

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

Maria Gromkova

***Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraasi Lsc3 transfruktosüülimisreaktsiooniks  
oluliste aminohapete kindlakstegemine mutatsioonanalüüsiga**

Bakalaureusetöö

Juhendajad dots Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat

teadur Triinu Visnapuu, PhD

Karin Mardo, magister



TARTU 2013

## SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Fruktosüüli transferaasid: levaansukraasid ja inulosukraasid.....	6
1.1.1 Levaansukraaside ehitus ja katalüüsis olulised aminohapped .....	7
1.1.2 Levaansukraaside reaktsioonimehhanism ja tekkivad produktid.....	9
1.1.3 Levaansukraaside biokeemilised omadused.....	11
1.1.4 Levaansukraaside struktuuri ja funktsiooni seoste kindlakstegemine mutatsioonanalüüsiga .....	12
1.2 Fruktaanide olulisus ja kasutusvõimalused.....	13
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	14
2.1 Töö eesmärgid.....	14
2.2 Materjal ja meetodika .....	14
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.....	14
2.2.2 Mutantide konstrueerimine ja <i>lsc3</i> geeni klonimine pURI3 vektorisse .....	15
2.2.3 Elektroporatsioon, konstruktsioonide kontrollimine, plasmiidse DNA eraldamine ja sekveneerimine.....	17
2.2.4 Levaansukraaside ekspresseerimine, rakuekstraktide tegemine ja valkude puhastamine .....	18
2.2.5 Geelelektroforees .....	19
2.2.6 Levaansukraasi erinevate aktiivsuste kineetiliste parameetrite ja polümerisatsiooniproductide määramine .....	19
2.2.7 Õhukese kihi kromatograafia .....	22
2.2.8 Arvutipõhised meetodid .....	22
2.3 Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1 Levaansukraasi Lsc3 polümeriseerimisreaktsioonides oluliste aminohapete ennustamine kirjanduse andmete ja valkude joonduste alusel .....	24
2.3.2 Levaansukraasi Lsc3 mutantide konstrueerimine ja mutantsete valkude puhastamine ning analüüs.....	27
KOKKUVÕTE .....	37
SUMMARY .....	39
KASUTATUD KIRJANDUS .....	41
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	45
LISA 1 .....	46

LISA 2 .....	49
LISA 3 .....	51
LISA 4 .....	53
LIHTLITSENTS.....	55

## KASUTATUD LÜHENDID

DNS – 3,5-dinitrosalitsüülhape

1-FFT – fruktaan:fruktaan 1-fruktosüültransferaas

FOS – fruktooligosahhariidid

FS – fruktaansukraas

FTF – fruktosüüli transferaas

GH – glükosiidi hüdrolaas

$k_{cat}$  – katalüütiline konstant (1/min)

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

LevU – *Zymomonas mobilis*'e levaansukraas

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

LsdA – *Gluconacetobacter diazotrophicus*'e levaansukraas

PA – polümeerisatsiooniaste

SacB – *Bacillus subtilis*'e levaansukraas

1-SST – sahharoos:sahharoos 1-fruktosüültransferaas

TA – transfruktosüleeriv aktiivsus

TLC – õhukese kihi kromatograafia

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

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

## SISSEJUHATUS

Levaansukraasid on bakteriaalsed ekstratsellulaarsed ensüümid, mis kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside perekonda 68. Nad lagundavad glükosiidsideme sahharoosis ja katalüüsivad fruktoosijäägi ülekannet erinevatele aktseptoritele. Reaktsiooniproduktideks on  $\beta$ -2,6-sidemega seotud fruktaanid, mille hulka kuuluvad suure molekulmassiga levaan ja lühikese ahelaga fruktooligosahhariidid. Fruktaanidel on mitmeid rakendusi. Neid saab kasutada toidus, kosmeetikas, tekstiili-, farmaatsia- ja keemiatööstuses ning meditsiinis. Mikroobsetel fruktaanidel on tervisele kasulik toime, näiteks levaan omab kasvajavastast ja immunsüsteemi stimuleerivat aktiivsust ning alandab veresuhkru taset. Levaanitüüpi fruktooligosahhariididel on näidatud prebiootilist toimet jämesoole bifidobakteritele.

Levaansukraas on viielabalise  $\beta$ -propelleri struktuuriga ning selle keskel, tsentraalses õõnsuses, asub aktiivtsenter. Sinna kuuluvad kolm happelist aminohapet: kaks aspartaati ja glutamaat. Aspartaatidest on üks nukleofiil ja teine vaheühendi stabiliseerija ning glutamaat on alus-hape katalüüsijaks. Kuigi levaansukraase on uuritud juba pikemat aega, on paljud tema katalüüsiga seotud küsimused veel vastuseta. Ei ole selge, millest sõltub levaansukraaside substraadispetiifilisus ja transfruktosüülimisreaktsioonis moodustuvate produktide spekter. Samuti ei ole teda, millised aminohapped ja positsioonid levaansukraasis määravad sünteesitava  $\beta$ -glükosiidsideme spetsiifikat.

Minu bakalaureusetöö eesmärgiks oli ennustada *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasil Lsc3 transfruktosüülimisreaktsiooniks ja substraadivalikuks olulisi aminohappeid ja kontrollida seda eksperimentaalselt. Täpsed tööesmärgid on toodud peatükis 2.1.

Töö tehti Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis Geneetika õppetoolis ETF grantiprojekti GLOMR9072 ja projekti „Funcional Food Ingredients“ nr 3.2.0701.12-0041 rahastusel. Soovin tänada Tiina Alamäed, Triinu Visnapuud ja Karin Mardot, kes aitasid käesolevat tööd koostada ja praktilist tööd planeerida.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1 Fruktosüüli transferaasid: levaansukraasid ja inulosukraasid

Glükosiidi hüdrolaasid (GH-d) on ensüümid, millel on unikaalne roll erinevates bioloogilistes protsessides nagu glükaanide (suhkrute) biosüntees, taimede rakuseina süntees ja modifitseerimine, taimede kaitsesüsteemid, erinevate signaalide toimimine ja varuainete teke ning kasutamine. GH-e grupeeritakse valkude omaduste ja reaktsioonimehhanismide alusel mitmetesse perekondadesse (Lammens *et al.*, 2009). GH perekonnad 32 ja 68 on ühendatud GH-J klanniks, kuhu kuuluvad mitte ainult tüüpilised hüdrolaasid, kuid ka fruktosüültransferaasid (FTF-d), mis osalevad fruktaanide, fruktoosijääkidest koosnevate oligo- ja polümeersete suhkrute, biosünteesis. Homoloogia nende kahe perekonna valkude vahel on madal, vähem kui 15%, aga neil on leitud sarnaseid järjestusemotive ja struktuurielemente (Pons *et al.*, 2000; Meng ja Fütterer, 2003). Perekond GH 32 sisaldab invertaase (EC 3.2.1.26), seente ja bakterite endo- ja eksoinulinaase (vastavalt EC 3.2.1.7 ja EC 3.2.1.80), levanaase (EC 3.2.1.65) ja taimseid fruktaani eksohüdrolaase (EC 3.2.1.153) ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Lisaks kuulub sellesse perekonda mitmeid seente ja taimede fruktaanide sünteesis osalevaid fruktosüüli transferaase. Taimedes sisalduvad fruktaanid on sünteesitud sahharoosist kahe või enama fruktosüüli transferaasi abil. Lihtsama ehitusega taimse fruktaani, inuliini, sünteesis osalevad kahte tüüpi ensüümid. Esimene neist on sahharoos:sahharoos 1-fruktosüültransferaas (1-SST), mis kannab sahharoosist pärinevat fruktoosijääki üle teisele sahharoosi molekulile ja sünteesib trisahhariidi, 1-kestoosi (GF<sub>2</sub>). Teine ensüüm on fruktaan:fruktaan 1-fruktosüültransferaas (1-FFT), mille substraadiks on 1-kestoos ning produktina moodustub pikema ahelaga inuliin (Edelman ja Jefford, 1968; Vijn ja Smeekens, 1999; Lammens *et al.*, 2009).

Perekonda GH68 kuuluvad bakteriaalsed ja ka arhedest pärinevad levaansukraasid (EC 2.4.1.10; 2,6-β-D-fruktaan 6-β-D-fruktosüültransferaas), inulosukraasid (EC 2.4.1.9; 2,1-β-D-fruktaan 1-β-D-fruktosüültransferaas) ja β-fruktofuranosidaasid ehk invertaasid (EC 3.2.1.26) ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Bakterites piisab polüfruktaanide sünteesiks ühest ensüümist, kas levaan- või inulosukraasist (Martinez-Fleites *et al.*, 2005).

Bakteriaalsed FTF-id katalüüsivad sõltuvalt aktseptorist kahte erinevat tüüpi reaktsiooni. Kui aktseptoriks on fruktaan, mono- või oligosahhariid, siis toimub transfruktosüülimine ehk fruktaani ahela pikendamine (polümerisatsioon) ja kui aktseptoriks on vesi, siis toimub hüdroolüüs (Ozimek *et al.*, 2006).

Levaansukraas on ensüüm, mis sünteesib sahharoosist levaani,  $\beta$ -2,6-sidemega polüfrutaani. Bakteriaalne levaan on enamasti kõrge polümerisatsiooniastmega (PA) ning tema molekulmass võib ulatuda 20-st kilodaltonist kuni mitme megadaltonini (Lammens *et al.*, 2009). Transfruktosüülimisel võib sahharoos toimida nii fruktosüüli doonori kui ka aktseptorina. On näidatud, et sahharoosi kontsentratsioonist sõltub, kas eelistatult toimub hüdroolüüs või polümerisatsioon. Näiteks *Bacillus subtilis*'e levaansukraas hüdroolüüsib substraadi glükoosiks ja fruktoosiks madalamal sahharoosi kontsentratsioonil (<250 mM), aga levaani sünteesitakse kõrgemal kontsentratsioonil (>250 mM) (Chambert *et al.*, 1974; Meng ja Fütterer, 2003). Mõned bakterid võivad sünteesida ka kõrge polümerisatsiooniastmega inuliini-tüüpi fruktaane, kasutades selleks inulosukraasi (van Hijum *et al.*, 2002; Ozimek *et al.*, 2006).

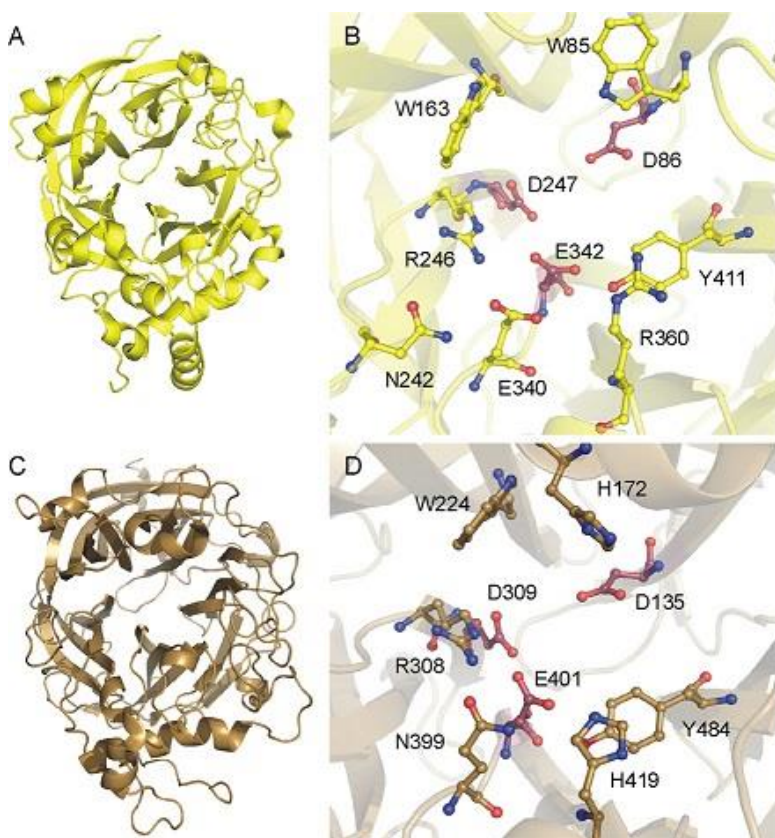
Võrreldes inulosukraasidega on põhjalikumalt uuritud on bakteriaalseid levaansukraase, mida esineb nii grampositiivsetel kui ka -negatiivsetel bakteritel. Levaansukraase sünteesivad näiteks *B. subtilis*, *B. megaterium*, mõned laktobatsillid, *Zymomonas mobilis*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* ja *Pseudomonas syringae* tüved. Vähem informatsiooni on bakteriaalsete inulosukraaside kohta. Inuliini sünteesivad bakterid on näiteks *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus reuteri* ja *Leuconostoc citreum* (Rosell ja Birkhed, 1974; van Hijum *et al.*, 2003, van Hijum *et al.*, 2006, del Moral *et al.*, 2008; Lammens *et al.*, 2009).

### **1.1.1 Levaansukraaside ehitus ja katalüüsis olulised aminohapped**

Gramnegatiivsete ja -positiivsete bakterite levaansukraasid on erineva suurusega, grampositiivsete bakterite vastavad valgud on enamasti suuremad. Näiteks *L. reuteri* levaansukraas Lev on 804 aminohappe (ah) pikkune (van Hijum *et al.*, 2004). Gramnegatiivse *P. syringae* patovaride levaansukraasid on peaaegu poole väiksemad ning ning koosnevad kas 431 või 415 aminohapest (Hettwer *et al.*, 1995; Visnapuu *et al.*, 2008; [www.pseudomonas-syringae.org](http://www.pseudomonas-syringae.org)).

Levaansukraasid võib liigitada fruktaansukraaside (FS-id) hulka. FS struktuuri võib jagada neljaks regiooniks: signaalpeptiid, mis on vajalik ensüümi sekreteerimiseks, varieeruva pikkusega N-terminaalne piirkond, konserveerunud katalüütiline tsepter ja C-terminaalne piirkond, mille pikkus võib varieeruda ning mis võib sisaldada rakuseinaga seostumiseks vajalikku järjestust (van Hijum *et al.*, 2006). Erinevates bakterites on levaansukraaside pikkused erinevad ning kõiki ülalpool mainitud regioone ei pruugi igal ensüümil olla. Siiski on katalüütiline tsepter väga sarnase struktuuriga (vt. Joonis 1). Levaansukraasi kristallstruktuurid on olemas *B. subtilis*'e

SacB, *B. megaterium*'i SacB, *G. diazotrophicus*'e LsdA ja *Arthrobacter sp.* K-1  $\beta$ -fruktofuranosidaasi kohta ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org); Meng ja Fütterer, 2003; Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Strube *et al.*, 2011; Tonzuka *et al.*, 2012). Kristallstruktuuride andmed näitavad, et levaansukraasid on viielabalise  $\beta$ -propelleri ehitusega, valgu keskel on tsentraalne õõnsus. Iga propelleri laba  $\beta$ -lehe moodustavad neli antiparalleelset  $\beta$ -ahelat (Joonis 1). Levaansukraasidel ei ole N- ja C-terminus kovalentselt seotud, kuid need asuvad lähestikku. N-terminaalne piirkond paikneb esimese  $\beta$ -lehega risti ning ulatub propelleri III labani, C-terminaalne piirkond asub propelleri V laba juures. *B. subtilis*'e C-terminus ei moodusta vesiniksidemeid esimese  $\beta$ -lehega, aga *G. diazotrophicus*'e valgus on need olemas (Meng ja Fütterer, 2003; Martinez-Fleites *et al.*, 2005).



**Joonis 1.** Levaansukraaside struktuur ja katalüütiline tseenter. *B. subtilis*'e levaansukraas (A) ja selle aktiivtseenter (B) ning *G. diazotrophicus*'e levaansukraas (C) ja selle aktiivtseenter (D). Punasega on tähistatud katalüütilisse kolmikusse kuuluvad aminohapped. (B: Asp86, Asp247 ning Glu342; D: Asp135, Asp309 ja Glu401) (Lammens *et al.*, 2009).

Levaansukraasidel on mitmeid konserveerunud valgujärjestuse motiive. Näiteks RDP-motiivis paikneb katalüütilisse kolmikusse kuuluv aspartaat (vt. joendus Lisas 1; Joonis 1). See aminohape ei ole otseselt katalüüsiga seotud, vaid moodustab vesiniksidemeid fruktoosijäägi C3- ja C4-hüdrosüülrühmadega ja stabiliseerib reaktsioonis moodustuvat vaheühendit (Yanase *et al.*, 2002; Nagem *et al.*, 2004; Meng ja Fütterer, 2008). Katalüütilisse kolmikusse kuuluvad veel

konserveerunud **WD**-motiivi aspartaat, mis on reaktsioonis nukleofiiliks ja **D(E/Q)(T/I/V)ER** motiivi glutamaat, mis on alus-hape katalüüsijaks (Meng ja Fütterer, 2003; Martinez-Fleitez *et al.*, 2005; Lisa 1).

