U/mg). Activity value obtained with wild-type Lsc3 was taken for 100%.

3.5. FOS-production Assay of Levansucrases Using Permeabilized *E. coli*

50 μL of levansucrase-expressing *E. coli* BL21(DE3) cultures were permeabilized as shown in section 3.3. Then, 100 μL of 2 M sucrose (final concentration in a well 1 M) in McIlvaine's buffer were added, plate was sealed firmly to avoid evaporation and incubated without agitation at 37 °C for 20 hours. The reaction was stopped by heating the microplate for 5 min at 96 °C. For HPLC analysis of polymerization products, the reaction samples were transferred from the microplate to microtubes and centrifuged for 10 min at 16 000 g. The supernatants were withdrawn and further incubated for 10 min at 96 °C to completely inactivate levansucrase protein. Mono- and oligosaccharides in the samples were analysed using HPLC (section 3.9). *E. coli* culture BL21(DE3) carrying the empty pURI3 plasmid served as negative control for the assay.

3.6. FOS-production Assay of Levansucrases Using Purified Proteins

The FOS-production assay was conducted as described in [22]. Purified proteins (2.7 U/ml) were incubated in McIlvaine's buffer (pH 6.0) containing 1.2 M sucrose at 37 °C for 20 h. Reaction was conducted in Eppendorf tubes, final volume of the reaction mixture was 1 mL. In case of mutants with severely reduced catalytic activity (Trp61Ala, Trp61Asn, Asp62Ala, Trp109Arg, Asp219Ala, Arg304Cys, Glu303Ala, Glu303Gln), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of purified protein was used in the reaction. Reaction was stopped by heating samples at 96 °C for 5 min. Mono- and oligosaccharides in the samples were analysed using HPLC (section 3.9).

3.7. Levan Synthesis Assay of Levansucrases on Microplates Using Purified Proteins

Levan synthesis kinetics from sucrose by purified Lsc3 variants was recorded on microplates using 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration in reaction mixture) of purified protein. The proteins were diluted in McIlvaine's buffer (pH 6.0) and incubated at 37 °C on transparent flat-bottom polystyrene microplates in total volume of 200 μL per well. The reaction was started by adding 2 M sucrose in McIlvaine's buffer at final concentration 0.6 M. Microplates were incubated in Infinite M200 PRO microplate reader (Tecan Group Ltd., Switzerland) at 37 °C and turbidity ($\text{OD}_{400\text{ nm}}$) values were recorded every 15 minutes during 12 h.

3.8. Determination of V_{max} , K_{m} for Sucrose and Transfructosylating Activity of Purified Proteins

K_{m} and V_{max} of levansucrases were determined as shown previously [22]. Initial velocities of sucrose-splitting reaction were determined at varied concentrations (from 5 to 1200 mM) of sucrose. Data were analysed using Enzyme Kinetics Module 1.1 of the Sigma Plot 2001

(SYSTAT, IL, USA). Protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm. The extinction coefficients were computed at ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org>).

Transfructosylating activity (TA) was calculated as percentage of fructose residues from reacted sucrose molecules incorporated into polymerization products [6, 20, 22].

3.9. Quantification of Sugars by HPLC Analysis

HPLC method was used to quantify glucose, fructose, sucrose and FOS content of reaction mixtures [22, 40]. Chromatography was performed on an Acquity UPLC system (Waters, MA, USA) coupled with evaporative light scattering (ELS) detector similarly as in [22]. The mobile phase consisted of LC-grade water (A) and acetonitrile (B). The gradient of solvent B was following: 70-50% 15 min; 50% 10 min; 50-70% 2 min; 70% 13 min at flow rate of 0.6 mL/min. D-glucose (Oriola, Finland), D-fructose (Sigma-Aldrich, Germany), sucrose (Serva, Germany), raffinose (Naxo, Estonia), 1-kestose (Sigma-Aldrich, Germany) and nystose (Sigma-Aldrich, Germany) were used as standards. Calibration curves were made using standard solutions with concentrations ranging from 0.1 to 5 mg/mL. FOS in the range of degree of polymerization of 3-10 were calibrated against raffinose.

3.10. Thermofluor Assay of Thermostability of Levansucrases and Levansucrase Activity Assay of Thermostability

Thermal shift assay, also known as Thremofluor® [34], was performed using a LightCycler® 480 System (Roche, Switzerland). Combined channels (465-580 nm) were selected as suitable for the measurements using SYPRO® Orange (Sigma-Aldrich, Germany) as fluorescent dye. The analysed samples (final amount 20 µL) contained 2 µM of protein and 5x SYPRO® Orange in 100 mM MES buffer (pH 6.5) with 150 mM NaCl. Samples were pipetted onto a Roche white LightCycler® 480 multiwell plate for 96 samples and sealed with foil as recommended by the manufacturer. The plate was centrifuged at room temperature at 200 g for 30 s to remove the air bubbles.

Temperature gradient from 27° to 95 °C was applied and data was recorded using LightCycler® 480 software (release 1.5.0 SP3). The melting temperature (T_m), used here as a thermostability characteristic of levansucrases, is defined as temperature at which half of the protein in the studied sample is unfolded. The T_m was specified as temperature at which the derivative curve apex had a minimum value. Mutants that differed significantly from the wild-type Lsc3 according to T_m were selected for traditional thermostability assay to obtain data for comparison. Purified Lsc3 mutants Asp31Asn, Glu236Gln, Val248Ala, Thr302Met,

Thr302Pro and the wild-type Lsc3 (5 μ M of protein in McIlvaine's buffer; pH 6.0) were incubated at varied temperature (from 20 to 70°C) for 30 minutes and then cooled on ice. Residual levansucrase activity of the samples was measured at 37 °C by quantifying the release of glucose from 100 mM sucrose as in [4, 20].

Acknowledgments

This research was funded partially by Estonian Science Foundation grants 9072 and SF0180088s08. ERF grant 3.2.0701.12–0041 (SLOMR12215T) managed by the Archimedes Foundation covered part of experimental costs and open access publication costs. We thank D. Lubenets for kind help in Themofluor experiments.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Lammens, W.; Le Roy, K.; Schroeven, L.; Van Laere, A.; Rabijns, A.; Van den Ende, W. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 727–740.
- [2] Hettwer, U.; Gross, M.; Rudolph, K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 2834–2839.
- [3] Li, H.; Ullrich, M. Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 3282–3292.
- [4] Visnapuu, T.; Mäe, A.; Alamäe, T. *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.* **2008**, *43*, 414–422.
- [5] Martínez-Fleites, C.; Ortíz-Lombardía, M.; Pons, T.; Tarbouriech, N.; Taylor, E.J.; Hernández, L.; Davies, G.J. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* **2005**, *390*, 19–27.
- [6] Yanase, H.; Maeda, M.; Hagiwara, E.; Yagi, H.; Taniguchi, K.; Okamoto, K. Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J. Biochem.* **2002**, *132*, 565–572.
- [7] Geier, G.; Geider, K. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1993**, *42*, 387–404.
- [8] Caputi, L.; Cianci, M.; Benini, S. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of *EaLsc*, a levansucrase from *Erwinia amylovora*. *Acta Crystallogr. F* **2013**, *F69*, 570–573.
- [9] Meng, G.; Fütterer, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 935–941.
- [10] Homann, A.; Biedendieck, R.; Götze, S.; Jahn, D.; Seibel, J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* **2007**, *407*, 189–198.
- [11] Van Geel-Schutten, G.H.; Faber, E.J.; Smit, E.; Bonting, K.; Smith, M.R.; Ten Brink, B.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F.G.; Dijkhuizen, L. Biochemical and structural

- characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 3008–3014.
- [12] Korakli, M.; Pavlovic, M.; Gänzle, M.G.; Vogel, R.F. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 2073–2079.
- [13] Kang, H.K.; Seo, M.Y.; Seo, E.S.; Kim, D.; Chung, S.Y.; Kimura, A.; Day, D.F.; Robyt, J.F. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, 1727, 5–15.
- [14] Gibson, G.R.; Scott, K.P.; Rastall, R.A.; Tuohy, K.M.; Hotchkiss, A.; Dubert-Ferrandon, A.; Gareau, M.; Murphy, E.F.; Saulnier, D.; Loh, G.; Macfarlane, S.; Delzenne, N.; Ringel, Y.; Koziarowski, G.; Dickmann, R.; Lenoir-Wijnkoop, I.; Walker, C.; Buddington, R. Dietary prebiotics: current status and new definition. *IFIS Functional Foods Bulletin* **2010**, 7, 1–19.
- [15] Koropatkin, N.M.; Cameron, E.A.; Martens, E.C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, 10, 323–335.
- [16] Marx, S.P.; Winkler, S.; Hartmeier, W. Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 182, 163–169.
- [17] Kilian, S.; Kritzinger, S.; Rycroft, C.; Gibson, G.; du Preez, J. The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota. *World J. Microb. Biot.* **2002**, 18, 637–644.
- [18] Marsh, A.J.; O'Sullivan, O.; Hill, C.; Ross, R.P.; Cotter, P.D. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, 348, 79–85.
- [19] Alamäe, T.; Visnapuu, T.; Mardo, K.; Mäe, A.; Zamfir, A.D. Levansucrases of *Pseudomonas* bacteria: novel approaches for protein expression, assay of enzymes, fructooligosaccharides and heterooligofructans. In *Carbohydrate Chemistry, Specialist Periodical Reports*; Rauter, A.P., Lindhorst, T.K., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2012; Volume 38, pp. 176–191.
- [20] Visnapuu, T.; Mardo, K.; Mosoarca, C.; Zamfir, A.D.; Vigants, A.; Alamäe T. Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation. *J. Biotechnol.* **2011**, 155, 338–349.