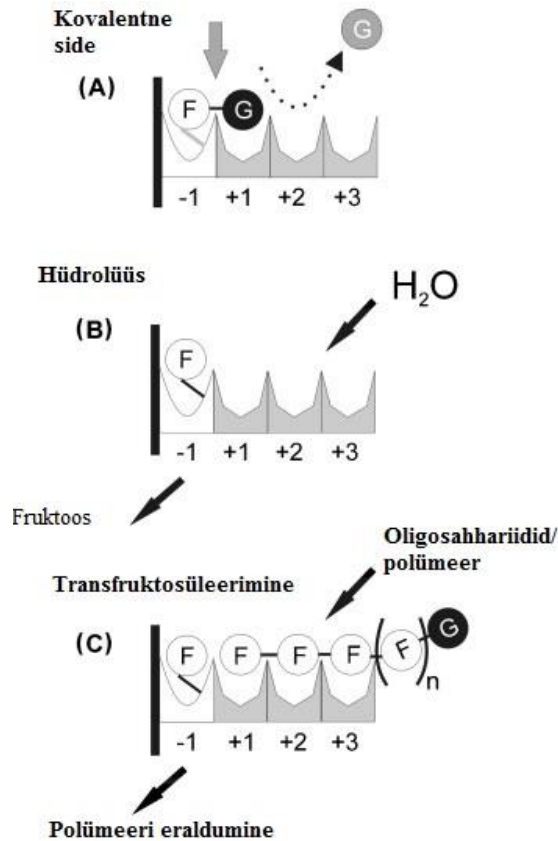
Gramnegatiivsete bakterite levaansukraaside aktiivsuse ja struktuuri säilimiseks ei ole vajalikud metallilised kofaktorid. *G. diazotrophicus*'e LscA-s hoiab valgu struktuuri disulfiidsild (Martinez-Fleitez *et al.*, 2005). Batsillide ja laktobatsillide levaansukraasid aga vajavad katalüütiliseks aktiivsuseks  $\text{Ca}^{2+}$ -ioone ja nende valkudes on näidatud  $\text{Ca}^{2+}$  seondumispiirkond (Meng ja Fütterer, 2003; van Hijum *et al.*, 2004).

### 1.1.2 Levaansukraaside reaktsioonimehhanism ja tekkivad produktid

Levaansukraaside peamiseks substraadiks on sahharoos ( $\alpha$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Fru; GF). Lisaks võib ensüüm substraadina kasutada rafinoosi ( $\alpha$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Fru; GalGF) ja stahhüoosi ( $\alpha$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Fru; Gal<sub>2</sub>GF) (Yanase *et al.*, 2002; van Hijum *et al.*, 2004; Seibel *et al.*, 2006; Anwar *et al.*, 2010; Visnapuu *et al.*, 2011). Levaansukraasid katalüüsivad fruktosüüljäägi ülekannet sahharoosist (või mõnelt teiselt substraadilt) erinevatele aktseptoritele. Tranfruktosüülimisreaktsiooni käigus moodustuvad suure molekulmassiga levaanid või lühema ahelaga fruktooligosahhariidid (FOS). Sõltuvalt ensüümist ja reaktsioonitingimustest võivad produktide pikkused ja hulk varieeruda. Näiteks *B. subtilis*'e levaansukraas toodab sahharoosist peamiselt suure molekulmassiga levaani, aga *G. diazotrophicus*'e levaansukraas sünteesib põhiliselt FOS-e (Hernandez *et al.*, 1995; Batista *et al.*, 1999; Beine *et al.*, 2008).

Reaktsiooni toimumiseks on kõigepealt vajalik doonorsubstraadi (sahharoosi) sisenemine valgu aktiivtsentrisse. Sahharoosi fruktoosijääk seondub substraaditasku -1 alapiirkonda. Järgneb glükoosi ja fruktoosi vahelise glükosiidsideme lagundamine, fruktoos jääb kovalentselt seotuks ensüümi nukleofiiliga ja glükoos vabaneb keskkonda (Joonis 2A). Järgneva reaktsiooni produktide spekter sõltub fruktosüüli aktseptorist. Kui aktiivtsentrisse siseneb veemolekul, siis toimub hüdroolüüs ning fruktoosijääk kantakse üle veele (Joonis 2B). Kui aktseptorina toimib mõni teine molekul, näiteks sahharoos või fruktaan, siis toimub transfruktosüülimine. Aktseptor seostub +1, +2 ning vajadusel ka järgnevatesse alapiirkondadesse. Esimeses transfruktosüülimisreaktsioonis sahharoosiga seostub +1 piirkonda aktseptorina toimiva sahharoosi fruktoosijääk ning +2 piirkonda glükoosijääk ning produktina moodustub 6-kestoos. Ahela edasisel pikendamisel võivad tekkida pikemad FOS-id ja levaan. Kui aktseptoriks on

glükoos, siis toimub vahetusreaktsioon ja produktina tekib sahharoos (Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Ozimek *et al.*, 2006; Meng ja Fütterer, 2008).



**Joonis 2.** Levaansukraasi katalüüsitud reaktsioonide skeem. **A** – sahharoosi molekuli sisenemine ja seondumine valgu aktiivtsentrisse; **B** – sahharoosi hüdroolüüs, kus aktseptoriks on vesi; **C** – transfruktosüleerimine, kus aktseptoriks on fruktaan (Ozimek *et al.*, 2006).

Fruktaansukraasid võivad sünteesida nii lineaarseid kui ka hargnenud struktuurigaprodukte. Kui levaani põhiahelas on fruktoosijäägid ühendatud  $\beta$ -2,6 sidemetega, siis hargnemised toimuvad  $\beta$ -2,1 sidemete kaudu (Han, 1990; Anwar *et al.*, 2010). *S. salivarius*'e levaansukraas toodab levaani, kus  $\beta$ -2,1 hargnemisi on 30% (Newbrun and Baker 1968; van Hijum *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2006).

Levaansukraasid võivad fruktoosijääke üle kanda ka alternatiivsetele fruktosüüli aktseptoritele, kuna aktseptori seondumissaitide struktuur võimaldab erineva kujuga molekulide seostumist. Seevastu doonorsait on väga spetsiifiline ning sinna võib seonduda ainult fruktoosijääk. Pseudomonaadidest pärit levaansukraasid Lsc3 (*P. syringae* pv. tomato DC3000) ja LscA (*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*) transfruktosüleerivad mitmeid erinevaid ühendeid, näiteks D-ksüloosi, D-fukoosi, L- ja D-arabinoosi, D-riboosi, D-sorbitooli, ksülitooli, ksülobioosi, D-

galakturoonhapet ja D-mannitooli. On näidatud, et moodustunud produktid on polümerisatsiooniastmega kuni 5 (Visnapuu *et al.*, 2011).

### 1.1.3 Levaansukraaside biokeemilised omadused

Peamiseks levaansukraasi substraadiks on sahharoos, aga erinevatest bakteritest pärit levaansukraasidel võib afiinsus sahharoosi suhtes suurel määral varieeruda. Näiteks *B. megaterium*'i levaansukraasi SacB afiinsus ( $K_m$ ) sahharoosile on 6.6 mM (Homann *et al.*, 2007) ja *L. reuteri* levaansukraasi vastav  $K_m$  väärtus on 9.7 mM (van Hijum *et al.*, 2004). *Z. mobilis*'e levaansukraasi afiinsus sahharoosile on oluliselt madalam,  $K_m = 125$  mM (Yanase *et al.*, 2002), ja eriti madal on see *P. syringae* pv. phaseolicola levaansukraasil –  $K_m = 160$  mM (Hettwer *et al.*, 1995). Ensüümikineetika iseloomustamiseks mõeldakse reaktsiooni algkiirusi erinevatel substraadi kontsentratsioonidel ja arvutatakse välja  $K_m$  ja maksimaalne reaktsioonikiirus  $V_{max}$ . Nende alusel saab leida katalüütilise konstandi  $k_{cat}$  ja katalüütilise efektiivsuse, mis väljendakse suhtena  $k_{cat}/K_m$ . Kirjanduse andmetel on seni kõige kõrgem katalüütiline efektiivsus detekteeritud *B. megaterium*'i levaansukraasil, 346 1/mM x s (Homann *et al.*, 2007).

Mõnedel levaansukraasidel on näidatud ka rafinoosi või stahhüoosi kasutamist. Afiinsused rafinoosi suhtes on sõltuvalt valgust üsna erinevad ja mõnedel levaansukraasidel on rafinoosi kasutamise maksimaalkiirus isegi kõrgem kui sahharoosil. Näiteks *Z. mobilis*'e levaansukraasi sahharoosi, rafinoosi ja stahhüoosi kasutamise maksimaalkiiruste vahekord on 100:117:100 (Yanase *et al.*, 2002). Seega on talle parimaks substraadiks rafinoos. Osad levaansukraasid eelistavad substraadina siiski sahharoosi ning ensüümi afiinsus rafinoosile on ligi poole väiksem kui sahharoosile. Näiteks *P. syringae* pv. tomato Lsc3 afiinsus rafinoosile on umbes poole madalam kui sahharoosile (Visnapuu *et al.*, 2008).

Levaansukraaside reaktsioonivõime ja produktide spekter sõltub reaktsioonitingimusest. Igal levaansukraasil on katalüüsi läbiviimiseks optimaalne pH ja temperatuur (Hettwer *et al.*, 1995; Batista *et al.*, 1999; Meng ja Fütterer, 2003; van Hijum *et al.*, 2004; Seibel *et al.*, 2006; Homann *et al.*, 2007). *L. reuteri* levaansukraasi Lev optimaalne pH on vahemikus 4.5-5.5 ning kõige kõrgem koguaktiivsus on detekteeritud temperatuuril 50°C. Lev vajab  $Ca^{2+}$  olemasolu ja kui  $Ca^{2+}$ -ioonide sisaldus on reaktsioonipuhvis väiksem kui 1 mM, siis on ensüüm vähe aktiivne. *L. reuteri* levaansukraasi aktiivsust inhibeerivad mõned metalliioonid, näiteks  $Hg^+$ ,  $Fe^{3+}$  ja  $Cu^{2+}$  (van Hijum *et al.*, 2004). *P. syringae* pv. phaseolicola levaansukraasi Lsc reaktsiooniks optimaalne pH on vahemikus 5.8-6.6 ja optimaalne temperatuur on 60°C (Hettwer *et al.*, 1995). *B.*

*megaterium*'e levaansukraasi optimaalsed reaktsioonitingimused on pH vahemikus 6.0-7.0 ja temperatuuril 45°C (Homann *et al.*, 2007).

#### **1.1.4 Levaansukraaside struktuuri ja funktsiooni seoste kindlakstegemine mutatsioonanalüüsiga**

Levaansukraaside struktuuri ja funktsiooni seoseid saab uurida valgu struktuuri kindlakstegemise (kristallstruktuurid) ja mutatsioonanalüüsiga. Valgu mutante on võimalik saada nii juhusliku kui ka koht-suunatud mutageneesiga. Levaansukraase on muteeritud mõlema meetodiga (Yanase *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2011). Näiteks *B. subtilis*'e levaansukraasi geeni (*sacB*) on muteeritud koht-suunatult, et teha kindlaks SacB valgu polümerisatsioonireaktsiooni jaoks olulisi positsioone (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; Ortiz-Soto *et al.*, 2008)

*B. subtilis*'e levaansukraasi SacB kristallstruktuur määrati aastal 2003 (Meng ja Fütterer, 2003). Selles töös kontrolliti ka katalüütilisse kolmikusse ennustatud aminohapete rolli. Kui kas Asp86, Asp247 või Glu342 (vt. Joonis 1) muteeritialaniiniks, siis saadi katlüütiliselt inaktiivsed valgud, mis ei sünteesinud levaani. *B. subtilis*'e levaansukraasi polümerisatsioonireaktsiooniks on tarvis ka arginiini positsioonis 360 ja selle muutmine lüsiiniks, seriiniks või leutsiiniks näitas, et mutantsed ensüümid moodustasid ainult trisahhariidi 1-kestoosi, aga valk levaani ei sünteesinud (Chambert ja Petit-Glatron, 1991). His321 (vastab Arg360-le SacB valgus) muteerimine *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgus alandas samuti väga tugevalt ensüümi polümeriseerivat aktiivsust (Visnapuu *et al.*, 2011).

*G. diazotrophicus*'e levaansukraasi LsdA uurimisel leiti, et Asp135 asendamine asparagiiniga vähendas katalüütilist konstanti 2300 korda. Asp309 asendamisel asparagiiniga RDP-motiivis vähendas  $k_{cat}$  väärtust 75 korda, aga oluliselt ei muutunud afiinsus sahharoosile. Sellest järeldati, et Asp135 ja Asp309 kuuluvad katalüütilisse kolmikusse ja on vastavalt nukleofiil ja vaheühendi stabiliseerija (Batista *et al.*, 1999; Martinez-Fleites *et al.*, 2005).

Juhusliku mutageneesi abil on uuritud *Z. mobilis*'e levaansukraasi struktuuri ja funktsiooni seoseid. Mutatsioonide tekitamiseks kasutati keemilist mutageeni, 2 M lämmastikushapet. Mutatsiooni asukoht tuvastati geeni sekveneerimisega. *Z. mobilis*'e levaansukraasi muteerimiseks kasutati ka koht-suunatud mutageenesi ja leiti, et Asp194 ja Glu278 kuuluvad katalüütilisesse kolmikusse, sest nende positsioonide asendamine aspartaadiga vähendas  $k_{cat}$  väärtust vastavalt 3400 ja 30 korda (Yanase *et al.*, 2002).

## 1.2 Fruktaanide olulisus ja kasutusvõimalused

Fruktaanid on  $\beta$ -sidemega seotud fruktoosijääkidest koosnevad polümeerid, millel on otsmine D-glükoosijääk. Paljud bakterid, seened ja ~40 000 taimeliiki koguvad varuainena fruktaane. Arvatakse, et lisaks sellele võivad taimedes fruktaanid olla seotud rakumembraani stabiliseerimisega ning nad kaitsevad rakke ka põua eest. Fruktaanid võivad olla olulised ka külma talumisel, sest jahedama kliimaga aladel on fruktaane talletavaid taimi rohkem (Hendry and Wallace, 1993; Pilon-Smits *et al.*, 1995; Meng ja Fütterer, 2003).

Bakterite puhul on fruktaanide füsioloogilisi rolle vähem uuritud, kuid on väidetud, et fruktaani biosüntees võib olla seotud erinevate protsessiga, nagu bakterite ellujäämine mullas, taimede nakatamine ja sümbioos. Näiteks fruktaani toodav bakter *G. diazotrophicus* elab sümbioosis suhkrurooga, *Z. mobilis* agaaviga ja *Burkholderia pseudomallei* maisiga (Velazquez-Hernandez *et al.*, 2008).

Fruktooligosahhariide võib kasutada tervislike prebiootikumidena. See on ühend, mida kasutavad probiootilised bakterid ning mida toidule lisades saab selle funktsionaalsust tõsta. Soolestikus soodustavad prebiootikumid piimhapest bakterite ja bifidobakterite paljunemist tal on seetõttu positiivset mõju inimese tervisele (Simmering ja Blaut, 2001; Gibson *et al.*, 2010; Roberfroid *et al.*, 2010; Koropatkin *et al.*, 2012). Kuigi levaani-tüüpi FOS-e on sellest aspektist vähem uuritud, siis madala molekulmassiga  $\beta$ -2,6-sidemega FOS-idel on näidatud soodustavat mõju bifidobakterite kasvule (Marx *et al.*, 2000).

Levaanil on potentsiaalseid kasutusvõimalusi toidu-, tekstiili-, kosmeetika- ja farmaatsiatööstuses ning meditsiinis (Li *et al.*, 2008). Levaanil on näidatud ka rakkude vohamist ja nahaärritust pärssivat ja veresuhkru taset alandavat mõju (Calazans *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2005; Dahech *et al.*, 2011).

Kuna levaan seob vett, siis saaks seda lisada niisutava komponendina kosmeetikatoodetesse. Sulfaaditud, fosforüülitud või atsetüülitud levaani vorme võiks kasutada viirusevastaste ainetena. Lisaks võib levaani kasutada biotehnoloogias kapslimaterjalina. Levaanil võiks olla palju tööstuslikke rakendusi: seda saab tänu pindaktiivsusele kasutada puhastusainena majapidamises ning glükooli-levaani kahefaasilises vesilahuses saab lahutada valke (Kang *et al.*, 2009).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks oli mutatsioonanalüüsi kasutades uurida, kuidas mõjutab aminohapete asendamine *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi Lsc3 N-terminaalses osas tema katalüütilisi omadusi. Soovisime välja selgitada, millised aminohapete positsioonid Lsc3 valgus selles piirkonnas võiksid mõjutada ensüümi substraadispetsiifikat, polümerisatsioonivõimet ja sünteesitud produktide hulka ning spektrit. Selleks püstitati järgmised ülesanded:

1. Joondada Lsc3 valgujärjestus teiste levaansukraaside vastavate järjestustega ning hinnata N-terminaalse piirkonna positsioonide konserveerumist.
2. Muteerida koht-suunatult Lsc3 valgus Trp109, Glu110, His113, Glu146 ja Glu236.
3. Konstrueerida plasmiidid Lsc3 mutantide Trp109Ala, Glu110Asp, His113Ala, Glu146Gln ja Glu236Gln sünteesiks.
4. Ekspresseerida mutantseid levaansukraase *Escherichia coli* tüves BL21(DE3).
5. Puhastada valgud Ni<sup>2+</sup>-afiinuskromatograafiaga, määrata ensüümide funktsionaalsus, kineetilised parameetrid ning biokeemilised omadused.
6. Analüüsida mutantsete valkude substraadispetsiifikat, reaktsiooniproduktide spektrit ja polümerisatsioonivõimet ning teha järeldusi Lsc3 valgus uuritavasse piirkonda jäävate aminohapete olulisuse kohta substraadi seondumisel ja polümerisatsioonireaktsiooni läbiviimisel.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Mutantsete levaansukraaside ekspresseerimiseks kasutati pURI3 vektorit (2737 ap), kuhu kloneeriti *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi geeni muteeritud variandid. Kontrollina kasutati metsiktüüpi *lsc3* geeni sisaldavat ekspressioonikonstrukti pURI3-*lsc3* (3820 ap). Kõikide konstruktide puhul sünteesitakse Lsc3 valk koos N-terminaalse His<sub>6</sub>-järjestusega. Töös kasutatud plasmiidid on esitatud Tabelis 1.

**Tabel 1.** Töös kasutatud plasmiidid. Märgitud on plasmidi nimetus, kirjeldus ja viide allikale.

Plasmiid	Kirjeldus	Viide
pURI3	Ekspressioonivektor	Rivas <i>et al.</i> , 2007; Curiel <i>et al.</i> , 2011
pURI-lsc3	pURI vektor, mis sisaldab muteerimata <i>lsc3</i> geeni	Visnapuu <i>et al.</i> , 2011
pURI3-lsc3W109A	pURI vektor, mis sisaldab <i>lsc3</i> geeni asendusega <b>Trp109Ala</b>	Käesolev töö
pURI3-lsc3E110A	pURI vektor, mis sisaldab <i>lsc3</i> geeni asendusega <b>Glu110Asp</b>	Käesolev töö
pURI3-lsc3H113A	pURI vektor, mis sisaldab <i>lsc3</i> geeni asendusega <b>His113Ala</b>	Käesolev töö
pURI3-lsc3E146Q	pURI vektor, mis sisaldab <i>lsc3</i> geeni asendusega <b>Glu146Gln</b>	Käesolev töö
pURI3-lsc3E236Q	pURI vektor, mis sisaldab <i>lsc3</i> geeni asendusega <b>Glu236Gln</b>	Käesolev töö

Mutantseid levaansukraase ekspresseeriti *E. coli* tüves BL21(DE3) [*hsdS gal ( $\lambda$ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1)*] (Studier ja Moffatt, 1986), mille genoomis on LacUV5 promootor, mis IPTG (isopropüül- $\beta$ -D-1-tiogalaktopüranosiid) lisamisel aktiveerib T7 polümeraasi sünteesi (Rivas *et al.*, 2007). Vektoril pURI3 on T7 seondumisjärjestus, kust algab vektorisse kloonitud geeni ekspressioon.

### 2.2.2 Mutantide konstrueerimine ja *lsc3* geeni klonereerimine pURI3 vektorisse

Mutatsioonide koht-suunatult *lsc3* geeni viimiseks kasutati PCR-põhist praimerit pikendamist, mida kutsutakse ka megapraimerit meetodiks (Wei *et al.*, 2004). Kõikide muteerimise ja klonereerimise käigus vajalikes PCR-i etappides kasutati viguparandava aktiivsusega *Pfu* DNA polümeraasi (Thermo Scientific, USA). Megapraimerina kasutatav DNA fragment sünteesiti PCR-i reaktsioonisegus, mis sisaldas 0.025 U/ $\mu$ l *Pfu* polümeraasi, 1x *Pfu* puhvrit (Thermo Scientific, USA), 0.2 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; Fermentas, Leedu), 4 mM MgSO<sub>4</sub>

ja 0.5 pmol/ $\mu$ l mõlemat praimerit. Matriitsina kasutati muteerimata *lsc3* geeniga plasmidi pURI3-*lsc3* (Visnapuu *et al.*, 2011). Praimeriteks olid vastavalt päripraimer T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'), mis seondub DNA-le T7 polümeraasi seondumisjärjestuse piirkonnas ja vastupraimeritena W109ARev (5' TGTCGATCTTCCGCGTCACGC 3'), E110DRev (5' ATGTCGATCGTCCCAGTCACGC 3'), H113A Rev (5' CGCGGCCAGCTCGATCTTCC 3'), E146QRev (5' GGTGTGCCCGCCCACTGTCGAGTGGTGG 3') või E236QRev (5' TCACCGGCGACATTGCCCTGAAACACCA 3'). Produktid on vastavalt 466, 467, 474, 580 ja 853 ap pikkusega. Muteerimispraimerid sisaldavad selliseid lämmastikaluse vahetusi, mis muudavad vastavates positsioonides koodonit ja aminohappe muutubalaniiniks, aspartaadiks või glutamiiniks.

PCR-i produktid (megapraimerid) lahutati elektrofooresiga 1% agarosgeelil (vt. pt. 2.2.5). Õige pikkusega DNA fragmendid ja lõigati geelist ning puhastati Ultra Clean<sup>TM</sup> 15 DNA puhastamise komplektiga (MoBio, USA) valmistajapoolse protokollil alusel. Seejärel megapraimereid pikendati PCR-i reaktsiooniga. Reaktsioonisegu sisaldas lisaks megapraimerile 1x *Pfu* puhvrit, 0.04 mM dNTP, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05 U/ $\mu$ l *Pfu* DNA polümeraasi ja matriits-DNA oli pURI3-*lsc3*. Saadud proove inkubeeriti restriktasiga *DpnI* (lõppkonts. 0.2 U/ $\mu$ l, Thermo Scientific, USA) 3 tundi 37°C ja inaktiveeriti 20 min 80°C. *DpnI* restrikteerib algset DNA-d, mis on metüleeritud, ja segusse jäävad alles ainult pikendamise käigus tekkinud *lsc3* fragmendid. Seejärel tehti PCR, et amplifitseerida suuremas hulgas 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 Ultra Clean<sup>TM</sup> 15 DNA puhastamise komplektiga. Järgmiseks kloneeriti mutantsed *lsc3* geenid pURI3 vektorisse PCR-i põhise ligaasivaba kloneerimise meetodiga nagu on eelnevalt meie töögrupis näidatud (Elmi, 2011; Visnapuu *et al.*, 2011). Reaktsioonisegu sisaldas puhastatud *lsc3* geeni, vektorit pURI3, 0.01 mM dNTP, 1x *Pfu* puhvrit, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05 U/ $\mu$ l *Pfu* DNA polümeraasi. Sünteesiaeg ühes tsüklis oli 3 min. Saadudprodukte töödeldi *DpnI*-ga (lõppkonts. 0.2 U/ $\mu$ l), et vabaneda segusse allesjäänud pURI3 vektorist. Seejärel lisati O puhvrit ja restrikteeriti *NotI*-ga (5' GC↓GGCCGC 3', lõppkonts. 0.2 U/ $\mu$ l, Fermentas, Leedu), mis "lõikab" tühja vektorit, kuid mitte inserteerunud *lsc3* geeniga plasmidi, kuna viimane ei sisalda seda lõikamissaiti. Reaktsiooni pikkuseks oli 1 h 37°C ja ensüümi inaktiveerimiseks kuumutati segu 20 min 80°C. Segud elektroporeeriti *E. coli* BL21(DE3) tüvesse, kolooniad kontrolliti PCR-iga,

eraldati plasmiidne DNA-sse, puhastati ning mutatsiooni asukohta kontrolliti sekveneerimisega (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 4 ml vähendatud soolasisaldusega YENB söötmes (0.75% pärmiekstrakt, 0.8% toitepuljong) 37°C loksutil kuni optilise tiheduse ( $OD_{600}$ ) väärtuseni ~0.4. Bakterirakke tsentrifugeeriti 13 200 g 30 s ja rakke pesti 3 korda 15% steriilse glütserooliga ja suspendeeriti 50 µl sama kontsentratsiooniga glütseroolilahuses. Seejärel lisati *E. coli* BL21(DE3) rakkudele sobiv kogus etanooliga sadestatud kloneerimissegu või plasmiidset DNA-d. Rakud pipeteeriti 2 mm läbimõõduga elektroporatsiooni küvetti (Bio-Rad, USA) ja elektroporatsioon viidi läbi Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad, USA) süsteemiga pingel 2.5 kV. Rakke kasvatati 1 ml LB (Luria-Bertani) söötmes loksutil 37°C 1 h. Seejärel tsentrifugeeriti 1 min 12 000 g, plaaditi LB Amp (ampitsilliin; lõppkonts. 150 µg/ml) selektiivsöötmele ja söötmeplaate inkubeeriti 37°C ~20 h.

Saadud kolooniad külvati LB Amp tardsöötmele ning transformantide fenotüübi kontrollimiseks külvati need LB tardsöötmele, mis sisaldas ampitsilliini, 10% sahharoosi ja IPTG-d. Levaansukraasi süntees aktiveerub IPTG toimel ning aktiivse valguga olemasolul hakatakse sahharoosist levaani sünteesima. *lsc3* geeni olemasolu transformantide rakkudes kontrolliti PCR-ga. Reaktsioonisegu sisaldas 0.05 U/µl *Taq* DNA polümeraasi, 0.2 mM dNTP, 6.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x PCR puhvrit. Päripraimerina kasutati Lsc1ja3Fw2 (5' GCGATCGCCAAAGTACG 3') vastupraimerina Ampsaba (5' CTGAGATAGGTGCCTCAC 3') (produkti pikkus 452 ap). Mõlema praimeri kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 0.5 pmol/µl. Tekkinud produktide olemasolu ja pikkust kontrolliti 1% agarosgeelil (pt. 2.2.5).

Selleks, et kindlaks teha mutatsioonide asukohta ja vastavust eeldatavale mutatsioonile, sekveneeriti konstrueeritud plasmiidides mutantset *lsc3* geeni sisaldavad piirkonnad. Plasmiidne DNA eraldati FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini komplektiga (Favorgen Biotech Corp. Taiwan) vastavalt valmistajapoolsele protokollile. Sekveneerimiseks kasutati BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit-i (Applied Biosystems, Kanada). Kõigepealt tehti plasmiidset DNA-d matriitsina kasutades PCR, mille segu sisaldas 1x *Taq* puhvrit, 0.2 mM dNTP, 6.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 pikkusega 760 ap. Levaansukraasi teine pool paljundati praimeritega Lsc1ja3Fw1 (5' GCGATCGCCAAAGTACG 3') ja Ampsaba (amplifitseerub 938 ap pikkune fragment). Seejärel tehti proovidele *ExoI*-FastAP töötlus 15 min 37°C. FastAP (lõppkonts. 0.07 U/µl; Thermo Scientific, USA) on termotundlik aluliseline fosfataas, mis eraldab DNA-lt 5'- ja 3'-fosfaatrühmad, ja eksonukleaas *ExoI* (lõppkonts. 0.18 U/µl, Thermo Scientific, USA), mis degradeerib üheaahelalist DNA-d 3'→5' suunas ning seega lagundab praimerid. Ensüümide inaktiveerimiseks kuumutati proove 15 min 80°C. Siis sadestati DNA etanooliga ja proovid valmistati ette, kasutades tootjapoolseid reaktiive, 0.7 µl BigDye premiksi, 2 µl 5x lahjenduspuhvrit, 4 pmol/µl praimerit, segu maht oli 10 µl. Proovid saadeti sekveneerimisele ABI 3130xl Genetic Analyser või ABI 3730xl DNA Analyser sekvenaatoriga (Applied Biosystems, Kanada).

#### **2.2.4 Levaansukraaside ekspresseerimine, rakuekstraktide tegemine ja valkude puhastamine**

pURI3-*lsc3* plasmiidid viidi *E. coli* ekspressioonitüvesse BL21(DE3). Transformante kasvatati ampitsilliini sisaldavas LB vedelsöötmes 37°C loksutil. Rakuekstraktide saamiseks külvati transformantide kolooniad kõigepealt 5 ml LB Amp vedelsöötmesse, kasvatati üleöö 37°C loksutil. Seejärel tehti bakterikultuurist lahjendus 200 ml LB Amp söötmesse määrates algtiheduseks ~0.05 (OD<sub>600</sub>) ja rakke kasvatati 37°C loksutil kuni optilise tiheduse väärtuseni ~0.4-0.6. Levaansukraasi ekspressioon indutseeriti 0.5 mM IPTG lisamisega ja rakke kasvatati 22°C loksutil üleöö (~20 h). Bakterikultuuri tsentrifuugiti 10 min 2400 g (4°C), pesti kaks korda 5 ml 100 mM fosfaatpuhvriga (pH 6.0) ning suspendeeriti 10 ml-is sonikeerimispuhvris (puhver A: 10 mM imidasool, 10% glütserool, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl; pH 6.0). Suspensiooni külmutati vedelas lämmastikus ja sulati leiges vees kolm korda selleks, et lõhkuda bakterirakukesti ja suurendada valgusaagist. Lisaks purustati rakud neid ultraheliga töödeldes (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole-Parmer Instrument Co., USA). Segusid tsentrifuugiti 4°C 20 min 2400 g, eraldati supernatant nind lisati DNAaI (5 U/ml), et lagundada rakuekstraktis olev DNA. Segu inkubeeriti üleöö 4°C. Supernatant ja kõik valgu puhastamisel kasutatud lahused filtreeriti läbi 0.45 µm poorisuurusega süstlafiltri, et vabastada neid suurematest osakestest.

Valgu puhastamiseks kasutati vedelikkromatograafia süsteemi ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) ja 1 ml Ni<sup>2+</sup>-afiinsuskromatograafia kolonne (HisTrap™ FF, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi). Ekspresseeritud levaansukraasid sisaldavad valgu N-terminaalses otsas His<sub>6</sub>-järjestust, mis seondub kolonnis Ni-iooniga ning valk on sealt

elueeritav 500 mM imidasooli sisaldava puhvriga. Valgu puhastamiseks kasutati tootjapoolset meetodikat (programm: *Affinity purification any His-Trap*) ning puhta valgu kolonnist elueerimiseks kasutati puhvrit B (500 mM imidasool, 300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6.0). Fraktsioonid koguti, neid analüüsiti SDS-PAGE-il kõrvuti rakuekstraktiga ning levaansukraasi sisaldavad fraktsioonid liideti. Imidasooli sisaldava puhvri asendamiseks levaansukraasi reaktsioonipuhvriga kanti segu 12-14 kDa poorisuurusega ServaPor® dialüüsimeembraani (*M<sub>w</sub> cutoff*: 12-14 kDa; SERVA Electrophoresis GmbH, Saksamaa) ja seda dialüüsiti McIlvaine'i puhvriga (0.04 M sinrunhape, 0.13 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% asiid; pH 6.0) 4°C ~24 h. Puhvrit vahetati selle aja jooksul kaks korda, et saada puhtam valgupreparaat. Seejärel kontsentreeri valgulahus Amicon Ultra tsentrifuugifiltritega, mis lasevad läbi väiksemaid molekule kui 10 kDa (Millipore, USA). Selleks tsentrifuugiti valgulahust 2400 g 20 min. Saadud preparaati kasutatai puhta valguna.

### 2.2.5 Geelelektroforees

DNA fragmentide lahutamiseks ja kontrolliks kasutati agarosgeelelektroforeesi. Selleks tehti 1% agarosgeel 0.5 x TAE puhvril (40 mM Tris-atsetaatpuhver, 1 mM EDTA; pH 8.2). Agarosgeel sisaldas etiidiumbromiidi (0.35 µg/ml). Proovidele lisati 3 µl geelivärvi (6x DNA Loading Dye, Fermentas, Leedu) ja geelelektroforees toimus toatemperatuuril 0.5x TAE puhvril pingel 100 V. DNA fragmente vaadati ultravioletvalguses (312 nm). DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati GeneRuler™ 1 kb (Fermentas, Leedu) markerit.

Valgude lahutamiseks kasutati SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforeesi (SDS-PAGE) (Sambrook ja Russell, 2001). SDS-geeli lahutav osa sisaldas 10% polüakrüülamiidi. Proovid suspendeeriti 5 µl 2 x Laemmli puhvril (fooresivärv), mis sisaldas 0.001% broomfenoolsinist, 2% SDS-i, 2% β-merkaptopetanolooli, 20% glütserooli, 0.125 M Tris-i (pH 6.8) ja kuumutati 96°C 5 min. Valgud lahutati Mini-PROTEAN Tetra süsteemiga (BIO-RAD, USA). Valkude suuruse hindamiseks kasutati PageRuler™ SM0671 (Fermentas, Leedu) valkude suurusmarkerit.

### 2.2.6 Levaansukraasi erinevate aktiivsuste kineetiliste parameetrite ja polümerisatsiooniproductide määramine

#### Levaansukraasi koguaktiivsuse määramine glükoosi tekke järgi

Levaansukraas kasutab substraadina sahharoosi ning iga sahharoosi lõhustamise reaktsioonis vabaneb glükoos. Seetõttu väljendatakse levaansukraasi koguaktiivsust sahharoosist vabanenud glükoosi hulga järgi. Glükoosi määramiseks kasutati Glucose Liquicolor'i reaktiivi (Human

GmbH, Saksamaa) ja eelnevalt väljatöötatud meetodikat (Visnapuu *et al.*, 2008). Reaktsioonisegu sisaldas Na-asiidiga (0.02%) McIlvaine'i puhvrit (McIlvaine 1921; pH 6.0), 100 mM sahharoosi ja sobivat kogus puhastatud valku. Reaktsioon toimus 37°C termostaadis. Kindlatel ajapunktidel võeti 50 µl segu ja reaktsiooni peatamiseks pipeteeriti see 150 µl Tris (trishüdrosümetüülaminometaan) puhvrile (200 mM; pH 8.3) ning kuumutati 5 min 96°C. Seejärel jahutati proovid jääl, lisati 800 µl Glucose Liquicolor'i reaktiivi ja glükoosi hulk määrati mõõtes spektrofotomeetriselt segu lainepikkusel 500 nm. Levaansukraasi koguaktiivsus väljendati sahharoosist vabanenud glükoosi kogusena mikromoolides minutis mg valgu kohta ( $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$  ehk U/mg). Puhastatud mutantsete levaansukraaside afiinsus sahharoosile ( $K_m$ ; mM) ja maksimaalne reaktsioonikiirus ( $V_{\text{max}}$ ; U/mg). Kineetiliste parameetrite leidmiseks varieeriti sahharoosi kontsentratsioone reaktsioonisegus vahemikus 20-300 mM. Kineetiliste parameetrite väärtused arvutati Michaelis-Menteni võrrandi alusel, kasutades programmi SigmaPlot 2001 (SYSTAT, USA) ensüümikineetika moodulit (Enzyme Kinetics Module 1.1).