- [21] Visnapuu, T.; Zamfir, A.D.; Mosoarca, C.; Stanescu, M.D.; Alamäe, T. Fully automated chip-based negative mode nanoelectrospray mass spectrometry of fructooligosaccharides produced by heterologously expressed levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1337–1346.
- [22] Mardo, K.; Visnapuu, T.; Vija, H.; Elmi, T.; Alamäe, T. Mutational analysis of conserved regions harboring catalytic triad residues of the levansucrase protein encoded by the *lsc-3* gene (*lsc3*) of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2014**, *61*, 11–22.
- [23] Geiser, M.; Cebe, R.; Drewello, D.; Schmitz, R. Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *Biotechniques* **2001**, *31*, 88–92.
- [24] Rivas, B.d.l.; Curiel, J.A.; Mancheño, J.M.; Muñoz, R. Expression vectors for enzyme restriction- and ligation-independent cloning for producing recombinant His-fusion proteins. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 680–686.
- [25] Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797.
- [26] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.
- [27] Li, S.; Yan, Y.; Zhou, Z.; Yu, H.; Zhan, Y.; Zhang, W.; Chen, M.; Lu, W.; Ping, S.; Lin, M. Single amino acid residue changes in subsite -1 of levansucrase from *Zymomonas mobilis* 10232 strongly influence the enzyme activities and products. *Mol. Biol. Rep.* **2011**, *38*, 2437–2443.
- [28] Alamäe, T.; Järviste, A. Permeabilization of the methylotrophic yeast *Pichia pinus* for intracellular enzyme analysis: a quantitative study. *J. Microbiol. Meth.* **1995**, *22*, 193–205.
- [29] Suppi, S.; Michelson, T.; Viigand, K.; Alamäe, T. Repression vs. activation of MOX, FMD, MPP1 and MAL1 promoters by sugars in *Hansenula polymorpha*: the outcome depends on cell's ability to phosphorylate sugar. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 219–232.
- [30] de Abreu, M.A.; Alvaro-Benito, M.; Plou, F.J.; Fernández-Lobato, M.; Alcalde, M. Screening β -fructofuranosidases mutant libraries to enhance the transglycosylation rates of β -(2 \rightarrow 6) fructooligosaccharides. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2011**, *14*, 730–738.
- [31] Hernandez, L.; Arrieta, J.; Menendez, C.; Vazquez, R.; Coego, A.; Suarez, V.; Selman, G.; Petit-Glatron, M.F.; Chambert, R. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* **1995**, *309*, 113–118.

- [32] Batista, F.R.; Hernández, L.; Fernández, J.R.; Arrieta, J.; Menéndez, C.; Gómez, R.; Támara, Y.; Pons, T. Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affects sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. *Biochem. J.* **1999**, 337, 503–506.
- [33] Tambara, Y.; Hormaza, J.V.; Perez, C.; Leon, A.; Arrieta, J.; Hernandez, L. Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Biotechnol. Lett.* **1999**, 21, 117–121.
- [34] Pantoliano, M.W.; Petrella, E.C.; Kwasnoski, J.D.; Lobanov, V.S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B.A.; Lane, P.; Salemme, F.R. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol Screen.* **2001**, 6, 429–440.
- [35] Betts, M.J.; Russell, R.B. Amino acid properties and consequences of substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists*; Barnes, M.R., Gray, I.C., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: West Sussex, UK, 2003; pp. 289–316.
- [36] Tonzuka, T.; Tamaki, A.; Yokoi, G.; Miyazaki, T.; Ichikawa, M.; Nishikawa, A.; Ohta, Y.; Hidaka, Y.; Katayama, K.; Hatada, Y.; Ito, T.; Fujita, K. Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp. K-1 β -fructofuranosidase. *Enzyme Microb. Technol.* **2012**, 51, 359–365.
- [37] Meng, G.; Fütterer, K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct. Biol.* **2008**, 8, 16.
- [38] Curiel, J.A.; de Las Rivas, B.; Mancheño, J.M.; Muñoz, R. The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Expr. Purif.* **2011**, 76, 44–53.
- [39] Studier, F.W., Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **1986**, 189, 113–130.
- [40] Downes, K.; Terry, L.A. A new acetonitrile-free mobile phase method for LC–ELSD quantification of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.). *Talanta* **2010**, 82, 118–124.

LISA 2

Levaansukraaside aminohappeliste järjestuste joondus. *P. syringae* pv. tomato Lsc3, *Burkholderia indica*, *Burkholderia phymatum*'i, *Burkholderia pseudomallei*, *Arthrobacter* sp. K-1, *Actinomyces viscosus*'e, *Streptomyces viridochromogenes*'e, *Cellulomonas flavigena*, *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* (LscA), *Gluconacetobacter diazotrophicus*'e (LsdA), *Erwinia amylovora*, *Rahnella aquatilis*'e, *P. fluorescens*'i, *Serratia odorifera*, *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Q48JY3), *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Q48BC9), *Zymomonas mobilis*'e, *Gluconacetobacter oxydans*'i, *Clostridium acetobutylicum*'i, *Halorubrum lacusprofundi*, *Haloalkalicoccus jeotgali*, *Halomicrobium mukohataei*, *Haloarcula marismortui*, *B. megaterium*'i (SacB), *B. subtilis*'e (SacB) levaansukraasid. Rohelisega on tähistatud magistritöös käsitletud mutandid, punasega on tähistatud katalüütilise kolmiku aminohapete positsioonid.

Conservation		1151331111	1113121111	114-----71	--78986846	75437264--	
Q88BN6_Lsc3	2	YNSNSAVSQL	QNSPLVDNIK	YPP-----TV	--W SR AD AL K	VNENDPTT--	42
182678986_B.indica	26	----QAQSGY	PIPTPHSGQA	YDPFADFTAK	--W TR AN AR Q	IKAQSHVPVS	70
B2JYV2_B.phymatum	36	----TATPGF	PAPTPHSQQA	YDPESHFTMR	--W TR AD IR Q	IKAQSHAATA	80
Q3JGQ0_B.pseudomallei	33	----SDGAG-	PAPTPHTQQA	YDPESHFTMR	--W TR AD MR Q	IVKQSHTA-G	75
Q8VW87_A.sp.K-1	37	----SGLQDG	PEPTIHTQQA	YAPEDDFTAK	--W TR AD AR Q	LQRMSDPTAP	81
304364376_A.viscosus	99	TGFKADNPGW	ANATKHTGAA	HGVEENYAK	--W TR AD AM Q	IQRVSNPNAP	146
302555562_S.viridochromogenes	26	----PASASP	HEASRTGARQ	YTADDHTAV	--W SR AD AL K	LKQ-DRTN--	67
296131231_C.flavigena	44	LPGGSTTLQP	RGGGSSVDAV	FSPRSSYTAN	--W TR AA AL Q	IRQ-DASN--	88
Q93FU9_P.aurantiaca	1	-----MK	SNTEKFGKAP	HQP-----SL	--W TR AD AL K	VHADDPTT--	33
Q43998_G.diazotrophicus	58	GRSLAGVPGF	PLPSIHTQQA	YDPQSDFTAR	--W TR AD AL Q	IKAHSDATVA	105
Q46654_E.amylovora	1	-----MSDYN	YKP-----TL	--W TR AD AL K	VHEDDPTT--		26
O54435_R.aquatilis	1	-----MTNLN	YTP-----TI	--W TR AD AL K	VNENDPTT--		26
C3K8D6_P.fluorescens	1	-----MKHAN	HTP-----TR	--W TR AD AL K	VNENDPTT--		26
D1RZ84_S.odorifera	1	-----MTNVN	YKP-----TI	--W TR AE AL K	VNEKDPTT--		26
Q48JY3_P.s.pv.phas	1	-----MSNIN	YAP-----TI	--W SR AD AL K	VNENDPTT--		26
Q48BC9_P.s.pv.phas	2	STSSSAVSQL	KNSPLAGNIN	YEP-----TV	--W SR AD AL K	VNENDPTT--	42
Q60114_Z.mobilis	1	-----MLNKAGI	AEP-----SL	--W TR AD AM K	VHTDDPTA--		28
58039338_G.oxydans	1	-----MNAVSSTQSA	IQSG----SR	--W TR IA AD AMK	IHTDDPTT--		32
15895050_C.acetobutylicum	16	----LAILTI	PFLILRHNTG	YT-----SI	--W SR QA Q Q	FKCTKEN--	51
B9LT89_H.lacusprofundi	1	-----MHETPESDGG	RSR-----SR	--W TR EQ AA S	IERRRGNI--		31
300710312_H.jeotgali	1	-----MTPEHSGR	ATP-----R	--W TR EH AS K	IERTDET--		27
C7P4M9_H.mukohataei	1	-----MSKDSPGT	AVPGHGARG	--W SR EQ AS R	IERTDDT--		33
Q5V249_H.marismortui	1	-----MTNEALGEGRS	GTK-----GR	AG TR EQ AS R	IERTDDT--		33
D5DC07_B.megaterium	17	----ALLVGG	GYQTFAGKND	SKDFNNSYGI	SHIT TR DNMVK	IPQQQNSD--	61
P05655_B.subtilis	17	----ALLAGG	ATQAFAKETN	QKPYKETYGI	SHIT TR HDMLQ	IPEQQKNE--	61