#### Substraadispetsiifika määramine redutseerivate suhkrute tekke järgi

Sahharoosi ja rafinoosi hüdrolüüsil vabanevad redutseerivad suhkrud, mille abil saab hinnata levaansukraasi substraadispetsiifikat. Selleks kasutati DNS (3,5-dinitrosalitsüülhape) reaktiivi (Miller, 1959). Sahharoosi ja rafinoosi kontsentratsioon reaktsioonisegudes oli 400 mM. Reaktsioonisegu (1.5 ml) sisaldas lisaks sahharoosile või rafinoosile McIlvaine'i puhvrit (pH 6.0), kuhu oli lisatud 0.02% Na-asiidi, ja sobivat kogust lahjendatud valku. Reaktsioon viidi läbi temperatuuril 37°C. Erinevates ajapunktides võeti 200 µl reaktsioonisegu ning segati see 400 µl DNS reaktiiviga. Proove kuumutati proove 100°C 5 min, jahutati jääl ja lisati 800 µl destilleeritud vett. Mõõdeti segude optiline tihedus ( $OD_{540}$ ). Levaansukraasi aktiivsus väljendati sahharoosist ja rafinoosist moodustunud redutseerivate suhkrute kogusena mikromoolides, mis tekkis minutis ühe mg valgu kohta ( $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$  ehk U/mg).

Mutantsete levaansukraaside afiinsus ( $K_m$ ; mM) rafinoosile määrati DNS reaktiiviga, kasutades reaktsioonisegudes 25-300 mM rafinoosi kontsentratsioone. Kineetilised parameetrid arvutati Michaelis-Menteni võrrandi alusel nagu on kirjeldatud eespool.

#### Valgu kontsentratsiooni määramine

Valkude kontsentratsioonid (mg/ml) rakuekstraktides ja puhastatud preparaadis määrati kahel viisil: Folini reaktiiviga Lowry meetodil (Lowry *et al.*, 1951) ja spektrofotomeetriselt ( $OD_{280}$ ) ekstinktsioonikoefitsendi ( $\epsilon$ ) järgi. Esimene meetod sobib valgu koguse määramiseks nii

rakuekstraktist kui ka puhastatud preparaadist ja teine meetod puhta preparaadi valgusisalduse määramiseks. Reaktsioonisegu, mis sisaldas 0.1 ml sobiva lahjendusega valgulahust ja 1 ml C-reaktiivi (50 osa 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M NaOH-s ja 1 osa 0.5 % CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 1% Na-K-tartaadis). Segu inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Seejärel lisati 0.1 ml 1 N Folini reaktiivi ja inkubeeriti 40 min valguse eest kaitstult. Seejärel mõõdeti segu optiline tihedus (OD<sub>750</sub>). Valgusisaldus arvutati veise seerumalbumiini lahusega tehtud kaliibergraafiku alusel võttes arvesse valgulahuse lahjendust. Spektrofotomeetriliselt määrati valgu sisaldus Tecan infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Šveits) mikroplaadilugejaga. Mikroplaadile (NanoQuantPlate; Tecan Group Ltd., Šveits) pipeteeriti valgulahused ja mõõdeti nende optiline tihedus (OD<sub>280</sub>). Kontsentratsioonid arvutati valemiga  $C=A/\epsilon L$ , kus C on kontsentratsioon (mg/ml), A on optilise tiheduse väärtus,  $\epsilon$  on ekstinktsioonikoefitsient ( $\epsilon=1.665$ ) ja L on kihi paksus (0.05 cm). Ekstinktsioonikoefitsendi väärtus arvutati ExPasy serveris ProtParam tool ([www.expasy.org](http://www.expasy.org))

#### Transfruktosüüliva aktiivsuse määramine ja reaktsiooniproductide kvantiteerimine

Transfruktosüleeriv ehk polümeriseeriv aktiivsus (TA) määrati kõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga (*high-performance liquid chromatography*, HPLC). Productide saamiseks segati reaktsioonisegu, mis sisaldas 1200 mM sahharoosi (410.8 mg/ml) ja 2.7 U/ml puhastatud levaansukraasi reaktsioonipuhvril (McIlvaine'i puhver (pH 6.0) 0.02% Na-asiidiga). Reaktsioonisegus kasutatud valgu kogus sõltus mutantse valgu koguaktiivsusest, mis oli määratud 100 mM sahharoosiga 37°C. Lisatud valgu kogused 1 ml reaktsioonisegu kohta olid järgmised: Trp109Ala 0.114 mg, Glu110Asp 0.0082 mg, His113Ala 0.039 mg, Glu146Gln 0.0067 mg, Glu236Gln 0.0341 mg. Proove inkubeeriti 37°C 20 h ja reaktsioon peatati kuumutamiseks 5 min jooksul temperatuuril 96°C. Seejärel tehti proovist sobiv lahjendus ja glükoosi, fruktoosi, sahharoosi ja FOS-ide sisaldus määrati kromatograafiliselt. Vedelikkromatograafia ja esialgse andmeanalüüsi viis läbi meie töögrupi koostööpartner Heiki Vija Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudist (KBFI, Tallinn).

Levaansukraasi transfruktosüleeriv aktiivsus (TA) arvutati valemiga  $([Glc]-Fru_v)/[Glc]*100$ , kus [Glc] näitab glükoosi ja [Fru<sub>v</sub>] vaba polümeriseerimata fruktoosi kontsentratsiooni reaktsioonisegus. Transfruktosüleeriv aktiivsus väljendati protsendina, mis näitas kui suur osa reageerinud sahharoosist pärinevast fruktoosist polümeriseeriti.

## Levaani sünteesi kineetika uurimine

Levaani sünteesi kineetikat jälgiti mikrotiiterplaadil (Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol; CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Saksamaa) (Visnapuu *et al.*, 2011). Reaktsioonisegu maht ühes mikroplaadi kannukeses oli 200 µl ja sisaldas erinevates kontsentratsioonides 150, 300, 600 või 1200 mM sahharoosi, McIlvaine'i puhvrit ja 2 µg puhastatud valku. Mikrotiiterplaati inkubeeriti temperatuuril 30°C ja 20 tunni jooksul registreeriti hägu (polümeerse levaani) teket lainepikkusel 400 nm Tecan infinite M200PRO (Tecan Group Ltd., Šveits) mikroplaadilugejaga (Tecan Group Ltd., Šveits). Näit võeti iga 30 min tagant. Levaani kogus reaktsioonisegus arvutati puhastatud ja kuivatatud levaaniga tehtud kaliibergraafiku alusel, mille koostas Triinu Visnapuu.

### **2.2.7 Õhukese kihi kromatograafia**

Õhukese kihi kromatograafiaga (*thin layer chromatography* – TLC) analüüsid kasutati analoogset reaktsioonisegu kui transfruktosüleeriva aktiivsuse määramise puhul (vt. pt. 2.2.6). Sahharoosisisaldus reaktsioonisegus oli 1.2 M ja valku 2.7 U/ml. Reaktsioon toimus 37°C 20 h ja see peatati kuumutamise. 0.5 µl eelnevalt destilleeritud vees 4 korda lahjendatud proovi kanti kontsentreeriva tsooniga TLC plaadi (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>; Merck, Saksamaa) stardijoonele ja plaat kuivatati. Markeriteks kasutati levaani (PA >7), nüstoosi (PA 4), 1-kestoosi (PA 3), sahharoosi (PA 2) ja fruktoosi (PA 1). Kromatograafiaplaat asetati voolutuslahusse (90:65:15, kloroform-metanool-vesi) (Tajima *et al.*, 2000) ning voolutati kaks korda plaadi ülemise servani. Fruktoosi sisaldavate suhkrute nähtavaks muutmiseks töödeldi plaati urea reaktiiviga (3% urea, 1 M fosforhape veega küllastatud butanoolis (St. John *et al.*, 1996; Visnapuu *et al.*, 2009). Seejärel kuumutati plaati temperatuuril 120°C ~10 min kuni suhkrulaikude värvumiseni ja plaat skaneeriti.

### **2.2.8 Arvutipõhised meetodid**

Mutatsioonide asukoha leidmiseks muteeritud *lsc3* geenist kasutati järjestuste võrdlemist muteerimata *lsc3* geeniga programmi BioEdit 7.0.5 abil (Hall, 1999).

*P. syringae* pv. tomato DC3000 Lsc3 levaansukraas joondati 12 erineva bakteri levaansukraaside järjestustega (Lisa 1). Valkude aminohappelised järjestused võeti CAZy andmebaasi kaudu (<http://www.cazy.org>). Joondamiseks kasutati programmi BioEdit moodulit ClustalW

(Thompson *et al.*, 1994). Valgu kristallstruktuurid visualiseeriti PyMol programmiga (DeLano, 2002).

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 Levaansukraasi Lsc3 polümeriseerimisreaktsioonides oluliste aminohapete ennustamine kirjanduse andmete ja valkude joonduste alusel

Eelnevalt on meie töögrupis uuritud ja põhjalikumalt iseloomustatud *P. syringae* DC3000 pv. tomato levaansukraase Lsc2 ja Lsc3 (Visnapuu *et al.*, 2008, 2009, 2011; Alamäe *et al.*, 2012). Need ensüümid on biotehnoloogilistelt kõitvad, sest lisaks suhteliselt kõrgele afiinsusele sahharoosi suhtes (~20 mM) on neil ka suur katalüütiline aktiivsus. Lisaks oleme näidanud, et Lsc3 valk toodab nii polümeerset levaani kui ka FOS-e ning kasutab fruktosüüli aktseptorina peale sahharoosi ja fruktaanide ka teisi molekule nagu näiteks ksüloosi, ksülobioosi, sorbitooli ja arabinoosi (Visnapuu *et al.*, 2009, 2011). Taolised segusuhkrud võiksid leida kasutusalasid näiteks toiduainetööstuses efektiivsete prebiootikumidena. Valgu biotehnoloogilisest potentsiaalist ensümaatilises sünteesis annab tunnistust tema väga hea ekspressioon ja suur saagis *E. coli*-s. Näiteks pURI3-lsc3 ekspressiooniplasmiidi kasutades on võimalik 1 l indutseeritud bakterikultuurist saada kuni 30 mg puhastatud Lsc3 preparaati, millega saab sünteesida suures kogusesprodukte, nii levaani kui ka FOS-e (Visnapuu *et al.*, 2008; Mardo *et al.*, ilmumas).

Nii Lsc3 valgu kui ka teistest pseudomonaadidest pärinevate levaansukraaside struktuuri ja funktsiooni kohta on väga vähe teavet. Meie uurimisgrupis on alustatud Lsc3 valgu mutatsioonanalüüsiga, et teha kindlaks katalüüsis, substraadi sidumises ja polümerisatsiooniproduktide tekkes olulisi aminohapete positsioone (Mardo, 2011; Visnapuu *et al.*, 2011; Mardo *et al.*, ilmumas; T. Visnapuu ja K. Mardo, avaldamata andmed). Oleme näidanud, et katalüütilisse kolmikusse kuuluvateks aminohapeteks on Asp62, Asp219, Glu303, mis on vastavalt nukleofiil, vaheühendi stabiliseerija ja alus-hape katalüüsija (Elmi, 2011; Mardo *et al.*, ilmumas). Teame veel, et olulisteks polümerisatsiooni determinantideks on Lsc3 valgu C-terminaalses piirkonnas paiknevad Thr302 ja His321, mille muteerimisel väheneb oluliselt transfruktosüüliv aktiivsus ja polümeerse levaani süntees (Visnapuu *et al.*, 2011).

Selles töös seati eesmärgiks analüüsida Lsc3 valgu N-terminaalset piirkonda, valides sealt välja levaansukraasides konserveerunud positsioone muteerimiseks ja kontrollida ennustuse paikapidavust vastavate valgumutantide konstrueerimise ja analüüsiga. Tuginedes kirjanduse andmetele teiste bakterite levaansukraaside kohta ning levaansukraaside järjestuste võrdlemisele (vt. Joonis 3) valiti muteerimiseks välja mõned aminohappeid Lsc3 valgu piirkonnast 109-236 ah.

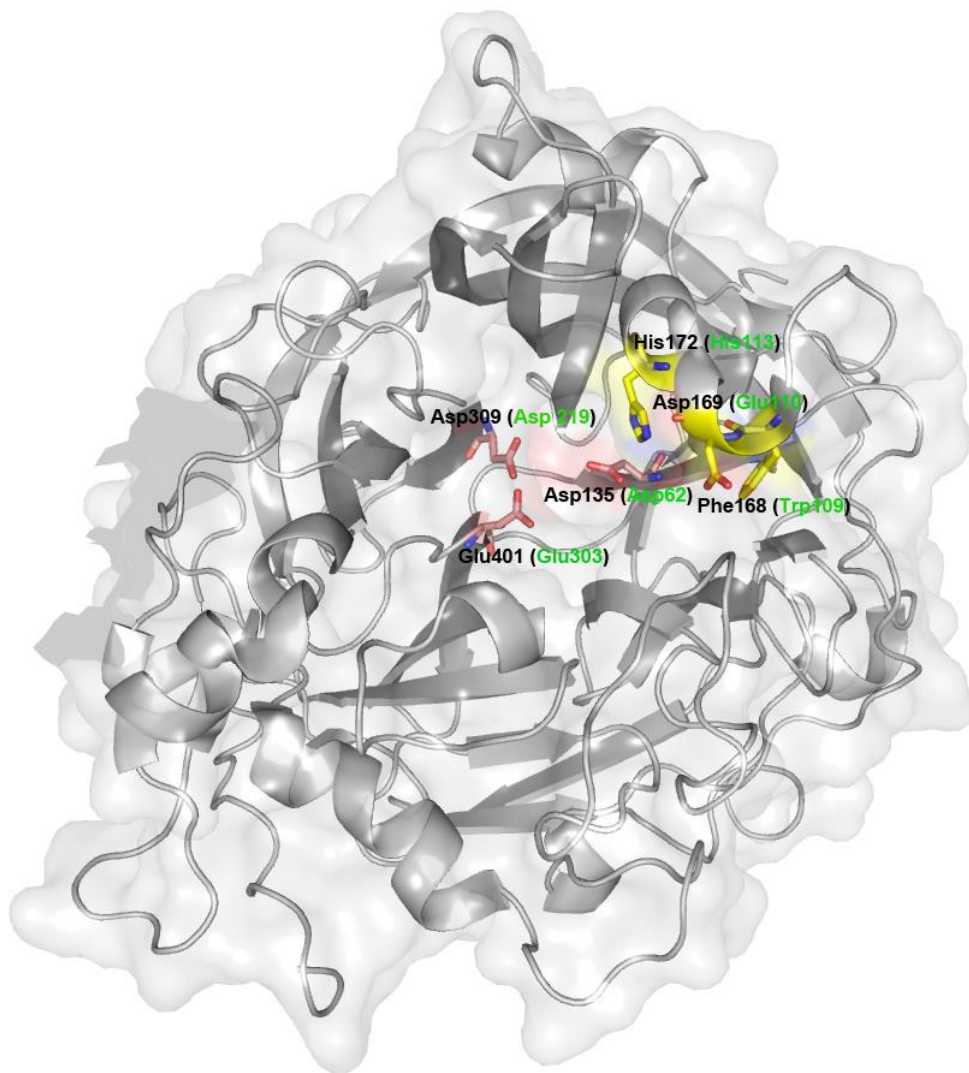
Levaasukraaside järjestuste võrdlemiseks joondati 12 levaansukraasi valgujärjestust programmiga ClustalW (vt. pt. 2.2.8). Joondusesse võeti praeguse seisuga kristalliseeritud levaansukraasid: *G. diazotrophicus*'e LsdA, *B. megaterium*'i SacB, *B. subtilis*'e SacB, *Arthrobacter* sp. K-1  $\beta$ -fructofuranosidaas, põhjalikumalt mutatsioonanalüüsiga iseloomustatud *Z. mobilis*'e LevU ja mõned näited erinevate bakterite ja arhede levaansukraasidest (Joonis 3). Vaatamata sellele, et valkude pikkused on erinevad (vt. Lisa 1), joonduvad nad uuritavas piirkonnas omavahel üldiselt hästi ja joonistuvad välja konserveerunud alad (Joonis 3).