Asp62

Conservation		7691621456	44542----	-----757	9998596336	
Q88BN6_Lsc3	42	TQPLVLSADFP	VMSDT----	-----VFI	WDTMPLRRLD	70
182678986_B.indica	71	PDQNSLPLNL	TMPDTPADFP	-----VWV	WDTWPLADVH	108
B2JYV2_B.phymatum	81	ADKNSLPLSL	TMPDTPQDFP	-----VWV	WDTWPLADM	118
Q3JGQ0_B.pseudomallei	76	ADKNSLPPAL	TMPDTAQNFP	-----VWV	WDTWPLADM	113
Q8VW87_A.sp.K-1	82	SRENSMPASV	TMPVTPQDFP	-----VWV	WDTWPLTDED	120
304364376_A.viscosus	147	SGTNSMPEQL	TMPEISNGFP	-----VWV	WDTWTLTDEA	184
302555562_S.viridochromogenes	67	-----	TAPRVSPDFP	-----VWV	WDTWPLTKLN	95
296131231_C.flavigena	88	-----	TKPRTPAEFP	-----VWI	WDTWPLTTL	116
Q93FU9_P.aurantiaca	33	-----	TQPLVLSADFP	-----VFI	WDTWPLRDL	61
Q43998_G.diazotrophicus	106	AGQNSLPAQL	TMPNTPADFP	-----VWV	WDTWTLIDKH	143
Q46654_E.amylovora	26	-----	TQPVLDIAFP	-----VFI	WDTMPLRDFD	54
O54435_R.aquatilis	26	-----	TQPIVDADFP	-----VFI	WDTMPLRSLD	54
C3K8D6_P.fluorescens	26	-----	TQPLVSPDFP	-----VFI	WDTMPLRRLD	54
D1RZ84_S.odorifera	26	-----	TQPLVLSADFP	-----VFI	WDTMPLRRLD	54
Q48JY3_P.s.pv.phas	26	-----	TQPLVSPDFP	-----VFI	WDTMPLRRLD	54
Q48BC9_P.s.pv.phas	42	-----	TQPLVLSADFP	-----VFI	WDTMPLRRLD	70
Q60114_Z.mobilis	28	-----	TMPTLDYDFP	-----YVY	WDTWPLRDLN	56
58039338_G.oxydans	32	-----	TMPTLDYAFP	-----VWQ	WDTWLLRDIH	60
15895050_C.acetobutylicum	51	-----	TAPNINPNFK	-----LWV	WDTWPLVKKD	79
B9LT89_H.lacusprofundi	31	-----	APPAGAPE-L	-----LHV	WDTWLLRRH	58
300710312_H.jeotgali	27	-----	VVEPIYPPRE	-----ING	WDTWFLPRE	55
C7P4M9_H.mukohataei	33	-----	TAPIVYPPAT	-----VHV	WDTWLLRERD	61
Q5V249_H.marismortui	33	-----	VAPIVYPPQT	-----VHI	WDTWFLNRD	61
D5DC07_B.megaterium	61	-----QF	KVPAFDESTI	-----ASG	WDSWPLQAD	103
P05655_B.subtilis	61	-----KY	QVPEFDSSTI	-----LDV	WDSWPLQAD	94

Trp109
Glu110
His113

Conservation		7345664975	7777989773	2135321111	7378734365	7995494864	
Q88BN6_Lsc3	71	GTVSVNGWS	VIIITLTADR	PDDPQYLGPD	GRYDIKRD	DHGRMRCY	120
182678986_B.indica	109	GNQLSFQGW	VIFSLTADPH	AG-----	AG-----	DRHVHARIGF	144
B2JYV2_B.phymatum	119	ANQLAYKGW	VIFSLTADPH	AG-----	-----YTFD	DRHVHARIGF	154
Q3JGQ0_B.pseudomallei	114	ANQLSYKGW	VIFSLSADPR	AG-----	-----YTFD	DRHVHARIGF	149
Q8VW87_A.sp.K-1	121	ANQYSVNGW	IIFSLVADR	LG-----	-----FD	DRHVFAKIGY	154
304364376_A.viscosus	185	AHQISYNGW	IAFSLVADR	AG-----	-----YTFD	DRHTHARIGF	220
302555562_S.viridochromogenes	96	TQTATYKGW	VIFSLTAPRS	VP-----	-----FG	DRHWYAKIGY	129
296131231_C.flavigena	117	MEPVAYEWN	IIFALTAPRD	IF-----	-----FG	DRHWQARIGY	150
Q93FU9_P.aurantiaca	62	GNITSVDGWS	VIFSLTADR	PNDPEYIDEN	GNYDITRDWN	DRHGAKMY	111
Q43998_G.diazotrophicus	144	ADQFSYNGW	VIFSLTADPN	AG-----	-----YGF	DRHVHARIGF	179
Q46654_E.amylovora	55	GEIISVNGWC	IIFSLTADR	TDNPQFQDEN	GNYDITRDWE	DRHGARICY	104
O54435_R.aquatilis	55	GTVSVVDGWS	VIFSLTAQRN	NNNSEYLD	GNYDITSDWN	NRHGARICY	104
C3K8D6_P.fluorescens	55	GTVSVNGWS	VIFSLTADR	PHDPQFINAD	GRYDIKRDWE	DRHGARICY	104
D1RZ84_S.odorifera	55	GTVSVNGWS	VILTITADR	PHDPQYIDGN	GNYDIKRDWE	DRHGARMCY	104
Q48JY3_P.s.pv.phas	55	GTVSVNGWS	VIVITLADR	PDDPQYVGN	GRYDIKRDWE	DRHGARMCY	104
Q48BC9_P.s.pv.phas	71	GTVSVNGWS	VILTITADR	PNDPQYLDAN	GRYDIKRDWE	DRHGARMCY	120
Q60114_Z.mobilis	57	GQVVSFQGW	VIFALVADR	-----	-----KYGWH	NRNDGARICY	91
58039338_G.oxydans	61	GKTVTFKGW	VMFALVADR	ATG-----	-----DTVEGWH	SRNNSYIGY	100
15895050_C.acetobutylicum	80	GSLAVVNGYK	VIFALTASRN	VG-----	-----WN	KRHVDVAGISY	113
B9LT89_H.lacusprofundi	59	GEIADVNGYR	LAFSLTAPAD	LL-----	-----PG	KRHVDVAEIRC	92
300710312_H.jeotgali	56	GSIATVGGWR	VIFSLTAPAD	LL-----	-----PG	KRHVDVAEIRY	89
C7P4M9_H.mukohataei	62	GTVAIVDGYR	VTFSLTAPAD	LL-----	-----PG	KRHVDVAEIRY	95
Q5V249_H.marismortui	62	GTLATVDGYR	VCFSLTAPSD	LL-----	-----PG	KRHVDVAEIRC	95
D5DC07_B.megaterium	104	GTVAIVYHGY	IVFALAGDPK	DS-----	-----	---NDTSVYL	132
P05655_B.subtilis	95	GTVANYHGYH	IVFALAGDPK	NA-----	-----	---DDTSIYM	123