	Pikkus (ah)	Region 1	Region 2	Region 3
Q88BN6_Lsc3	431	106 KRDWEDRHGR 115	142 PTTRWAGT 150	229 GKLYM VFEGN 238
Q8VW87_A.sp.K-1	578	142 ---FDDRHFV 149	194 SHQTQWSSGS 202	293 GETFM VFEGN 302
Q93FU9_P.aurantiaca	424	97 TRDWDRHGR 106	133 PTAREWAGT 141	220 GKLYM LFEGN 229
Q43998_G.diazotrophicus	584	166 -YGFDRHVH 174	219 TNQAEWSSGS 227	320 GVNVM VFEGN 329
Q46654_E.amylovora	415	90 TRDWEDRHGR 99	126 PTTREWAGT 134	213 GKLYM LFEGN 222
O54435_R.aquatilis	415	90 TSDWNRHGR 99	126 PTSREWAGT 134	213 GKLYM VFEGN 222
Q60114_Z.mobilis	423	78 KYGWHNRNDG 86	113 PRSWEWSSGC 121	204 GKTYA LFEGN 213
58039338_G.oxydans	436	86 VEGWHSRNNY 95	124 SRSWEWSSGC 132	215 NQIYA LFEGN 224
300710312_H.jeotgali	428	78 ---PGKRHDV 84	111 -GSROWAGS 118	207 GKTYL LFEGN 216
Q5V249_H.marismortui	445	86 ---PGKRHDV 90	115 LGQRWAGS 123	211 GETWL LFEGN 220
D5DC07_B.megaterium	484	126 -----ND 128	167 NQTQEWSSGS 175	265 GHKYL VFEGN 274
P05655_B.subtilis	473	117 -----DD 119	158 DOTQEWSSGS 166	255 GHKYL VFEGN 264

**Joonis 3.** *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgu joondus *Arthrobacter* sp. K-1, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*'e, *Erwinia amylovora*, *Rahnella aquatilis*'e, *Zymomonas mobilis*'e, *Gluconacetobacter oxydans*'i, *Haloalkalicoccus jeotgali*, *Haloarcula marismortui*, *Bacillus megaterium*'i ja *Bacillus subtilis*'e levaansukraasidega. Rohelisega on tähistatud käesoleva töö raames uuritud mutandid. Joonduse tegemisel ja visualiseerimisel on kasutatud programmi BioEdit (Hall, 1999).

Lisa 1 näitab, et levaansukraaside N-terminaalses osas on mitmeid konserveerunud järjestuste blokke. N-terminaalse motiivi 27-WSRADAL-33 Asp31 muteerimine asparagiiniks alandas näiteks Lsc3 valgu termostabiilsust, kuid ei mõjutanud oluliselt tema katalüüsi. Samasuguse mõjuga oli ka Thr41 asendamine isoleutsiiniga. Nii Asp31 kui ka Thr41 jäävad ennustuse kohaselt valgu aktiivsentrast kaugele (Mardo, 2011). Varem on meie grupis uuritud ka Lsc3 valgus nukleofiili Asp62 sisaldavas konserveerunud järjestusemotiivis paiknevaid aminohappeid -Trp61, Thr63 and Leu66 (vt joondust Lisas 1). Nende aminohapete asendamine näitas, et Trp61 on Lsc3 katalüüsis väga oluline, kuid Thr63 ja Leu66 muteerimine avaldas suhteliselt nõrka mõju (Mardo *et al.*, ilmumas). *Z. mobilis*'e valgus on uuritud mutatsioonide mõju positsioonidele Trp80, Glu117 ja Glu211 (Yanase *et al.*, 2002), mis vastavad Lsc3 valgu positsioonidele Trp109, Glu146 ja Glu236. Mutant Trp80Arg saadi juhusliku mutageneesiga, mutandid Glu117Gln ja Glu211Gln tehti koht-suunatult. Tulemused näitasid, et Glu211Gln mutandi puhul oli

transfruktosüüliv aktiivsus oluliselt langenud, aga Glu117Gln puhul suurenenud võrreldes muteerimata valguga. Seega võivad need positsioonid olla olulised polümerisatsiooni läbiviimisel. Mutandil Trp80Arg oli transfruktosüüliv aktiivsus ligikaudu sama nagu algsel ensüümil, kuid ta ei sünteesinud enam polümeerset levaani (Yanase *et al.*, 2002). Meie grupis varem tehtud mutandil His113Gln oli polümerisatsiooni aktiivsus vähenenud (Mardo, 2011). Positsioonid Trp109, Glu110 ja His113 paiknevad ennustuse järgi aktiivtsentri lähedal ja sellepärast võivad olla tähtsad katalüüsile.



**Joonis 4.** Visualiseeritud *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi kristallstruktuur, kus katalüütilise kolmiku aminohapped on tähistatud roosa ja uuritavate aminohapete homologsused positsioonid kollase värviga. Rohelisega on tähistatud vastavad positsioonid Lsc3 valgus. Joonis: K. Mardo.

### 2.3.2 Levaansukraasi Lsc3 mutantide konstrueerimine ja mutantsete valkude puhastamine ning analüüs

Valitud Lsc3 positsioonidesse tekitati mutatsioonid PCR-põhise meetodiga koht-suunatult (Wei *et al.*, 2004) ning kloneeriti muteeritud *lsc3* geenid pURI3 vektorisse (pt. 2.2.2). Vastavateks asendusteks olid: Trp109Ala, Glu110Asp, His113Ala, Glu146Gln, Glu236Gln. Trp109 ja His113 muudetialaniiniks, mis on väike hüdrofoobne aminohape ning selletõttu erinev suure külghelaga hüdrofoobsest trüptofaanist ja positiivselt laetud histidiinist. Kui antud positsioonid on valgu aktiivsuseks olulised, siis asendusalaniiniga võiks seda ka näidata. Glutamaat positsioonis 110 asendati aspartaadiga. Need negatiivselt laetud aminohapped on omadustelt ja külghela suuruselt sarnased. Homoloogses positsioonis on *Z. mobilis*'e levaansukraasis aspartaat ja sisseviidud mutatsioon võiks Lsc3 valgu muuta sarnasemaks sellele ensüümile (Joonis 3). Glu146 ja Glu236 muudeti glutamiiniks, võttes eeskujuks vastavaid mutatsioone *Z. mobilis*'e valgus, mis vaatamata asenduseks kasutatud aminohapete sarnasusele mõjutasid oluliselt ensüümi polümerisatsioonivõimet (Yanase *et al.*, 2002).

Mutantseid levaansukraase ekspresseeriti *E. coli* BL21(DE3) tüves, kasutades konstrueeritud plasmide pURI-lsc3W109A, pURI-lsc3E110D, pURI-lsc3H113A, pURI-lsc3E146Q, pURI-lsc3E236Q, kus *lsc3* geen on T7 promootori kontrolli all. Kõik levaansukraasid ekspresseerusid hästi ning IPTG-ga indutseeritud bakterikultuuri rakuekstraktis sisaldus suurel hulgal levaansukraasi (vt. Joonis 5).

Transformantide rakud sadestati, purustati ning eraldati rakulüsaat, mida kasutati mutantsete levaansukraaside puhastamiseks Ni<sup>2+</sup>-afiinsuskromatograafiaga (pt. 2.2.4). Selleks, et esialgselt hinnata levaansukraasi olemasolu ja mutatsiooni mõju, määrati rakulüsaatidest levaansukraasi koguaktiivsus glükoosi tekke järgi. Substraadina kasutati 100 mM sahharoosi (Tabel 2). Mutantidel Trp109Ala, His113Ala, Glu236Gln oli koguaktiivsus mitu korda langenud, mis viitab nende mutatsioonide suurele mõjule levaansukraasi katalüüsile või valgu ekspressioonitaseme vähenemisele. Mutandil Glu110Asp oli koguaktiivsus võrreldes muteerimata valguga tõusnud ligi 2 korda, mis võib peegeldada head ekspressiooni või mutatsiooni positiivset mõju substraadi seondumisele ja koguaktiivsusele (Tabel 2).

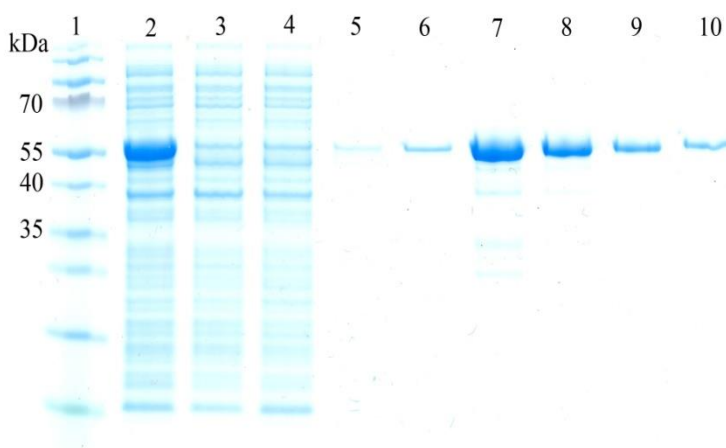
Selleks, et lähemalt uurida vastavate mutatsioonide mõju valgu erinevatele parameetritele, mutantsete valgud puhastati N-terminuses paikneva His<sub>6</sub>-järjestuse abil, mis seondub Ni<sup>2+</sup>-agarooskandjaga (pt. 2.2.4). Valgud elueeriti HisTrap kolonnist imidasooli sisaldava puhvriga

ning fraktsioonid koguti. Levaansukraasi olemasolu ja puhtuse kontrolliks kasutati SDS-polüakrüülamiidgeeli, millele kanti rakuekstrakt ja kromatograafial saadud fraktsioonide proovid. Joonisel 5 on näitena toodud Lsc3 mutandi E146Q puhastamise käigus saadud lüsaat ja fraktsioonid. Levaansukraasi sisaldavad fraktsioonid (rajad 6-10 Joonisel 5) segati kokku ning segu dialüüsiti McIlvaine'i puhvris (pH 6.0), et vabaneda imidasoolist.

**Tabel 2.** Levaansukraasi eriaktiivsus (U/mg) ja mõõtmiste standardhälve levaansukraase ekspresseeriva *Escherichia coli* rakulüsaatides.

Plasmiid	Koguaktiivsus (U/mg)	Säilinud koguaktiivsus (%)
pURI-lsc3	157.7 ± 8.2	100
pURI3-lsc3W109A	23.4 ± 0.9	14.8
pURI3-lsc3E110D	367.4 ± 10.8	232.9
pURI3-lsc3H113A	39.6 ± 1.0	25.1
pURI3-lsc3E146Q	130.3 ± 7.4	82.6
pURI3-lsc3E236Q	27.5 ± 2.8	17.4

Sahharoosi sisaldus reaktsioonisegus oli 100 mM. Tabelis on näidatud kahe eksperimendi tulemused.



**Joonis 5.** SDS-PAGE-l saadud geelipilt Lsc3 mutantse valgust E146Q puhastamise etappidest. Esimesel rajal on valgu suurusmarker PageRuler™ SM0671 (Femantas, Leedu). Teisele rajale kanti rakulüsaat (1 µl). Radadele 3-10 kanti fraktsioonid: 2, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 15 (1 µl). Radadel 6-10 on nähtav ~50 kDa suurune levaansukraasi valk, mis imidasooli kontsentratsiooni suurendamisel (500 mM) on kolonnist elueerunud.

### 2.3.2.1 Mutantide substraadispetsiifika ja kineetilised parameetrid

Levaansukraas Lsc3 kasutab substraadina ja fruktosüüli doonorina eelistatult sahharoosi, kuid oleme näidanud, et ka rafinoos (GalGF) ja stahhüoos (Gal<sub>2</sub>GF) on ensüümile substraadiks. Kui

afiinsus sahharoosile on ~20 mM, siis teiste substraatide seondumine on ligi kaks korda väiksema afiinsusega. Seda peegeldab protsentuaalselt esitatud rafinoosi ja sahharoosi eriaktiivsuste suhe, mis metsiktüüpi Lsc3 valgul on 48% (Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2011).

Puhastatud mutantsetel valkudel hinnati sahharoosi ja rafinoosi kasutamist. Selleks määrati redutseerivate suhkrute tekke kiirust 400 mM substraadist. Sahharoosist moodustub levaansukraasi reaktsiooni käigus glükoos ja fruktoos ning rafinoosist fruktoos ja melibioos. Kõik need produktid on redutseerivad suhkrud, aga ükski substraatidest seda ei ole. Saadud tulemused on toodud Tabelis 3. Substraadispetsiifika on muutunud mutantidel Trp109Ala ja His113Gln, erinevalt muteerimata valgust kasutavad need mutandid mõlemat substraati võrdse kiirusega. See võib olla seletatav sellega, et mutantidel on paranenud rafinoosi seondumisega levaansukraasi doonorsaiti. Siiski on mõlema mutandi puhul eriaktiivsuse absoluutväärtused oluliselt langenud, mis näitab üldist katalüüsivõime vähenemist. Glu236Gln näitas rafinoosiga väga madalat aktiivsust. Mutant Glu146Gln oli rafinoosi ja sahharoosi kasutamise suhte poolest sarnane algse Lsc3 valguga.

*Z. mobilis*'e levaansukraas LevU kasutab rafinoosi 17% paremini kui sahharoosi ning erineb seega oluliselt Lsc3 levaansukraasist. Stahhüoosi kasutamise osakaal on *Z. mobilis*'e levaansukraasil sahharoosiga võrreldes samasugune (Yanase *et al.*, 2002; Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2011). Kui LevU valgus Trp80 (vastab Trp109-le Lsc3 valgus) muteeriti arginiiniks, siis tema rafinoosi kasutamine mõningal määral (10%) vähenes. Sarnane tulemus saadi ka Lsc3 mutandi Trp109Arg puhul, kus rafinoosi kasutamine vähenes oluliselt (48%-lt 23%-le) ning afiinsus rafinoosile alanes drastiliselt, üle 10 korra (T. Visnapuu, avaldamata andmed). See näitab, et Trp109 on Lsc3 valgus substraadi seondumiseks oluline ning selles positsioonis on vajalik just hüdrofoobne aminohape, sest positiivselt laetud arginiin selles positsioonis vähendas lisaks substraadi kasutamisele ka levaansukraasi reaktiivsust.

*Z. mobilis*'e levaansukraasi mutantidel Glu117Gln ja Glu211Gln oli muutunud rafinoosi ja stahhüoosi kasutamine. Glu117Glu mutandil oli rafinoosi kasutamine vähenenud 43% võrra ja Glu211Gln mutandil oli lisaks rafinoosi kasutamise vähenemisele stahhüoosi kasutamine oluliselt suurenenud (88% võrra) (Yanase *et al.*, 2002). Lsc3 valgu puhul mõjutas substraadispetsiifikat ja rafinoosi spetsiifilist seondumist oluliselt Glu236 (vastab Glu211-le LevU valgus) muteerimine.

**Tabel 3.** Lsc3 sahharoosi ja rafinoosi kasutajana.

Valk	Eriaktiivsus sahharoosiga (U/mg)	Eriaktiivsus rafinoosiga (U/mg)	Rafinoosi ja sahharoosi kasutamise suhe (%)
Lsc3 wt	866.1 ± 11.4	425.3 ± 8.6	47.8 ± 4.1
Trp109Ala	42.0 ± 3.3	52.6 ± 2.8	125.2 ± 16.5
Glu110Asp	970.3 ± 9.9	359.5 ± 0.1	37.0 ± 0.4
His113Ala	278.3 ± 1.3	313.9 ± 3.7	112.8 ± 1.9
Glu146Gln	817.3 ± 3.9	397.0 ± 29.1	48.6 ± 3.2
Glu236Gln	284.0 ± 39.5	16.8 ± 0.7	5.9 ± 0.6

Mõlema substraadi kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 400 mM. Reaktsiooni kiirus määrati redutseerivate suhkrute tekke järgi DNS reaktiiviga.

Mutantsete valkude kineetiliste parameetrite väljaselgitamiseks mõõdeti substraadi lõhustamise reaktsiooni algkiirusi erinevatel substraadi (sahharoos ja rafinoos) kontsentratsioonidel ning arvutati maksimaalne reaktsioonikiirus ( $V_{max}$ ; U/mg) ja afiinsus substraadile ( $K_m$ ; mM). Kui substraadiks oli sahharoos, siis mõõdeti reaktsiooni kineetikat glükoosi eraldumise järgi sahharoosist, kasutades Glucose Liquicolor'i reaktiivivi. Kui substraadiks oli rafinoos, siis mõõdeti redutseerivate suhkrute moodustumist. Ensüümi kineetiliste parameetrite arvutamiseks kasutati programmi SigmaPlot (pt. 2.2.6). Kineetilised parameetrid on toodud Tabelis 4 ja Michaelis-Menten'i ja Eadie-Hofstee graafikud reaktsioonikineetika kohta on toodud Lisas 2. Katalüütilise konstandi  $k_{cat}$  (1/min) arvutamisel võeti arvesse levaansukraasi maksimaalkiirus ja ensüümi arvutuslik molekulmass. Katalüüsi efektiivsus  $k_{cat}/K_m$  (1/M x min) saadi vastavate väärtuste jagatisena.

Tabelist 4 on näha, et muteerimata Lsc3 valgu afiinsus sahharoosi suhtes on ligikaudu kaks korda suurem kui rafinoosile. Mutandid Trp109Ala, Glu110Asp ja Glu146Gln eelistavad endiselt substraadina sahharoosi, aga sahharoosi ja rafinoosi afiinsuste suhe oli muutunud. Trp109Ala mutandil (Joonis 7) on afiinsus rafinoosile üle 3 korra langenud, samas kui sahharoos seondus endiselt hästi. Seevastu Trp109Arg mutandi afiinsus sahharoosile oli suurel määral langenud (~4

korda) ning  $k_{cat}$  väärtus oli üle 30 korra väiksem kui Lsc3 metsiktüüpi valgul (T. Visnapuu, avaldamata andmed). Väikest afiinsuse (1.5 korda) ja katalüütilise efektiivsuse (2.5 korda) langust oli näha ka *Z. mobilis*'e levaansukraasi Trp80Arg mutandil, kuid võrreldes vastava Lsc3 mutandiga oli mõju oluliselt väiksem (Yanase *et al.*, 2002).