Glu146

Conservation		888579----	-----4	5924695874	5756-----	---4467898	
Q88BN6_Lsc3	121	WYSRTG----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREWA	148
182678986_B.indica	145	FYRKAGIPAN	Q----RPIDG	GWYGGHLFP	DCSSVKVFGN	VPMTQNAEWS	190
B2JYV2_B.phymatum	155	FYRRAGIPAS	Q----RPANG	GWYGGHLFP	DCASVKVFGT	SPMTDNAEWS	200
Q3JGQ0_B.pseudomallei	150	FYRRAGIPAS	Q----RPANG	GWYGGHLFP	DCASAKVFGT	APMTNNAEWS	195
Q8VW87_A.sp.K-1	155	FYRPAQVPAE	E----RPENG	GWYGGHLVFK	EGVTGQIFED	QSFHQQTQWS	200
304364376_A.viscosus	221	FYRKAGTQTS	SADGANSSNG	GWYGGHVFP	DCASGSIFED	QSFTAQTQWS	270
302555562_S.viridochromogenes	130	FYSRDA----	-----K	SWKYGGDLFP	AGTS-----	---FGSREWA	157
296131231_C.flavigena	151	FYSQDA----	-----Q	NWYGGDLFP	AGSS-----	---FGSREWA	178
Q93FU9_P.aurantiaca	112	WFSRTG----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTAREWA	139
Q43998_G.diazotrophicus	180	FYRRAGIPAS	R----RPVNG	GWYGGHLFP	DCASAQVYAG	QTYTNQAEWS	225
Q46654_E.amylovora	105	WYSRTG----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVA-----	---PTTREWA	132
O54435_R.aquatilis	105	WYSRTG----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREWA	132
C3K8D6_P.fluorescens	105	WYSRTG----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREWA	132
D1RZ84_S.odorifera	105	WYSRTG----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREWA	132
Q48JY3_P.s.pv.phas	105	WYSRTG----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREWA	132
Q48BC9_P.s.pv.phas	121	WYSRTG----	-----K	DWIFGGRVMA	EGVS-----	---PTTREWA	148
Q60114_Z.mobilis	92	FYSRGC----	-----S	NWIFGGHLLK	DCAN-----	---PRSWEWS	119

58039338_G.oxydans	101	YYSRTG	-----NGA	DWKEGGRVIK	EGAN	-----	---SRSWEWS	130
15895050_C.acetobutylicum	114	FCSTDC	-----E	NWVYKGLAYN	VEDA	-----	---LGSROWA	141
B9LT89_H.lacusprofundi	93	FYSADG	-----K	RWHDAGPVFD	GGA	-----	---LGQROWA	119
300710312_H.jeotgali	90	FYSRDC	-----E	TWFDGGPVFE	GCTR	-----	---GSRQWA	116
C7P4M9_H.mukohataei	96	FYSADG	-----R	TWQPGGVVFE	EP	-----	---LGQRTWA	121
Q5V249_H.marismortui	96	FYSDDG	-----R	NWHNAGPVFE	EP	-----	---LGQROWA	121
D5DC07_B.megaterium	133	FYKKAQ	-----DKSID	SWKNAGRVPK	DSDKFVPNDP	HLKNQQTQEWS		173
P05655_B.subtilis	124	FYQKVG	-----ETSID	SWKNAGRVPK	DSDKFDANDS	ILKDQQTQEWS		164

Conservation	9876633311	-----	---5-74478	965	-----	-----		
Q88BN6_Lsc3	149	GTPILLNDKG	-----	---D-IDLYY	TCV	-----	-----	167
182678986_B.indica	191	GGARF--VGG	PYADGPFQHAY	LKNNNVSLYY	TATSFNRNA	-----	---Q	228
B2JYV2_B.phymatum	201	GSARL--THG	-----	---DNVSLYY	TATSFNRSA	-----	---P	225
Q3JGQ0_B.pseudomallei	196	GSARL--THG	-----	---ENVSLYY	TALSFNRSA	-----	---P	220
Q8VW87_A.sp.K-1	201	GSARVSKNGE	-----	---IKLFF	TDVAFYRNS	-----	---	224
304364376_A.viscosus	271	GSARLMGNGK	-----	---IRMEY	TSVAFYNTTT	GGSGDGGYGO		305
302555562_S.viridochromogenes	158	GSTALIGDK-	-----	---VQSFY	TASGRDNGGV	-----	---	181
296131231_C.flavigena	179	GSTVLTDDGE	-----	---VHAFY	TASGRDNGGI	-----	---	203
Q93FU9_P.aurantiaca	140	GTPILLNEQG	-----	---D-VDLYY	TAV	-----	---	158
Q43998_G.diazotrophicus	226	GSSRLMQIHG	-----	---NTVSVEY	TDVAFNRDA	-----	---N	252
Q46654_E.amylovora	133	GTPILLNDRG	-----	---D-IDLYY	TCV	-----	---	151
O54435_R.aquatilis	133	GTPILLNEDG	-----	---D-IDLYY	TCV	-----	---	151
C3K8D6_P.fluorescens	133	GTPILLNNGG	-----	---D-IDLYY	TCV	-----	---	151
D1RZ84_S.odorifera	133	GTPILLNNEG	-----	---D-IDLYY	TCV	-----	---	151
Q48JY3_P.s.pv.phas	133	GTPVLLNDKG	-----	---D-IDLYY	TCV	-----	---	151
Q48BC9_P.s.pv.phas	149	GTPILLNDKG	-----	---D-IDLYY	TCV	-----	---	167
Q60114_Z.mobilis	120	GCTIMAPGTA	-----	---NSVEVEF	TSVND	-----	---	141
58039338_G.oxydans	131	GCAMVRENSG	-----	---STVDLFY	TSVND	-----	---	152
15895050_C.acetobutylicum	142	GSAILDENG M	-----	---VQFFY	TATGRKGEAV	R	-----	167
B9LT89_H.lacusprofundi	120	GSALY-DDGE	-----	---VYLYY	TAAGDEAADE	M	-----	144
300710312_H.jeotgali	117	GSALLDDDGR	-----	---LYVEY	TASGRAGEAE	I	-----	142
C7P4M9_H.mukohataei	122	GSALY-DDDG	-----	---IYLFY	TAAGERGADE	L	-----	146
Q5V249_H.marismortui	122	GSALYDDDGS	-----	---VYLFY	TAAGE	-----	---E	142
D5DC07_B.megaterium	174	GSGTLTKDGG	-----	---VRLFY	TDYSGK	-----	---	194
P05655_B.subtilis	165	GSATFTSDGK	-----	---IRLFY	TDFSGK	-----	---	185

Conservation	-----786	566---6351	7151771158	1418711711	7717991198			
Q88BN6_Lsc3	167	-----TPG	AAI---AKVR	GRIVTSDQGV	ELKDFTQVKK	LFEADGTYIQ		207
182678986_B.indica	229	GG-NI--TPP	IAII--SRAD	QOIQADDKHV	WFTGFDQHLF	LLAFDGGYIQ		273
B2JYV2_B.phymatum	226	GGADI--TPP	QAII--TRAD	GHIHADDSHV	WFSGFDDHQA	LLKPDGTYIQ		271
Q3JGQ0_B.pseudomallei	221	GGADI--TPP	IAII--TRAD	GHIHADDKHV	WFSGFDDHKA	LLQPEGKMYQ		266
Q8VW87_A.sp.K-1	225	DGTNI--KPY	DPRI--ALSV	GKVKANKKGV	TLTGFNKVTD	LLQADGTYIQ		270
304364376_A.viscosus	306	DGNNAASKPY	DPRI--VQSE	GRIYADENG V	WLTGFRTOHQ	LLVFDGKYIQ		353
302555562_S.viridochromogenes	181	-----DPS	DALQLAQAT	GKIHADKNRV	WFSGFRDHRI	IAQADGKLYQ		224
296131231_C.flavigena	203	-----DPS	DALQLAHAE	GRVHVDADGV	YFTGFEDHTI	IAEADGRLYQ		246
Q93FU9_P.aurantiaca	158	-----TPG	ATI---VKVR	GRVVTTEHGV	SMVGFQVQTS	LFEADGKMYQ		198
Q43998_G.diazotrophicus	253	AN-NI--TPP	QAII--TQTL	GRIHADFNHV	WFTGFTAHTP	LLQFDGVLVYQ		297
Q46654_E.amylovora	151	-----TPG	ATI---AKVR	GKIVTSDQSV	SLEGFQVQTS	LFEADGTYIQ		191
O54435_R.aquatilis	151	-----TPG	ATI---AKVR	GKVLTSSEGV	TLAGFNEVKS	LFSADGVVYQ		191
C3K8D6_P.fluorescens	151	-----TPG	ATI---AKVR	GQVVTSDTGV	TLQGFQVQKS	LFDADGLVYQ		191
D1RZ84_S.odorifera	151	-----TPG	ATI---AKVR	GRIVTSDDGV	QLQDFNEVKS	LFEADGVVYQ		191
Q48JY3_P.s.pv.phas	151	-----TPG	AAI---AKVR	GRIVTSDKGV	ELKDFTEVKT	LFEADGTYIQ		191
Q48BC9_P.s.pv.phas	167	-----TPG	AAI---AKVR	GRIVTSDQGV	ELKDFTQVKK	LFEADGTYIQ		207
Q60114_Z.mobilis	141	-----TPS	ESVP--AQCK	GRIYADKSV	WFTGFDKVTD	LFQADGLVYA		182
58039338_G.oxydans	152	-----IPS	ESVP--SYTT	GRIYADANG V	WFTGFDVCTD	MFQADGVNYA		193
15895050_C.acetobutylicum	167	-----TFE	QRL---VKTK	FSINVDKGGV	HITNCSKHQV	LLEFDGVVYQ		207
B9LT89_H.lacusprofundi	144	-----TYT	QRIA--VAHG	GTASADEDTI	ELSGPWTHET	LLTPDGEWYE		185
300710312_H.jeotgali	142	-----TYE	QRLA--VGSG	GSVADDDGV	RIBGPFAGHV	LLEFDGGRYE		183
C7P4M9_H.mukohataei	146	-----TYT	QRI---VAAS	GGTPTDGEF	AIEGFWTHHE	LLRFDGDRYE		186
Q5V249_H.marismortui	143	GAEDL--TYT	QRI---VGAG	GGSIDTADGF	ALSGFWTHHE	LLQFDGDRYE		187
D5DC07_B.megaterium	194	-----QYG	KQTLTTAQVN	MS-QPNDNTL	KVDGVEDYKS	IFDGDGKTYQ		236
P05655_B.subtilis	185	-----HYG	KQTL--TTAQ	VNVSASDSSL	NINGVEDYKS	IFDGDGKTYQ		226

Asp219

Glu236

Conservation	723981----	146-----89	9945839---	617-655577	9989-----			
Q88BN6_Lsc3	208	TEAONS----	SWN----FR	DPSPI---	PND-GKLYMV	FG	-----	238
182678986_B.indica	274	TGQONE----	FFS----FR	DPYVFLD---	PAHPGKTFMV	FEQN	-----	305
B2JYV2_B.phymatum	272	TGEONT----	YFS----FR	DPFVFLD---	PAHPGKTYMV	FEQN	-----	303
Q3JGQ0_B.pseudomallei	267	TGQONT----	YYS----FR	DPFVFLD---	PAHPGNTYMV	FEQN	-----	298
Q8VW87_A.sp.K-1	271	TGAONE----	FFN----FR	DPFTEED---	PAHPGETFMV	FEQN	-----	302
304364376_A.viscosus	354	TREONP----	GVN----FR	DPFTEFDQNN	PSD-PTEYMV	FEQNSAFVRE		393
302555562_S.viridochromogenes	225	TLECSQQGPI	IYA----FR	DPFVFLD---	PRD-RKIHL	FEQN	-----	259
296131231_C.flavigena	247	TLECSQSEAGPI	IYA----FR	DPFVFLD---	PTD-RKIYAL	FEQN	-----	281
Q93FU9_P.aurantiaca	199	TEAONP----	FWG----FR	DPWFLD---	PND-GKLYML	FEQN	-----	229
Q43998_G.diazotrophicus	298	NGAONE----	FFN----FR	DPFTEED---	PKHPGVNYMV	FEQN	-----	329

Q46654_E.amylovora	192	TEEQNA----	FWN----	FR	DPSPFID---	RND-GKLYML	FEQN-----	222
O54435_R.aquatilis	192	TESQNP----	YWN----	FR	DPSPFID---	PHD-GKLYMV	FEQN-----	222
C3K8D6_P.fluorescens	192	TEAQNS----	TWN----	FR	DPSPFID---	PKD-GKLYMV	FEQN-----	222
D1R284_S.odorifera	192	TEAQNA----	YWN----	FR	DPSPFID---	PQD-GKLYMV	FEQN-----	222
Q48JY3_P.s.pv.phas	192	TEAQNS----	TWN----	FR	DPSSEFID---	PND-GKLYMV	FEQN-----	222
Q48BC9_P.s.pv.phas	208	TEAQNS----	SWN----	FR	DPSPFID---	PND-GKLYMV	FEQN-----	238
Q60114_Z.mobilis	183	DYAENN----	FWD----	FR	DPHVEFIN---	PED-GKTYAL	FEQN-----	213
58039338_G.oxydans	194	NLVEDQ----	YWD----	FR	DPHIFERN---	PDD-NQIYAL	FEQN-----	224
15895050_C.acetobutylicum	208	TMQCAK-GPI	IYS----	FR	DPYEFED---	PKT-KKDYLI	FEQN-----	241
B9LT89_H.lacusprofundi	186	TEAQSR--GM	TYT----	FR	DPWFEED---	SAT-GETHLL	FEAN-----	218
300710312_H.jeotgali	184	REEQSR--GM	IYT----	FR	DPWFEED---	PRS-GKTYLL	FEAN-----	216
C7P4M9_H.mukohataei	187	RQDQSR--GM	TYT----	FR	DPWFEED---	PAT-GETHLL	FEAN-----	219
Q5V249_H.marismortui	188	REDQSR--RM	IYT----	FR	DPWFEED---	PET-GETWLL	FEAN-----	220
D5DC07_B.megaterium	237	TVQCFIDEGN	YDTGDNHTLR		DPHYIED---	N--GKLYLV	FEAN-----	274
P05655_B.subtilis	227	NVQCFIDEGN	YSSGDNHTLR		DPHYVED---	K---GKLYLV	FEAN-----	264

Val248

Conservation	-----77416	8-----23144	13728116--	6124141----	--551-----			
Q88BN6_Lsc3	238	----VAGER	G----SHTVG	VAELCPVP--	PGHEDVG---	--GAR-----	267	
182678986_B.indica	305	----TAVQR	G----SRSTC	EADLGYSPND	PNKEDLNAV	DSGAI-----	341	
B2JY2_B.phymatum	303	----TGGPR	G----ARTCT	EADLGYAPND	PQREDLNAV	NSGAA-----	339	
Q3JGQ0_B.pseudomallei	298	----TGGPR	G----ARTCT	EADLGYAPND	PYREDLNAV	NLGAV-----	334	
Q8VW87_A.sp.K-1	302	----SAMQR	E----TATCN	EADLGYRQGD	PYAEIVDDVN	ASGAT-----	338	
304364376_A.viscosus	394	QQYVDAAKA	QONTAVATCT	AEDLGYEQGD	PKAETVEAVN	QRGGY-----	438	
302555562_S.viridochromogenes	259	----TGGTA	G----SYQCT	KRDLCDLP--	AGHEVPE---	--DSK-----	288	
296131231_C.flavigena	281	----NGGVA	G----SHRCD	RKEICGRVP--	GGHVVPD---	--DAR-----	310	
Q93FU9_P.aurantiaca	229	----VAGER	G----SHKVG	KAELCDVP--	EGYEDVG---	--NSR-----	258	
Q43998_G.diazotrophicus	329	----TAGQR	G----VANCT	EADLGFERN	PNAETLQEV	DSGAY-----	365	
Q46654_E.amylovora	222	----VAGPR	G----SHEIT	QAEMCNVP--	EGYEDVG---	--GAK-----	251	
O54435_R.aquatilis	222	----VAGER	G----SHVIG	KQEMCTLP--	PGHRDVG---	--NAR-----	251	
C3K8D6_P.fluorescens	222	----VAGER	G----THEVG	PNEICLVP--	PGHEDVG---	--GAR-----	251	
D1R284_S.odorifera	222	----VAGDR	G----SHVVG	PDELGLVP--	PGHEEVG---	--GAR-----	251	
Q48JY3_P.s.pv.phas	222	----VAGER	G----THTVG	AAELCPVP--	PGHEETS---	--GAR-----	251	
Q48BC9_P.s.pv.phas	238	----VAGER	G----SHTVG	AAELCPVP--	PGHEDVG---	--GAR-----	267	
Q60114_Z.mobilis	213	----VAMER	G----TVAVG	EEELCPVP--	BKTETPD---	--GAR-----	242	
58039338_G.oxydans	224	----VPGMR	G----DFTIG	SDERGLVP--	PATTVPA---	--GAQ-----	253	
15895050_C.acetobutylicum	241	----KGGK-	----IEKMK	PENICDKLFR	KNHIAPR---	--GVEN-----	271	
B9LT89_H.lacusprofundi	218	----TPVPE	----APAPER	PGDDEAT---	--AHRRE---		236	
300710312_H.jeotgali	216	----TPIPE	G----AGACG	D-----	BVWEE-----		233	
C7P4M9_H.mukohataei	219	----TPVPA	A----SDACG	GD-----	EDLQS-----		237	
Q5V249_H.marismortui	220	----TPVPE	G----SDVCG	GDD-----	ALQE-----		238	
D5DC07_B.megaterium	274	----TGTED	GYQGEDSLYN	RAYYCGNN--	EFFQSEKKKL	LEGSNKEKAS	317	
P05655_B.subtilis	264	----TGTED	GYQGEESLFN	KAYYCKST--	SFFRQESQKL	LQSDKKRTAE	307	