**Tabel 4.** Puhastatud levaansukraaside kineetilised parameetrid: afiinsus sahharoosile ja rafinoosile ( $K_m$ ), maksimaalne reaktsioonikiirus ( $V_{max}$ ), katalüütiline konstant ( $k_{cat}$ ; 1/min) ja katalüütiline efektiivsus ( $k_{cat}/K_m$ ; 1/M x min). Võrdluseks toodud muteerimata Lsc3 wt valgu andmed on saadud T. Visnapuult.

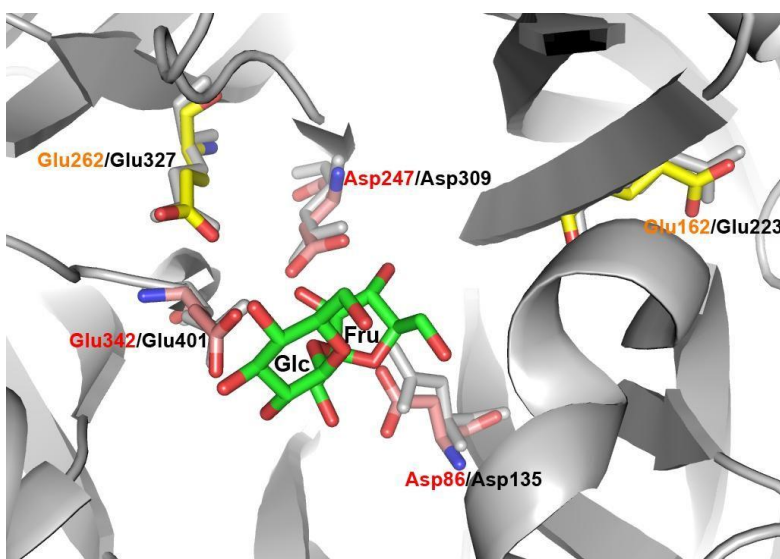
Valk	SAHHAROOS				RAFINOOS
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg)	$k_{cat}$ (1/min)	$k_{cat}/K_m$ (1/M x min)	$K_m$ (mM)
Lsc3 wt	18.5 ± 2.5	610.5 ± 82.0	3.03x10 <sup>4</sup>	16.36x10 <sup>5</sup>	44.8 ± 3.4
Lsc3 Trp109Ala	29.8 ± 3.3	30.2 ± 0.81	0.15x10 <sup>4</sup>	5.03x10 <sup>5</sup>	146.4 ± 44.9
Lsc3 Glu110Asp	57.0 ± 9.7	633.2 ± 33.2	3.15x10 <sup>4</sup>	5.53x10 <sup>5</sup>	80.7 ± 13.1
Lsc3 His113Ala	170.4 ± 17.0	192.2 ± 6.4	0.96x10 <sup>4</sup>	0.56x10 <sup>5</sup>	113.2 ± 13.1
Lsc3 Glu146Gln	43.8 ± 3.3	583.6 ± 12.6	2.91x10 <sup>4</sup>	6.64x10 <sup>5</sup>	53.8 ± 9.7
Lsc3 Glu236Gln	146.8 ± 23.7	163.5 ± 11.0	0.81x10 <sup>4</sup>	0.55x10 <sup>5</sup>	66.5 ± 7.7

Mutant Glu146Gln oli küll katalüütiliselt aktiivne, kuid tema afiinsus sahharoosil oli ligi 2 korda langenud. *Z. mobilis*'e levaansukraasi homoloogse positsiooni mutandil Glu117Gln oli afiinsus sahharoosile langenud rohkem – 4 korda (Yanase *et al.*, 2002). Võrreldes *Z. mobilis*'e levaansukraasi Glu117Gln mutandiga oli Lsc3 Glu146Gln mutandi katalüütiline efektiivsus kaks korda kõrgem. Kristalliseeritud levaansukraaside struktuuride võrdluse ja analüüsi järgi asub Lsc3 valgu Glu146-le (Glu162 *B. subtilis*'e levaansukraasil) vastav positsioon nende valkude aktiivtsentrist veidi eemal ning vastava glutamaadi külghel on suunatud aktiivtsentrist eemale (Joonis 6). See võibki seletada Glu146Gln mutatsiooni tagasihoidlikku mõju katalüüsile.

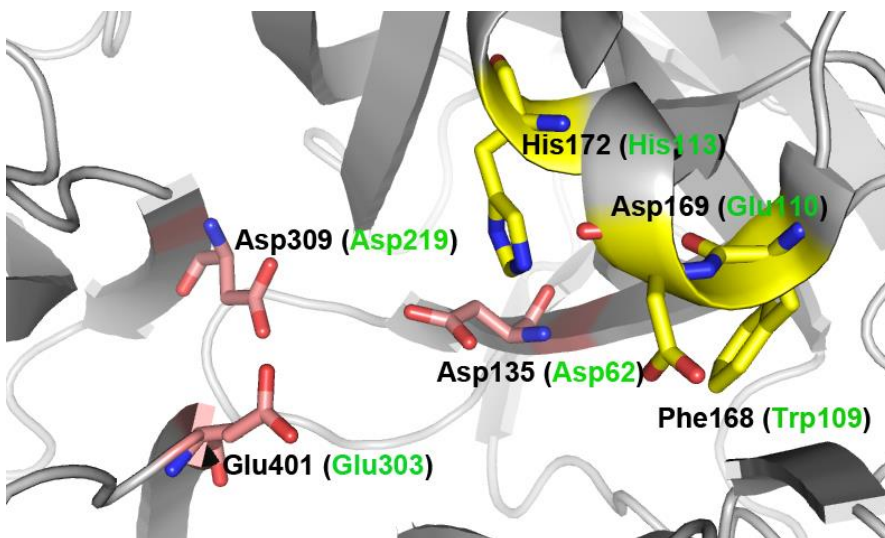
His113Ala ja Glu236Gln puhul on substraadieelistus pigem vastupidine ja afiinsus rafinoosile on suurem kui sahharoosile (Tabel 4). Mutandil Glu236Gln on  $K_m$  rafinoosi suhtes on 4 korda väiksem kui  $K_m$  sahharoosile. Siiski näitas eriaktiivsuste määramine, et rafinoosi kasutatakse tunduvalt aeglasemalt (Tabel 3). Seega arvame, et Glu236Gln mutandi puhul on häiritud mitte rafinoosi seostumine aktiivtsentrisse, vaid edasine reaktsioon. Sahharoos seondub küll tunduvalt

halvemini (afiinsus 14 korda langenud) kui algse valgu puhul, kuid mutandil on säilinud kolmandiku ulatuses sahharoosi lõhustav aktiivsus (Tabel 4). Sarnast tendentsi oli näha ka *Z. mobilis*'e levaansukraasi vastaval mutandil, kus afiinsus sahharoosile oli langenud 6 korda (Yanase *et al.*, 2002). Vastavalt kristallstruktuuridele asub Glu236 homoloog *B. subtilis*'e (Glu262) ja *G. diazotrophicus*'e (Glu327) valkudes aktiivtsentri vahetus läheduses ja võiks kuuluda substraadi seondumistaskusse (Joonis 6). Lsc3 mutandil His113Ala oli afiinsus rafinoosile 1.5 korda kõrgem kui sahharoosile ning sarnane tulemus saadi ka sahharoosi ja rafinoosi kasutamise suhte määramisel (Tabel 3). His113Ala katalüütiline efektiivsus oli 4 korda suurem kui mutandil His113Gln (Mardo, 2011). His172 (vastab His113-le Lsc3 valgus) asub *G. diazotrophicus*'e levaansukraasis nukleofiili (Asp135) vahetus läheduses (Joonis 7) ning vastavalt meie tulemustele on see positsioon väga oluline sahharoosi sidumises ja levaansukraasi reaktsiooni toimumises (Mardo, 2011).

Maksimaalse reaktsioonikiiruse ja katalüütilise efektiivsuse järgi olid kõige sarnasemad muteerimata Lsc3-le mutandid Glu110Asp ja Glu146Gln.



**Joonis 6.** Kohakuti asetatud *G. diazotrophicus*'e (hall) ja *B. subtilis*'e (roosa või kollane) levaansukraaside substraadi seostumistaskud. Eraldi on välja toodud nukleofiil (vastavalt Asp135 ja Asp86), vaheühendi stabiliseerija (Asp309 ja Asp247), alus-hape katalüüsija (Glu401 ja Glu342) ning koos *B. subtilis*'e levaansukraasiga kristalliseeritud sahharoosi molekul. Lsc3 Glu146 ja Glu236 vastavad aminohapped (vastavalt Glu162 ja Glu262) on *B. subtilis*'e mudelil märgitud kollase värviga. Struktuurid visualiseeris K. Mardo.



**Joonis 7.** *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi aktiivtsenter, kus katalüütilise kolmiku aminohapped on tähistatud roosa ja selles töös uuritud aminohapetele homoloogsed positsioonid kollase värviga. Rohelisega on tähistatud vastavad positsioonid Lsc3 valgus. Struktuuri visualiseeris K. Mardo.

### 2.3.2.2 Polümerisatsiooniproductide teke

Polümeriseeritava ehk transfruktosüleeriva aktiivsuse määramiseks tehti reaktsioonisegu, mis sisaldas 2.7 U/ml puhastatud levaansukraasi ja 1.2 M sahharoosi McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) ning reaktsioonil lasti temperatuuril 37°C toimuda 20 h. Seejärel valk inaktiveeriti kuumutamise ja proovid saadeti kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) meetodil analüüsimeks meie koostööpartnerile Heiki Vijale (KBFI, Tallinn). Segust määrati fruktoosi, glükoosi, FOS-ide ja jääksahharoosi sisaldus. Detailsem meetodika on toodud Lisas 3. Polümeriseeriv aktiivsus väljendati protsentides glükoosi ja fruktoosi sisalduse vahe kaudu, mis näitab kui suur osa reageerinud sahharoosis sisaldunud fruktoosist reaktsiooni käigus polümeriseeritakse. Tulemused on esitatud Tabelis 5.

**Tabel 5.** Puhastatud levaansukraaside polümeriseeriv aktiivsus (TA) protsentides.

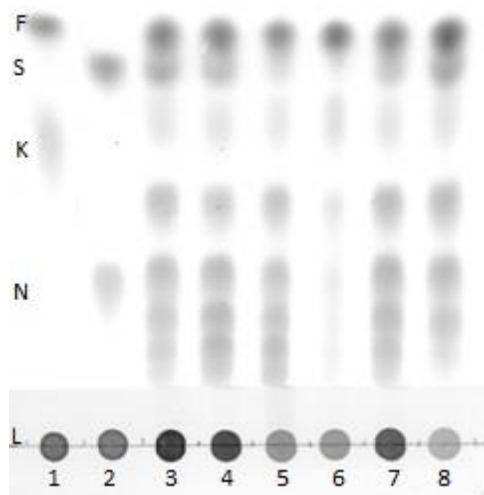
Valk	WT	Trp109Ala	Glu110Asp	His113Ala	Glu146Gln	Glu236Gln
Polümeriseeriv aktiivsus (%)	73.6 ± 0.9	76.9 ± 1.3	69.8 ± 1.3	38.1 ± 4.5	75.5 ± 1.1	50.0 ± 3.8

Muteerimata Lsc3 valgu polümeriseeriva aktiivsuse oli eelnevalt määranud T. Visnapuu.

Tabelis 5 esitatud tulemustest on näha, et mutantide Trp109Ala, Glu110Asp ja Glu146Gln TA on muteerimata valgule sarnane. His113Ala ja Glu236Gln mutandi puhul oli polümeriseeriv aktiivsus vastavalt 35% ja 24% võrra langenud. See näitab, et need mutandid on Lsc3 metsiktüüpi valgust oluliselt hüdrolüütilisemad st. suurem osa valguga reageerinud sahharoosist pärinevatest fruktoosijääkidest kantakse veele. Oluliselt hüdrolüütilisem oli ka *Z. mobilis*'e levaansukraasi mutant Glu211Gln (vastab Lsc3 Glu236Gln-le), mille transfruktosüüliv aktiivsus oli 65%-lt langenud 11%-ni. LevU Gln117Gln mutandile (vastab Lsc3 Glu146Gln-le) sarnast TA väärtuse tõusu (Yanase *et al.*, 2002) me oma eksperimentides Lsc3 valgu homoloogse mutandi Glu146Gln puhul ei detekteerinud.

Selleks, et teada saada, millised polümerisatsiooniproduktid mutantide reaktsioonis tekivad, kanti reaktsioonisegud silikageelplaatidele ja neid analüüsiti õhukese kihi kromatograafiaga (Joonis 8). Teame, et muteerimata levaansukraas toodab palju levaani, aga sellele lisaks ka lühemaid polümerisatsiooniprodukte (Joonis 8) (Visnapuu *et al.*, 2009). Võrreldes algse valguga oli stardijoonele jäävad polümeerse levaani laigud heledamad mutantide Glu110Asp, His113Ala ja Glu236Gln puhul, mis võiks näidata vähenenud levaani tootmist. His113Ala mutandil oli oluliselt vähenenud lühemate polümerisatsiooniproduktide tootmine. Teistel mutantidel suurt erinevust FOS-ide spektris TLC analüüsil näha ei olnud.

Reaktsioonisegude koostist analüüsiti ka HPLC-ga Heiki Vija poolt. Tulemused on esitatud tabelis 6.



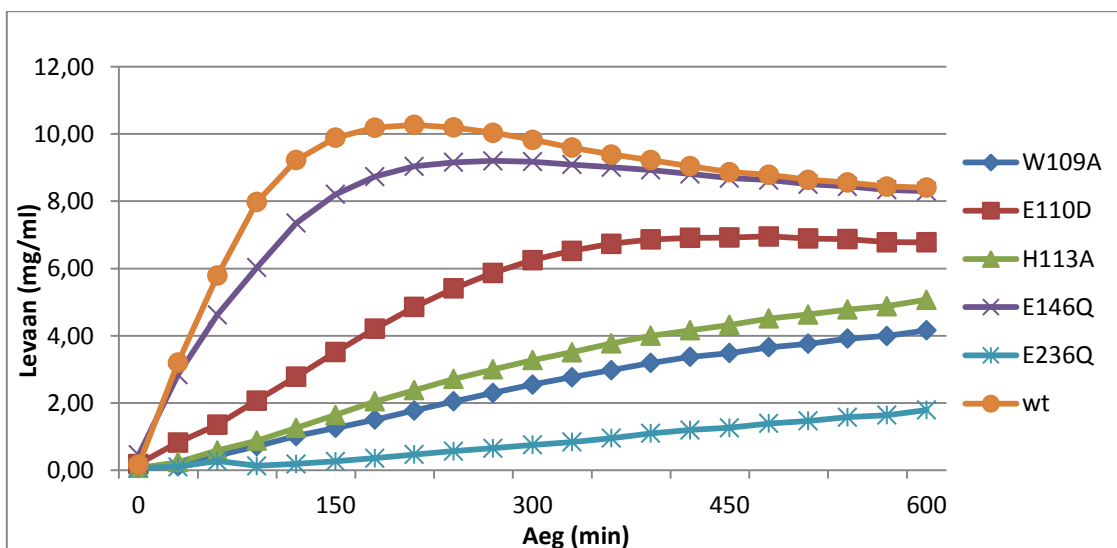
**Joonis 8.** Algse ja muteeritud levaansukraaside reaktsioonisegude analüüs õhukese kihi kromatograafiaga. Sahharoosi sisaldus reaktsioonisegus oli 1.2 M. 0.5 µl eelnevalt 4 korda lahjendatud reaktsioonisegu kanti silikageelplaadi stardijoonele. Radadel 1 ja 2 on markersuhkrud: 0.7% levaan (L), 8 mM nüstose (N; PA 4), 8 mM 1-kestose (K; PA 3), 30 mM sahharoos (S; PA 2) ja 30 mM fruktoos (F). Kolmandal rajal on metsiktüüpi Lsc3 reaktsioonisegu. Rajad: 4. Trp109Ala; 5. Glu110Asp; 6. His113Ala; 7. Glu146Gln ja 8. Glu236Gln.

**Tabel 6.** Levaansukraaside reaktsiooniproductide HPLC-analüüsi tulemused.

<b>Proov</b>	<b>FOS (PA)</b>	<b>FOS (mg/ml)</b>	<b>FOS (g/mg valgu kohta)</b>	<b>Jääksahharoos (mg/ml)</b>
<b>Lsc3 wt</b>	3-7	104.5 ± 8.1	15.4 ± 2.2	37.0 ± 6.4
<b>Trp109Ala</b>	3-7	98.0 ± 5.4	0.9 ± 0.05	36.4 ± 0.1
<b>Glu110Asp</b>	3-7	113.4 ± 16.6	13.8 ± 2.0	25.0 ± 2.3
<b>His113Ala</b>	3-6	49.9 ± 10.6	1.3 ± 0.3	18.1 ± 3.3
<b>Glu146Gln</b>	3-6	112.1 ± 3.9	16.7 ± 0.6	35.3 ± 1.9
<b>Glu236Gln</b>	3-6	91.4 ± 9.6	2.7 ± 0.3	53.7 ± 4.3

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

Tabel 6 näitab, et FOS-ide kogus, mis sünteesiti 1 mg valgu kohta, oli enim langenud mutantidel Trp109Ala, His113Ala ning Glu236Gln. Neist mutantidest oli ka FOS-ide spekter muutunud mutantidel His133Ala ja Glu236Gln, mis sünteesisid FOS-e kuni polümerisatsiooniastmeni 6, muteerimata valk sünteesis seitsme suhkrujäägi pikkusi FOS-e. FOS-ide sünteesi poolest sarnanesid algse valguga kõige enam mutandid Glu110Asp ja Glu146Gln. Reaktsiooni käigus saab levaani moodustumist jälgida spektrofotomeetriliselt, sest polümeerne levaan moodustab hägusa suspensiooni ning optilise tiheduse muutust ajas saab registreerida kas spektrofotomeetri küvetis või mikrotiiterplaadil. Mõõtsime levani teket mikrotiiterplaadil iga poole tunni tagant erinevatel sahharoosi kontsentratsioonidel (150, 300, 600, 1200 mM). Puhastatud polümeerse levaani kaliibri alusel arvutati optilise tiheduse järgi proovides levaanisisaldused (Joonis 9; Lisa 4). Joonisel 9 on näidatud levaani sünteesi kineetika mutantidel ja algsel valgul 300 ja 600 mM sahharoosist.



**Joonis 9.** Levaani teke (mg/ml) sahharoosi kontsentratsioonil 600 mM 10 h jooksul. Reaktsioonisegu sisaldas McIlvaine'i puhvrit, sahharoosi ja 10 µg/ml puhastatud levaansukraasi ning reaktsioon toimus temperatuuril 30°C. Levaani teket mõõdeti lainepikkusel 400 nm.

Joonis 9 näitab, et muteerimata Lsc3 sünteesib testitud tingimustel sahharoosist levaani maksimaalselt 10,3 mg/ml (maksimum saabub 600 mM sahharoosi puhul 210 minutiga). Levaani sünteesi poolest on metsiktüüpi valguga kõige sarnasem mutant Glu146Gln, mis toodab levaani maksimaalselt 9,2 mg/ml (maksimum saabub 600 mM sahharoosi puhul 270 minutiga). Kõige suuremat erinevust algsest valgust näitasid levaani sünteesil mutandid Trp109Ala, His113Ala ja Glu236Gln. Viimane sünteesis levaani väga vähe ja väga aeglaselt. 1200 minuti (20 h) jooksul sünteesiti levaani kõigest 2,6 mg/ml. Graafikute alusel võib öelda, et levaani sünteesiks on optimaalne sahharoosi kontsentratsioon 600 mM, sest peale ühe mutandi (Trp109Ala), kellel selleks oli 300 mM, tootsid kõik mutandid kõige rohkem levaani just 600 mM sahharoosist (Joonis 9; Lisa 4).

## KOKKUVÕTE

Levaansukraasid on bakteriaalsed ekstratsellulaarsed ensüümid, mis kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside perekonda 68. Levaansukraasid katalüüsivad fruktoosijäägi ülekannet sahharoosilt ja ka mõnelt teiselt substraadilt erinevatele aktseptoritele, sünteesides fruktooligosahhariide ja polümeerset levaani. Levaansukraase on leitud nii grampositiivsetest kui ka -negatiivsetest bakteritest. Levaansukraaside valgujärjestused ja pikkused on erinevad, aga neis on mitmeid konserveerunud motiive. Kristallstruktuuride andmetel on levaansukraasil viielabalise  $\beta$ -propelleri struktuur, molekuli keskel on negatiivselt laetud tasku, kuhu seondub substraat. Aktiivtsentris paiknevad ka katalüüsiks vajalikud aminohapped – katalüütiline kolmik, kuhu kuuluvad kaks aspartaati ja glutamaat.

Levaansukraasi uuringud on olulised, sest selle ensüümi reaktsiooniproductid on bioloogilise aktiivsusega ja leiaksid rakendusi tööstuses, meditsiinis ja biotehnoloogias. Fruktanid toimivad prebiootiliselt bifidobakteritele ja laktobatsillidele.

Antud töös keskenduti *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi Lsc3 muteerimisele kohtsuunatult ja vastavate mutantide analüüsile, et teha kindlaks, millised aminohapped valgu N-terminaalses alas võiksid olla olulised substraadivalikus ja transfruktosüülimisreaktsioonis.

### Töö põhitulemused olid järgmised:

1. *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgu piirkonna 109-236 aminohapete muteerimisel tuvastati mitmeid katalüütiliselt olulisi positsioone.
2. Kõige enam mõjutas Lsc3 katalüütilisi omadusi His113 ja Glu 236 asendamine valgus. Nende positsioonide asendamisel vastavaltalaniini või glutamiiniga langes mutantide katalüütiline efektiivsus sahharoosi lõhustamisel ~30 korda. Need positsioonid on väga olulised ka polümerisatsioonis, kuna vastavate mutantide transfruktosüüliiv aktiivsus oli palju madalam kui algsel valgul ja nad sünteesisid ka vähe FOS-e ja levaani. His113-le homoloogilise positsiooni olulisust levaansukraasi katalüüsis ei ole seni teistes uurimisgruppides näidatud.
3. Levaansukraasi substraadivalikus on olulised positsioonid Trp109, His113 ja Glu236. Trp109 ja His113 on rafinoosi kasutamisel olulisemad kui sahharoosi puhul. Glu236 asendamine mõjutab enam sahharoosi kui rafinoosi kasutamist.

4. Trp109 asendaminealaniiniga vähendab Lsc3 valgu katalüütilist konstanti 20 korda. Mutant Trp109Ala sünteesib selles töös uuritud mutantide hulgast kõige vähem FOS-e (0.9 g) 1 mg valgu kohta ning ka levaani süntees on sellel valgul aeglane.

## **Identification of essential amino acids for polymerase reaction in *Pseudomonas syringae* pv. tomato levansucrase Lsc3 by mutational analysis**

Maria Gromkova

### **SUMMARY**

Levansucrases are bacterial extracellular enzymes belonging to glycoside hydrolase family 68. Levansucrases catalyse the transfer of fructosyl residue from sucrose or another substrate to a variety of acceptors. Spectrum of reaction products is dependent on fructosyl acceptors. Substrate hydrolysis occurs when water is acting as an acceptor, whereas polymerization reaction takes place if sucrose or fructans are transfructosylated. Levansucrases synthesize short-chain fructooligosaccharides (FOS) and polymeric levan. These enzymes are found in both, Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as in archaea. Protein sequences and lengths of various levansucrases are different, but they share several conserved motifs.

Levansucrases have a five-blade  $\beta$ -propeller fold. The central pocket of the enzyme harbors three conserved acidic amino acids, which act as catalytic nucleophile (Asp), transition state stabilizer (Asp) and general acid-base catalyst (Glu).

Study catalytic properties and structure-function relationships of levansucrases is important, because this enzyme synthesizes biologically active products, which can be used in biotechnology, medicine and industry. For example FOS are regarded as prebiotics that stimulate bifidobacteria and lactobacilli in human and animal intestine.

The aim of the study was to predict and experimentally confirm significance of selected N-terminal amino acid positions for the catalysis of Lsc3.

The main results of the study were as following:

1. Many residues potentially important for *P. syringae* pv. tomato levansucrase Lsc3 catalysis were identified using sequence alignments and literature search. Several amino acid positions in region 109-236 of Lsc3 were selected to be site-directedly mutated in the study.
2. Catalytic activity of Lsc3 was affected significantly when positions His113 and Glu236 were substituted with alanine and glutamine, respectively. Catalytic efficiency of the mutants decreased 30 times. Also, these positions were proved to be important for

polymerization reactions, because the mutant proteins had reduced transfructosylation activity. In consequence, these mutants produced only a small amount of FOS and levan.

3. Positions Trp109, His113 and Glu 236 are important for substrate preference of Lsc3. Trp109 is more important for raffinose and Glu326 for sucrose binding and usage. Mutation in His113 affects the usage of both substrates.
4. Mutation of Trp109 causes largely reduced synthesis of FOS and levan, mainly because of significant reduction of its catalytic constant and severe disruption of polymerization reaction.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Alamäe, T., Visnapuu, T., Mardo, K., Mäe, A., Zamfir, A. D. (2012). Levansucrases of *Pseudomonas* bacteria: novel approaches for protein expression, assay of enzymes, fructooligosaccharides and heterooligofructans. Rauter AP, Lindhorst TK (Eds.). Carbohydrate Chemistry 176–191. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry

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.

Batista, F. R., Hernandez, L., Fernandez, J. R., Arrieta, J., Menendez, C., Comez, R., Tambara, Y., Pons, T. (1999). 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. 337: 503-506.

Beine, R., Moraru, R., Nintz, M., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Buchholz, K., Seibel J. (2008). Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. J. Biotechnol. 138: 33-41.

Calazans, G. M. T., Lopes, C. E, Lima, R. M. O. C., de França, F. P. (1997). Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. Biotechnol Lett 19: 19–21.

Chambert, R., Treboul, G., Dedonder, R. (1974). Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 41: 285-300.

Chambert, R., Petit-Glatron, M. F. (1991). Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. Biochem. J. 279: 35-41.

Curiel, J. A., Rivas, B. de Las, Mancheño, J. M., Muñoz, R. (2011). The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. Protein Expr. Purif. 76: 44–53.

DeLano, W. L. (2002). The PyMOL molecular graphics system. California, USA: DeLano Scientific, San Carlos

Del Moral, S., Olvera, C., Rodriguez, M. E, Munguia, A. L. (2008). Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. BMC Biochem 9: 6.

Dahech, I., Belghith, K. S., Hamden, K., Feki, A., Belghith, H., Mejdoub, H., (2011). Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. Int. J. Biol. Macromol. 49: 942–7.

Edelman, J., Jefford, T. G. (1968). The metabolism of fructose polymers in plants. New Phytol. 67: 517-531.

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. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. IFIS.7:1-19.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95-98.

- Han, Y. W. (1990). Production and characterization of microbial levan. *J. Agr. Food Chem.* 38: 393-396.
- Hendry, G. A. F., Wallace, R. K. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans – acclimatological, biogeographical and mechanistic appraisal. *New Phytol.* 123:3–14.
- Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F., Chambert, R. (1995). Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 309: 113-118.
- 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., Bonting, K., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2001). Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 323-328.
- van Hijum, S. A. F. T., van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high molecular weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ. Microb.* 68: 4390-4398.
- van Hijum, S. A. F. T., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2003). Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS letters* 534(1-3):207-10.
- 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
- van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I. G. H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 70: 157-176.
- Homann, A., Biedendieck, R., Gotze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* 407: 189-198.
- Jang, K. H., Jang, E. K., Kim, S. H., Kim I. H., Kamg, S. A., Koh, I., Park, Y. I., Kim, Y. J., Ha, S. D., Chl, H. K. (2006). High-level production of low-branched levan from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 for the production of di-β-D-fruktofuranose dianhydride IV. *J Microbiol. Biotechnol.* 16: 102-8.
- Kang S. A., Jang, K.H., Seo, J. W., Kim, K. H., Kim, Y. H., Rairakhwada, D., Seo, M. Y., Lee, J. O., Ha, S. D., Kim C. H. and Rhee S. K. (2009). *Levan: Applications and Perspectives. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors.* Caister Academic Press
- Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., Kim, C. H. (2005). Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosmet. Sci.* 56: 395–406.
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A, Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:323-35.
- 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, 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.
- 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
- Martinez-Fleites, C., Ortiz-Lombardia, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernandez, L., Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* 390: 19-27.
- Marx, S. P., Winkler, S., Hartmeier, W. (2000). Metabolization of  $\beta$ -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 163–9.
- McIlvaine, T. C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49: 183-186
- Meng, G., Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. 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.
- Newbrun, E., Baker, S. (1968). Physico-chemical characteristics of the levan produced by *Streptococcus salivarius*. *Carbohydr Res* 6: 165–70.
- 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., 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.
- Pilon-Smits E. A. H., Ebskamp M. J. M., Paul M. J., Jeuken M. J. W, Weisbeek P. J., Smeekens S. C. M. (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *PlantPhysiol* 107: 125–130.
- Pons, T., Hernandez, L., Batista F. R., China G. (2000). Prediction of a common  $\beta$ -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Science* 9:2285–2291.
- 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.

- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M. J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104: S1-63.
- Rosell, K. G., Birkhed, D. (1974). An inulin-like fructan produced by *Streptococcus mutans* strain JC2. *Acta Chem. Scand.* 28: 589.
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Hecht, H. J. (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr. Res.* 341: 2335-2349.
- Simmering, R., and Blaut, M. (2001). Pro- and prebiotics – the tasty guardian angels? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 19-28
- Studier, F. W., Moffat, 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: 17593–600.
- Tajima, K., Tanio, T., Kobayashi, Y., Kohno, H., Fujiwara, M., Shiba, T., Erata, T., Munekata, M., Takai, M. (2000). Cloning and sequencing of the levansucrase gene from *Acetobacter xylinum* NCI 1005. *DNA Res.* 7: 237-242.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–80.
- Tonozuka, T., Tamaki, A., Yokoi, G., Miyazaki, T., Ichikawa, M., Nishikawa, A., Ohta, Y., Hidaka, Y., Katayama, K., Hatada, Y., Ito, T., Fujita, K. (2012). Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp. K-1  $\beta$ -fructofuranosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 51, 359-365.
- Velazquez-Hernandez, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juarez, M., Chavez-Moctezuma, M. P. and Valdez-Alarcon, J. J. (2008). Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1763-1778.
- Vijn, I., Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* 120: 351–60.
- 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 nano-electrospray 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. *Journal of Biotechnology* 155: 338 – 349.

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 VEEBIAADDRESSID**

[www.cazy.org](http://www.cazy.org)

[www.expasy.org](http://www.expasy.org)

[www.pseudomonas-syringae.org](http://www.pseudomonas-syringae.org)

[www.pymol.org](http://www.pymol.org)

[www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)

# LISA 1

Levaansukraasi valkude aminohappeliste järjestuste joondus. *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Q88BN6; 431 ah), *Arthrobacter* sp. K-1 (Q8VW87; 584 ah), *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, LscA (Q93FU9; 424 ah), *Gluconacetobacter diazotrophicus*'e (Q43998; 584 ah), *Erwinia amylovora* (Q46654; kokku 415 ah), *Rahnella aquatilis*'e (O54435; 415 ah), *Zymomonas mobilis*'e (Q60114; 423 ah), *Gluconacetobacter oxydans*'i (58039338; 436 ah), *Haloalkalicoccus jeotgali* (300710312; 428 ah), *Haloarcula marismortui* (Q5V249; 445 ah), *Bacillus megaterium*'i (D5DC07; 484 ah) ja *Bacillus subtilis*'e (P05655; 473 ah) levansukraasid. Joonduse visualiseerimisel on kasutatud programmi BioEdit (Hall, 1999). Punasega on tähistatud katalüütilise kolmiku positsioonid ja rohelisega töös uuritud aminohapete positsioonid.