Glu303

Conservation	6637779581	7361----32	5166556976	7765988899	9986834687			
Q88BN6_Lsc3	268	FQVGCIGLAV	AKDL---SG	EEWEILPPLV	TAVGVNDQTE	RPHYVFQDGK	313	
182678986_B.indica	342	YQMANVGLAV	ATND---EL	TQWKFLPPLL	SGNCVNDQTE	RPQIYLKDGK	387	
B2JY2_B.phymatum	340	YQKANVGLAV	ATNP---QL	TEWKFLPPLL	SANCVDDQTE	RPQIYLKDGK	385	
Q3JGQ0_B.pseudomallei	335	YQKANVGLAI	ATNP---QL	TEWKFLPPLL	SANCVDDQTE	RPQIYLKDGK	380	
Q8VW87_A.sp.K-1	339	YQIGNVGLAK	AKNK---QL	TEWEFLPPLL	SANCVTDQTE	RPQIYFKDGK	384	
304364376_A.viscosus	439	YQLANVGLAR	AKNK---AM	TQWEYLPPLL	SGNCVNDQTE	RPQIYFQDGK	484	
302555562_S.viridochromogenes	289	YYTGNIGLAT	ADGD---SM	ENWKLPPLL	SANCVNQDTE	RPHLIIRGGK	334	
296131231_C.flavigena	311	YYTGNIGIME	LRNA---DF	TSWRLLPPLL	SAECTNQDTE	RPHLIVHGGK	356	
Q93FU9_P.aurantiaca	259	FQTACVGIIV	ARDE---DG	DDWEMLPPLL	TAVGVNDQTE	RPHFVFQDGK	304	
Q43998_G.diazotrophicus	366	YQKANVGLAI	ATDS---TL	SKWKFLSPLI	SANCVNDQTE	RPQVYLHNGK	411	
Q46654_E.amylovora	252	YQAGCVGLAV	AKDL---SG	SEWQILPPLI	TAVGVNDQTE	RPHFVFQDGK	297	
O54435_R.aquatilis	252	YQAGCIGMAV	AKDL---SG	DEWEILPPLV	TAVGVNDQTE	RPHFVFQDGK	297	
C3K8D6_P.fluorescens	252	YQVGCIGIIV	AKDL---NG	DEWEILPPLV	TAVGVNDQTE	RPHYVFQDNK	297	
D1R284_S.odorifera	252	FQVGCIGLAV	AKDH---CG	EEWEILPPLV	TAVGVNDQTE	RPHYVFQDGK	297	
Q48JY3_P.s.pv.phas	252	FQVGCIGLAV	AKHL---SG	DEWEILPPLV	TAVGVNDQTE	RPHYVFQDGK	297	
Q48BC9_P.s.pv.phas	268	FQVGCIGLAV	AKDL---SG	EEWEILPPLV	TAVGVNDQTE	RPHYVFQDGK	313	
Q60114_Z.mobilis	243	YCAAATGIAQ	ALNE---AR	TEWKLLPPLV	TAFGVNDQTE	RPHVVFQNGL	288	
58039338_G.oxydans	254	YGAATGIAQ	LKSDSTKGF	SQWEMLPALV	TALGVNDQTE	RPHVVFQDGL	303	
15895050_C.acetobutylicum	272	FN-GNVGIIV	AQNK---DL	TRFKLLPPLL	EAVGVNQDTE	RPQIVMKKNK	316	
B9LT89_H.lacusprofundi	237	FN-GCVGVAV	SESG---DP	LSWELRPPLL	DAVBVNQELE	RPHVVVADGR	281	
300710312_H.jeotgali	234	FN-GSVGIAH	SPTG---DP	TDWELCDPLL	EGICVNQELE	RPHVVVRNGF	278	
C7P4M9_H.mukohataei	238	FN-GSVGIAH	SPTG---DP	LSWELCDPLL	DSVCVNQELE	RPHVVPRDGR	282	
Q5V249_H.marismortui	239	FN-GSVGIAH	SPTG---DP	LAWLEDPPLL	DAVGVNQELE	RPHVVYRDGL	283	
D5DC07_B.megaterium	318	LANGALGIE	LND---DY	TLKKVMKPLI	TSNTVTDETE	RANVFKKDGK	362	
P05655_B.subtilis	308	LANGALGIE	LND---DY	TLKKVMKPLI	ASNTVTDETE	RANVFKMNGK	352	

Lys322
Phe323

Conservation	7988989935	939-483484	9889--9897	-637585819	8937-88867		
Q88BN6_Lsc3	314	YYLFTTSHK G	TYA-DGVTGP	DGVY--GFVG	-EHLFGPY R P	MNAS-GLVLG	358
182678986_B.indica	388	YYLFTTSHRT	TYA-AGVDGP	DGVY--GFVG	-DGRSDFT P	LNGLSGL L L	433
B2JY2_B.phymatum	386	YYLFTTSHRT	TMA-AGVDGP	DGVY--GFVG	-NGIRSD F L	LNGGSG L V	431
Q3JGQ0_B.pseudomallei	381	YYLFTTSHRT	TMA-AGIDGP	DGVY--GFVG	-NGIRSD F L	LNGGSG L V	426
Q8VW87_A.sp.K-1	385	SYLFTTSHRG	TFA-AGLDGP	EGVY--GFVG	-DGRSD F Y	LNGGSG L A	430
304364376_A.viscosus	485	YYLFTTSHRE	TYA-DGLQGP	EGVY--GFVG	-DGRSD F Y	LQNT G L	530
302555562_S.viridochromogenes	335	YYLFTTSHKF	TFA-PGLSGW	DGLY--GFVG	-PGLRSE Y Q	LNGS-AL V L	379
296131231_C.flavigena	357	YYLFTTSHMF	TFA-PGLTGP	DGLY--GFVG	-HGLRSD F Y	LNGS-GL V L	401
Q93FU9_P.aurantiaca	305	YYLFTTSHTF	TYA-DGVTGP	DGVY--GFVA	-DSLFG P Y	LNGS-GL V L	349
Q43998_G.diazotrophicus	412	YYLFTTSHRT	TFA-AGVDGP	DGVY--GFVG	-DGRSD F Q	MNYGS G L	457
Q46654_E.amylovora	298	YYLFTTSHKY	TFA-DNLTGP	DGVY--GFVS	-DKLT G P	MNS S -GL V L	342
O54435_R.aquatilis	298	YYLFTTSHKF	TYA-DGLTGP	DGVY--GFVS	-DNLT G P	MNS S -GL V L	342
C3K8D6_P.fluorescens	298	YYLFTTSHKF	TYA-DGLTGP	DGVY--GFVS	-DQL F G	MNAS-GL V L	342
D1RZ84_S.odorifera	298	YYLFTTSHKF	TYA-EGLTGP	DGVY--GFVS	-DRLT G P	MNAS-GL V L	342
Q48JY3_P.s.pv.phas	298	YYLFTTSHKF	TYA-DGVTGP	DGVY--GFVG	-EHLFG P Y	MNAS-GL V L	342
Q48BC9_P.s.pv.phas	314	YYLFTTSHKF	TYA-EGLTGP	DGVY--GFVG	-EHLFG P Y	MNAS-GL V L	358
Q60114_Z.mobilis	289	TYLFTTSHHS	TYA-DGLSGP	DGVY--GFVS	ENGL F G	LNGS-GL V L	334
58039338_G.oxydans	304	TYLFTTSHHS	TFT-GNSTGP	DGVY--GFVS	RNG I F	LNGS-GL V L	349
15895050_C.acetobutylicum	317	YYLFTTSHKF	TYA-QGLNGV	DGLY--GFVG	-NSLR S N	LNGN-GL V L	361
B9LT89_H.lacusprofundi	282	YYLFTVSHDH	TFA-PCVTGP	DGLY--GFVA	-DALD G E	LNGS-GL V A	326
300710312_H.jeotgali	279	YYLFTVSHDH	TFA-PCLEGP	DGLY--GFVA	-DSL R G	LNGS-GL V A	323
C7P4M9_H.mukohataei	283	YYLFTVSHDH	TFA-PGLDGY	DALY--GFVA	-DSL R G	LND S -GL V A	327
Q5V249_H.marismortui	284	YYLFTVSHLH	TFA-PGLEGF	DALY--GFVA	-ED L R	L N ES-GL V A	328
D5DC07_B.megaterium	363	WYLFTDSRGS	KMTIDGI-GQ	DDV M L	-NT L T	L N DT-GL V L	409
P05655_B.subtilis	353	WYLFTDSRGS	KMTIDGITSN	D- I Y M L	-NS L T	L N KT-GL V L	399

Conservation	---9956---	-----	----456969	9858877--5	---69598--		
Q88BN6_Lsc3	358	---NP E ---	-----	----Q P FQ T Y	SHCV M PN--G	---L V T S F--	381
182678986_B.indica	433	---N P TD L Y Q	PAGAP Y AL N P	NQN P RT F Q S Y	SHY V M P G--G	---L V ES F --	473
B2JY2_B.phymatum	431	---N P TD F S A	PAGAP Y AQ D P	NQN P RA F Q S Y	SHY V M P G--G	---L V ES F --	471
Q3JGQ0_B.pseudomallei	426	---N P TD F S A	PAGAP Y AQ D P	NQN P RA F Q S Y	SHY V M P G--G	---L V ES F --	466
Q8VW87_A.sp.K-1	430	---N P T N L N F	LG G Q P F A P D F	N Q H P G H F Q A Y	SHY V M P G--G	---L V Q S F--	470
304364376_A.viscosus	530	---N P T N L N F	N P G K P Y S P D F	N Q S P Y T F Q S Y	SHY V M P G--G	---L V ES F --	570
302555562_S.viridochromogenes	379	---N P E D ---	-----	----A P T Q O Y	SHY V M P N--G	---L V ES F --	402
296131231_C.flavigena	401	---N P E D ---	-----	----A P L O N Y	SD V M P N--L	---L V ES F --	424
Q93FU9_P.aurantiaca	349	---N P S S ---	-----	----Q P FQ T Y	SHCV M PN--G	---L V T S F--	372
Q43998_G.diazotrophicus	457	---N P TD L N T	A A G T D F D P S P	D Q N P R A F Q S Y	SHY V M P G--G	---L V ES F --	497
Q46654_E.amylovora	342	---N P S S ---	-----	----Q P FQ T Y	SHY V M P N--G	---L V T S F--	365
O54435_R.aquatilis	342	---N P P S ---	-----	----Q P FQ T Y	SHCV M PN--G	---L V T S F--	365
C3K8D6_P.fluorescens	342	---N P P S ---	-----	----Q P FQ T Y	SHCV M PN--G	---L V T S F--	365
D1RZ84_S.odorifera	342	---N P P E ---	-----	----Q P FQ T Y	SHCV M PN--G	---L V T S F--	365
Q48JY3_P.s.pv.phas	342	---N P P A ---	-----	----Q P FQ T Y	SHCV M PN--G	---L V T S F--	365
Q48BC9_P.s.pv.phas	358	---N P P E ---	-----	----Q P FQ T Y	SHCV M PN--G	---L V T S F--	381
Q60114_Z.mobilis	334	---N P S S ---	-----	----Q P Y Q A Y	SHY V M T N--G	---L V T S F--	357
58039338_G.oxydans	349	---N P S S ---	-----	----A P Y E T Y	SH F V D E A --G	---Y V O S F--	372
15895050_C.acetobutylicum	361	---N P T N ---	-----	----D P Y Q T Y	SW Y L V S G --H	---D V L S F--	384
B9LT89_H.lacusprofundi	326	---N P P E ---	-----	----A P F Q A Y	SW M A F A H --D	E E V L V O S F L N	354
300710312_H.jeotgali	323	---N P A N ---	-----	----A P Y Q A Y	SW V A F S H --R	E E L V L V O S F N	351
C7P4M9_H.mukohataei	327	---N P A N ---	-----	----A P F Q A Y	SW M V F E H --R	E E L V L V O S F N	355
Q5V249_H.marismortui	328	---N P E N ---	-----	----A P F Q S Y	SW M A F F H --S	D E V L V O S F F N	356
D5DC07_B.megaterium	410	MD L D E N D ---	-----	----K T F-- T Y	SH F A V E P Q K G	D N V V I T S Y --	439
P05655_B.subtilis	400	MD L D E N D ---	-----	----V T F-- T Y	SH F A V E P Q A K G	D N V V I T S Y --	429

Asp383

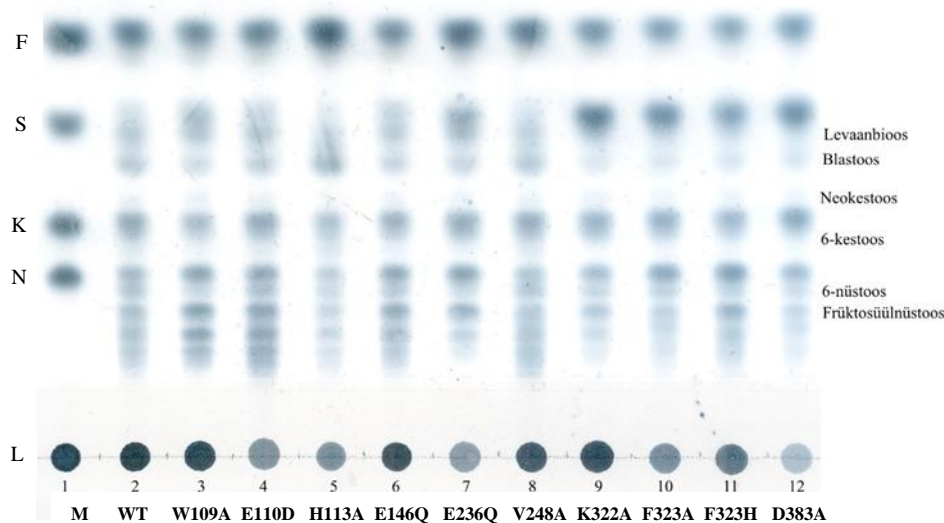
Conservation	-----88	5561-----	-141117599	8799974417	--162--472		
Q88BN6_Lsc3	382	-----I G	SV P T-----	-T G E D Y R I G G	TE A P T V R I L L	--K D --R S F	412
182678986_B.indica	473	-----I D	A I G T -----	-----R R G G	AL A P T V K I N I	--N R T--S T I	499
B2JY2_B.phymatum	471	-----I D	A I G S -----	-----R R G G	TL A P T V K I N I	--N G D--T T V	497
Q3JGQ0_B.pseudomallei	466	-----I D	A I G A -----	-----R R G G	TL A P T V K I D I	--H G D--S T T	492
Q8VW87_A.sp.K-1	470	-----I D	T I G T -----	--H D D F V R G G	TL A P T V K M D I	G V G D P T K T A	504
304364376_A.viscosus	570	-----I D	S I G G -----	N K D G S P V R G G	SL A P T V K L N I	--S G D--T T S	602
302555562_S.viridochromogenes	402	-----I D	T V P T -----	-A D G G T R F G G	TL A R T L A L S L	--K D D--R T R	433
296131231_C.flavigena	424	-----I D	T V P T -----	-A D G G V V Y G G	TL A P T L E L E L	--E S D--R S W	455
Q93FU9_P.aurantiaca	372	-----I D	S V P T -----D	ES G T Q I R I G G	TE A P T V E I K I	--K G Q--Q T F	405
Q43998_G.diazotrophicus	497	-----I D	T V E N -----	-----R R G G	TL A P T V R V R I	--A Q N--A S A	523
Q46654_E.amylovora	365	-----I D	S V P W -----	--K G K D Y R I G G	TE A P T V K I L L	--K D D--R S F	396
O54435_R.aquatilis	365	-----I D	N V P T -----	--S D G N Y R I G G	TE A P T V K I V L	--K G N--R S F	396
C3K8D6_P.fluorescens	365	-----I D	S V P T -----	--T G D D Y R I G G	TE A P T V R I V L	--K G D--R S F	396
D1RZ84_S.odorifera	365	-----I D	S V P T -----	--V G E D Y R I G G	TE A P T V R I V L	--E G D--R S F	396
Q48JY3_P.s.pv.phas	365	-----I D	S V P T -----	--S G E D Y R I G G	TE A P T V R I L L	--E G D--R S F	396
Q48BC9_P.s.pv.phas	381	-----I D	S V P T -----	--E G E D Y R I G G	TE A P T V R I L L	--K D D--R S F	412
Q60114_Z.mobilis	357	-----I D	T I P S -----	SD P N V Y R Y G G	TL A P T I K L E L	--V G H--R S F	389

58039338_G.oxydans	372	-----ID	TLPQPGSADP	QNPETYRI	GG	TLAPT	VKIVL	--DGE--	RTF	410
15895050_C.acetobutylicum	384	-----IN	EYHF-----	--NGQLRY	GG	TFAPTL	LQISL	--KGY--	KSK	414
B9LT89_H.lacusprofundi	355	YYDFAGDSL	AIAD----LP	EAEQRERF	GG	TLAPT	LRLAL	--DGD--	STR	396
300710312_H.jeotgali	352	YYDLGGLT	DVAT----LS	PDEQRAKF	GG	TLAPT	VRVAL	--SGD--	RTR	393
C7P4M9_H.mukohataei	356	YYDFEADSM	RVAD----LP	ESEQLRRF	GG	TLAPT	LRLRV	--EGT--	HTE	397
Q5V249_H.marismortui	357	YYDFDGETL	EIAH----LS	ESEQMRRF	GG	SLG	PALRLV	--EGS--	RTR	398
D5DC07_B.megaterium	439	-----MT	NRGF-----	--YEDNH--	S	TFAPS	SFLVNI	--DGS--	KTS	467
P05655_B.subtilis	429	-----MT	NRGF-----	--YADKQ--	S	TFAPS	SFLVNI	--KCK--	KTS	457

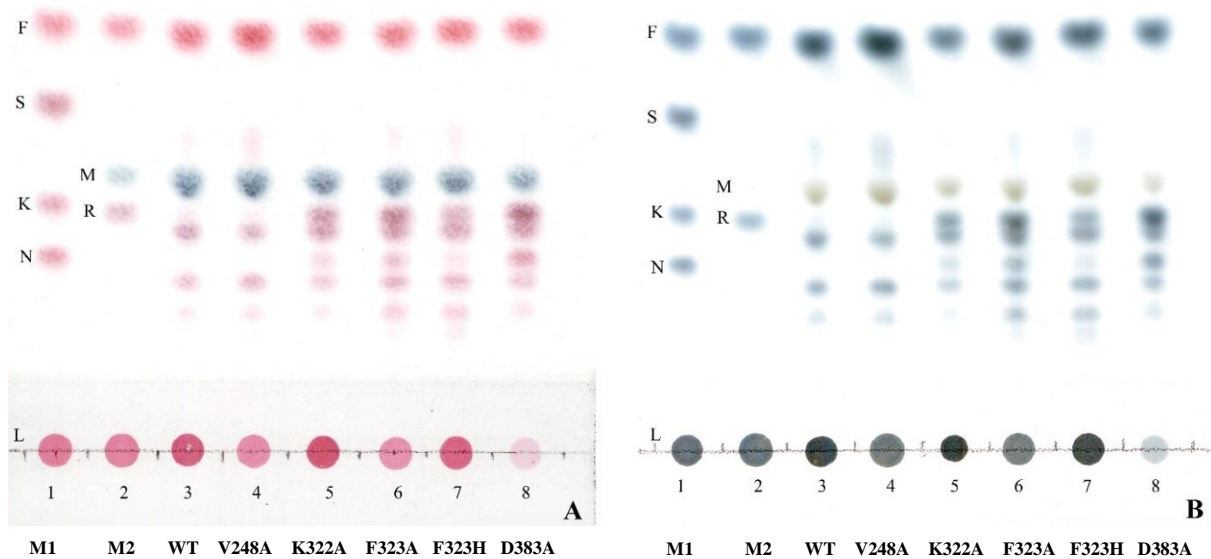
Conservation	63213-----	-45738-854	-----11	1111-----	-----					
Q88BN6_Lsc3	413	VQEEY-----	-DYGVI-PAM	-----KD	VQLS-----	-----	-----	-----	-----	431
182678986_B.indica	500	LDRTYGNAGL	GGYGDII-PAN	-----LP	ALGQGNHGV	TNGQ-----	-----	-----	-----	534
B2JVV2_B.phymatum	498	VDRTYKGGGL	GGYGDII-PAN	-----QS	APGNNGQGG	NSQ-----	-----	-----	-----	531
Q3JGQ0_B.pseudomallei	493	VDRAYGAGGL	GGYGDII-PAN	-----LP	AVGAGHHD--	-----	-----	-----	-----	521
Q8VW87_A.sp.K-1	505	VDYSYGSEGL	GGWADII-PAN	-----KH	LFTNGKFGVA	VSDEAAQKIR	-----	-----	-----	545
304364376_A.viscosus	603	VDRTYGTNGL	GGFADII-PSD	-----RA	RSNGGDTRPQ	RLK-----	-----	-----	-----	636
302555562_S.viridochromogenes	434	LAGQL-----	-DYGFI-P--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	444
296131231_C.flavigena	456	LVDEL-----	-PYAYI-PAM	-----TM	YPW-----	-----	-----	-----	-----	473
Q93FU9_P.aurantiaca	406	VVAEY-----	-DYGVI-PPM	-----LD	VTLK-----	-----	-----	-----	-----	424
Q43998_G.diazotrophicus	524	VDLRYGNGL	GGYGDII-PAN	-----RAD	VNIAGFIQDL	FGQPTSLGAA	-----	-----	-----	565
Q46654_E.amylovora	397	IVDSF-----	-DYGVI-PAM	-----KD	ITLK-----	-----	-----	-----	-----	415
O54435_R.aquatilis	397	VERVF-----	-DYGVI-PPM	-----KN	IILN-----	-----	-----	-----	-----	415
C3K8D6_P.fluorescens	397	VQEAY-----	-DYGVI-PAM	-----RD	VVLSQ-----	-----	-----	-----	-----	416
D1RZ84_S.odorifera	397	VREVV-----	-DYGVI-PAM	-----QD	IVLQG-----	-----	-----	-----	-----	416
Q48JY3_P.s.pv.phas	397	VQEVY-----	-DYGVI-PAM	-----KN	VVLSQ-----	-----	-----	-----	-----	415
Q48BC9_P.s.pv.phas	413	VQEEY-----	-DYGVI-PAM	-----KD	VTLS-----	-----	-----	-----	-----	431
Q60114_Z.mobilis	390	VTEVK-----	-GYGVI-EPQ	-----IE	WLAEDSSNS	AAALSLLNK-	-----	-----	-----	423
58039338_G.oxydans	411	LTEVH-----	-AYGQV-YAQ	-----GV	WPTSSAWDKR	S-----	-----	-----	-----	436
15895050_C.acetobutylicum	415	IIGRL-----	-GEGVTFPAH	-----	-----	-----	-----	-----	-----	428
B9LT89_H.lacusprofundi	397	LRGTL-----	-DAWRI-PTP	-----DE	PLPPADDSEL	PGGDALSGRL	-----	-----	-----	431
300710312_H.jeotgali	394	ITGTL-----	-SHGRI-PLE	-----SE	ELPDLPEERL	AHREETRGGY	-----	-----	-----	428
C7P4M9_H.mukohataei	398	ILGTL-----	-DHWQI-PLP	-----DE	VLPPTDREYF	AGESGDGGSY	-----	-----	-----	432
Q5V249_H.marismortui	399	IIGSL-----	-GHWHI-PLA	GETLPLTDRE	LIRRGKHNDD	STGGYAARTE	-----	-----	-----	441
D5DC07_B.megaterium	468	VVKDR-----	V LEQQQL-TVD	-----ED	-----	-----	-----	-----	-----	484
P05655_B.subtilis	458	VVKDS-----	I LEQQQL-TVN	-----K-	-----	-----	-----	-----	-----	473

LISA 3

Alge ja muteeritud levaansukraaside polümeerisatsiooniproduktide analüüs õhukese kihi kromatograafiaga (TLC)



1.2 M sahharoosist 20 h inkubatsiooni vältel moodustunud produktid (vt pt 2.3.2.2; meetodika pt 2.2.6). 0.5 µl 4 korda lahjendatud reaktsioonisegu kanti TLC plaadi stardijoonele. Rajal 1 on markersuhkrud (M): 0.7% levaan, 8 mM nüstoos (PA 4), 8 mM 1-kestoos (PA 3), 30 mM sahharoos (PA 2) ja 30 mM fruktoos (F). Valkude nimetused on näidatud radadel 2-12. WT – Lsc3 metsiktüüpi valk.



0.3 M rafinoosist 20 h inkubatsiooni vältel moodustunud produktid (vt pt 2.3.2.2; meetodika pt 2.2.6). Paneelil A on plaat värvitud aniliini-, paneelil B urea reaktiiviga. 0.5 µl 2 korda lahjendatud reaktsioonisegu kanti TLC plaadi stardijoonele. Rajal 1 on markersuhkrud M1: 0.5% levaan (L), 8 mM nüstoos (N; PA 4), 8 mM 1-kestoos (K; PA 3), 30 mM sahharoos (S; PA 2) ja 30 mM fruktoos (F). Rajal 2 on markersuhkrud M2: 0.5% levaan, 10 mM rafinoos (R, PA 3), 30 mM melibioos (M; PA 2), 30 mM fruktoos. WT – Lsc3 metsiktüüpi valk.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Maria Gromkova

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 02.08.1991)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Pseudomonas syringae pv. tomato levansukraasi Lsc3 struktuuri ja funktsiooni seoste
uurimine mutatsioonanalüüsiga,
(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on dotsent Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat; teadur Triinu Visnapuu, PhD;
doktorant Karin Mardo,

(juhendaja nimi)

- 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 **01.09.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015