		10	20	30	40	50	60	70	
Q88BN6_Lsc3	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1
Q8VW87_A.sp.K-1	1	-----MTHS	TR--GRVRRV	LAGGLATSTL	AAAVLIAG--	---AAPATAQ	-----	-----	37
Q93FU9_P.aurantiaca	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
Q43998_G.diazotrophicus	1	-----MAHV	RRKVATLNMA	LAGSLLMVLG	AQSALAQGNF	SRQEAAARMAH	RPGVMPRGGP	LF-----	56
Q46654_E.amylovora	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
O54435_R.aquatilis	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
Q60114_Z.mobilis	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
58039338_G.oxydans	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
300710312_H.jeotgali	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
Q5V249_H.marismortui	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
D5DC07_B.megaterium	1	-----	---MKMKRV	AKHTTAATLA	A-----	-----	-----	-----	17
P05655_B.subtilis	1	-----	---MNIKKF	AKQATVLTFT	T-----	-----	-----	-----	17
		80	90	100	110	120	130	140	
Q88BN6_Lsc3	1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	24
Q8VW87_A.sp.K-1	37	-----	-----	-----	-----	---MYNSNSAV	SQLQNSPLVD	NIKYPP---	58
Q93FU9_P.aurantiaca	1	-----	-----	-----	-----	-----	SGL QDGPEPTIHT	QQAYAPED--	15
Q43998_G.diazotrophicus	56	-----	-----	-----	-----	-----	---MKSNTKEFG	KAPHQP---	82
Q46654_E.amylovora	1	-----	-----	-----	-----	-----	PGFPLPSIHT	QQAYDPQS--	8
O54435_R.aquatilis	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---MS DYNYPK---	8
Q60114_Z.mobilis	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---MT NLNYTP---	10
58039338_G.oxydans	1	-----	-----	-----	-----	-----	---MLN KAGIAEP---	14	
300710312_H.jeotgali	1	-----	-----	-----	-----	-----	---MNAVSSST	QSAIQSG---	11
Q5V249_H.marismortui	1	-----	-----	-----	-----	-----	---MTPHEHSG	RATP---	14
D5DC07_B.megaterium	17	-----	-----	-----	-----	-----	---MTNEALG	EGRSGTK---	40
P05655_B.subtilis	17	-----	-----	-----	-----	---ALLVGG	GYQTFAGKND	SKDFNNS---	40
		150	160	170	180	190	200	210	
Q88BN6_Lsc3	24	---TV---WSR	ADALKVNEND	PET-----	---TQELV	SADFFVMSDT	-----	---VFTWDTMP	65
Q8VW87_A.sp.K-1	59	DFTAK---WTR	ADARQLQRMS	DPTAPSRENS	MPASVIMETV	PODFPDMSSNE	Q-----	---VWVWDTWP	115
Q93FU9_P.aurantiaca	15	---SL---WTR	ADALKVHAD	PET-----	---TQELV	SADFFVLSNE	-----	---VFTWDTMP	56
Q43998_G.diazotrophicus	83	DFTAR---WTR	ADALQIKAHS	DATVAAGQNS	LPAQLTMEPI	PADFFVINPD	-----	---VWVWDTWT	138
Q46654_E.amylovora	8	---TL---WTR	ADALKVHEDD	PET-----	---TQELV	DIADFFVMSEE	-----	---VFTWDTMP	49
O54435_R.aquatilis	8	---TI---WTR	ADALKVNEND	PET-----	---TQELV	DADEFFVMSDE	-----	---VFTWDTMP	49
Q60114_Z.mobilis	10	---SL---WTR	ADAMKVHTDD	PTA-----	---TMEPI	DYDEFFVMTDK	-----	---YVWVDTWP	51
58039338_G.oxydans	14	---SR---WTR	ADAMKIHRTD	PET-----	---TMEPI	DYAEFFVIDSD	-----	---VWQWDTWL	55
300710312_H.jeotgali	11	---R---WTR	EHASKIERTD	PT-----	---VVEII	YPPREDAAPE	-----	---VWQWDTWF	50
Q5V249_H.marismortui	14	---GRAGWTR	EQASRIERTD	PT-----	---VVEII	YPPQTEQIPE	-----	---VHTWDTWF	56
D5DC07_B.megaterium	40	---YGISHITR	DNMVKIPEQQ	NSD-----	---QFKVPAF	DESTIKNIAS	ARGKNASGNT	IDLDVWDSWP	98
P05655_B.subtilis	40	---YGISHITR	HDMLQIPEQQ	KNE-----	---KYQVEEF	DSSTIKNISS	ARG-----	---LDVWDSWE	89
		220	230	240	250	260	270	280	
Q88BN6_Lsc3	66	LRRLDGTVVS	VNGWSVIIIL	TADRHPDDPQ	YLGPDGRYDI	KRDWEDRIGR	ARMCYWYSRT	G-----	126
Q8VW87_A.sp.K-1	116	LRDDEANQYS	VNGWEIIFSL	VADRNLG---	-----	FDDRHFV	AKIGFYRRA	GVPAAE---	165
Q93FU9_P.aurantiaca	57	LRDLGDNITS	VDGWSVIFEL	TADRHPNDEY	YIDENGYDI	TRDWNDRHGR	AKMYWESRT	G-----	117
Q43998_G.diazotrophicus	139	LIDKHADQFS	YNGWEVLEFL	TADPNAG---	-----	YGFDDRHHV	AKIGFYRRA	GIPASR---	190
Q46654_E.amylovora	50	LRDHDGEIIS	VNGWCIIFFL	TADRNTDNPQ	FQDENGYDI	TRDWEHRHGR	ARICYWYSRT	G-----	110
O54435_R.aquatilis	50	LRSLDGTVVS	VDGWSVIFEL	TAQRNNNSE	YLDAEGNYDI	TSDWNNRHGR	ARICYWYSRT	G-----	110
Q60114_Z.mobilis	52	LRDINGQVVS	FQGSVIFEL	VADRT-----	-----	KYGWHNRNDG	ARICYWYSRG	G-----	97
58039338_G.oxydans	56	LRDLHGKTVT	FKGWYVMPAL	VADRSATG---	---DT	VEGWHSRNNY	SYIGYWYSRT	G-----	106
300710312_H.jeotgali	51	LRERDGSIAT	VGQWRVIFSL	TFAPADLL---	-----	PGKRHDV	ARIRYYSRD	G-----	95
Q5V249_H.marismortui	57	LRNRDGLIAT	VDGWRVCFSL	TFAPADLL---	-----	PGKRHDV	ARIRCFYSRD	G-----	101
D5DC07_B.megaterium	99	LONADGTVAT	YHCYQIVFAL	AGDPKDS---	-----	ND	TSVYLEYKKA	G-----	138
P05655_B.subtilis	90	LONADGTVAN	YHCYHIVFAL	AGDPKNA---	-----	DD	TSYIMEYQKV	G-----	129
		290	300	310	320	330	340	350	
Q88BN6_Lsc3	126	---KDWIFG	GRVMAEGVS-	-----PT	TRE A TPIL	LNDKG---	-----D-	IDLNYTCV---	167
Q8VW87_A.sp.K-1	166	RPENGGWTYG	GLVFKEGVTG	QIFEDQFSH	QTQWSEGSARV	SKNGE---	-----	IKLSEDTVAF	220
Q93FU9_P.aurantiaca	117	---KDWIKL	GRVMAEGVS-	-----PT	ARENACTPIL	LNEQG---	-----D-	VDLVYTAV---	158

Q43998_G.diazotrophicus	191	RPVNGGTYG	CHLFPD	GASA	QVYAGQTYN	QAENSGSRL	MQIHG	-----	-----	NT	VSVFYTDVAF	247
Q46654_E.amylovora	110	---KDWIFG	GRVMAEGVA	-----	PT	TREWACTPIL	LNDRG	-----	-----	D	IDLYYTCV--	151
O54435_R.aquatilis	110	---KDWIFG	GRVMAEGVS	-----	PT	SREWACTPIL	LNEDG	-----	-----	D	IDLYYTCV--	151
Q60114_Z.mobilis	97	---SNWIFG	CHLLKDGAN	-----	PR	SWENSGCTIM	APGTA	-----	-----	NS	VEVEFTSVND	141
58039338_G.oxydans	106	---NGADWKF	GRVVIKEGAN	-----	SR	SWENSGCAVM	RENSG	-----	-----	ST	VDLEFYTSVNG	152
300710312_H.jeotgali	95	---ETWFDG	GPVFEFGTR	-----	G	SROVAGSALL	DDDGR	-----	-----	---	LYVFTASGR	136
Q5V249_H.marismortui	101	---RNWHNA	GPVFEEEP	-----	LG	SROVAGSALLY	DDDGS	-----	-----	---	VYLFYTAAGE	141
D5DC07_B.megaterium	139	DKSIDSWKNA	GRVFKDSDF	VFNDPHLNQ		TOENSGSGLL	TKDGK	-----	-----	---	VRLEFYTDYSG	193
P05655_B.subtilis	130	ETSIDSWKNA	GRVFKDSDF	DANDSILKQD		TOENSGSATF	TSDGK	-----	-----	---	IRLEFYTDYSG	184

		360	370	380	390	400	410	420	
Q88BN6_Lsc3	167	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Q8VW87_A.sp.K-1	221	YRNS	-----	DGTNI	-----	TFGA	AI	-----	AKV
Q93FU9_P.aurantiaca	158	.....	.....	.....	.....	TFGA	TI	-----	VKV
Q43998_G.diazotrophicus	248	NRDA	-----	NAN-NI	-----	TFPQ	AII	-----	TQT
Q46654_E.amylovora	151	.....	.....	.....	.....	TFGA	TI	-----	AKV
O54435_R.aquatilis	151	.....	.....	.....	.....	TFGA	TI	-----	AKV
Q60114_Z.mobilis	141	.....	.....	.....	.....	TFSE	SVP	-----	AQC
58039338_G.oxydans	152	.....	.....	.....	.....	TFSE	SVP	-----	SYT
300710312_H.jeotgali	136	.....	.....	.....	.....	TFYE	RLA	-----	VGS
Q5V249_H.marismortui	141	.....	.....	.....	.....	TFYQ	RI	-----	VGA
D5DC07_B.megaterium	194	K	-----	---	---	TYGK	QTL	-----	TTAQV
P05655_B.subtilis	185	K	-----	---	---	HYGK	QTL	-----	TTAQV

		430	440	450	460	470	480	490	
				Asp219		Glu236			
Q88BN6_Lsc3	197	KLFQADCTYY	QTEAONS	---SWN	F	D	SP	I	---
Q8VW87_A.sp.K-1	260	DLLQADCTYY	QTEAONE	---FFN	F	RDPFTFED	---	PAHPGTFM	VFEGN
Q93FU9_P.aurantiaca	188	PLFQADCTYY	QTEAONP	---FWG	F	RDPWFPRD	---	PND-CKLYM	LFEGN
Q43998_G.diazotrophicus	287	ELLQPDGVLY	QNGAONE	---FFN	F	RDPFTFED	---	EKHPGVNVM	VFEGN
Q46654_E.amylovora	181	SLEFADCTYY	QTEONA	---FWN	F	RDPSPFFD	---	RND-CKLYM	LFEGN
O54435_R.aquatilis	181	SLEFADGVYY	QTESONP	---YWN	F	RDPSPFFD	---	PHD-CKLYM	VFEGN
Q60114_Z.mobilis	172	DLEQADGLYY	ADYAENN	---FWD	F	RDPHFVFN	---	PEE-CKTYA	LFEGN
58039338_G.oxydans	183	DMEQADGVNY	ANLVEDQ	---YWD	F	RDPHFIFRN	---	PDD-NQIMA	LFEGN
300710312_H.jeotgali	173	VLLQPDGCRY	EREEOGR	---G	MIYT	---	---	PRS-CKTYL	LFEGN
Q5V249_H.marismortui	177	ELLQPDGCRY	EREEOGR	---R	MIYT	---	---	PEE-CKTYL	LFEGN
D5DC07_B.megaterium	226	SIFDGDCKLY	QTVQOFIDEG	GYDTGDNHTL	RDPHYVED	---	---	N-CHKYL	VFEGN
P05655_B.subtilis	216	SIFDGDCKLY	QNVQOFIDEG	NYSSGDNHTL	RDPHYVED	---	---	K-CHKYL	VFEGN

		500	510	520	530	540	550	560	
Q88BN6_Lsc3	243	RG	-----	SHTV	GVAELCPVP	---EGHEDVG	---	GAR	---
Q8VW87_A.sp.K-1	307	RE	-----	TATC	NEADLYRQ	DYAEYTDVV	NASGAT	---	YQICNVGL
Q93FU9_P.aurantiaca	234	RG	-----	SHKV	GKAEICDVP	---EGYEDVG	---	NSR	---
Q43998_G.diazotrophicus	334	RG	-----	VANC	TEADLCFRPN	DENAEITLQEV	LDSGAY	---	YQKANIQL
Q46654_E.amylovora	227	RG	-----	SHEI	TQAEENVP	---EGYEDVG	---	GAK	---
O54435_R.aquatilis	227	RG	-----	SHVI	GKQEMCTLP	---EGHRDVG	---	NAR	---
Q60114_Z.mobilis	218	RG	-----	TVAV	GEEEICPVP	---EKTETPD	---	GAR	---
58039338_G.oxydans	229	RG	-----	DFTI	GSDERCLVP	---BATVPA	---	GAQ	---
300710312_H.jeotgali	221	EG	-----	AGAC	GD	---	---	FN-CSVGI	AHSPTG
Q5V249_H.marismortui	225	EG	-----	SDVC	GGDD	---	---	ALQE	---
D5DC07_B.megaterium	279	DGYQGEDSLY	NRAYCGNN	---EFFQSEKKK	LLEGSNKEK	ASLANCALCI	IELND	---	DYTLKVKMKP
P05655_B.subtilis	269	DGYQGEESLF	NKAYCGKST	---SFFRQESQK	LLQSDKKRT	AELANCALGM	IELND	---	DYTLKVKMKP

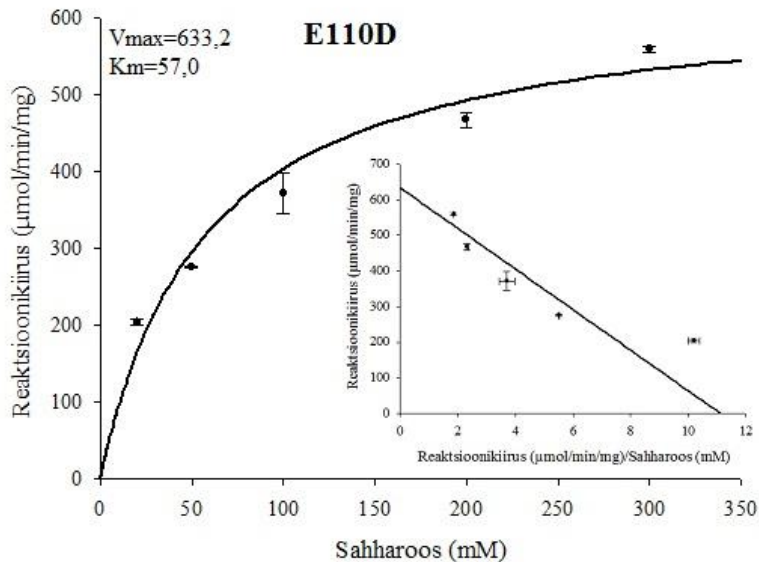
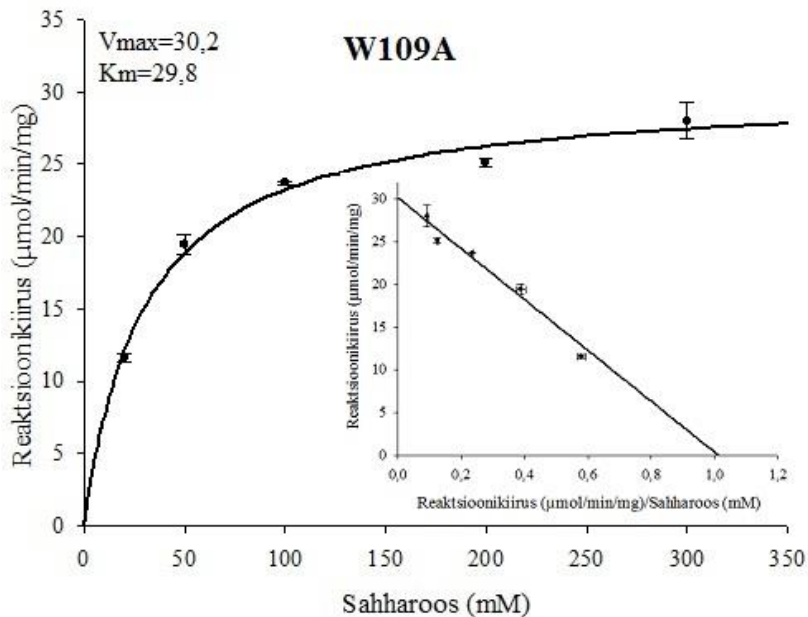
		570	580	590	600	610	620	630	
			Glu303						
Q88BN6_Lsc3	292	LVTAVGVNDQ	TERPHVVFQD	GRVYLFETISH	KFTVA-DGVT	GPDGVY	---GF	VG-EHLFGFY	REMNAS-GLV
Q8VW87_A.sp.K-1	363	LILSANCVNDQ	TERPQIYFKD	GRVYLFETISH	RGTFA-AGLD	GPDGVY	---GF	VG-DGIRSDY	QPLNNGS-GLV
Q93FU9_P.aurantiaca	283	LILTAVGVNDQ	TERPHVVFQD	GRVYLFETISH	TFTVA-DGVT	GPDGVY	---GF	VA-DSIFGFI	VPLNGS-GLV
Q43998_G.diazotrophicus	390	LILSANCVNDQ	TERPQVYLHN	GRVYLFETISH	RTTFA-AGVD	GPDGVY	---GF	VG-DGIRSDY	QEMVNGS-GLT
Q46654_E.amylovora	276	LILTAVGVNDQ	TERPHVVFQD	GRVYLFETISH	KYTFE-DNLT	GPDGVY	---GF	VS-DKLTGFI	TEMNSS-GLV
O54435_R.aquatilis	276	LVTAVGVNDQ	TERPHVVFQD	GRVYLFETISH	KFTVA-DGLT	GPDGVY	---GF	LS-DNLTGFI	SPMNGS-GLV
Q60114_Z.mobilis	267	LVTAVGVNDQ	TERPHVVFQD	GLTYLFTISH	HSTVA-DGLS	GPDGVY	---GF	VSENGIFGFI	EPLNGS-GLV
58039338_G.oxydans	282	LVTALGVNDQ	TERPHVVFQD	GLTYLFTISH	HSTFT-GNST	GPDGVY	---GF	VSRNGIFGFI	APLNGS-GLV
300710312_H.jeotgali	257	LLEGICVNOE	LERPHVVRN	GFVYLFVSSH	DHTFA-PGLE	GPDGLY	---GF	VA-DSIRGFI	RPLNGS-GLV
Q5V249_H.marismortui	262	LILDVGVNOE	LERPHVVRN	GLVYLFVSSH	LHTFA-PGLE	GFADALY	---GF	VA-EDIRGFI	VPLNGS-GLV
D5DC07_B.megaterium	341	LILSNTVDE	IERANIFKMD	GRVYLFETISR	GSKMTIDCI	QODDVMLG	VS-NLITGFI	VS-NLITGFI	KPLNDT-GLV
P05655_B.subtilis	331	LILSNTVDE	IERANVFKMN	GRVYLFETISR	GSKMTIDCI	SND-IXMLG	VS-NLITGFI	VS-NLITGFI	KPLNKT-GLV

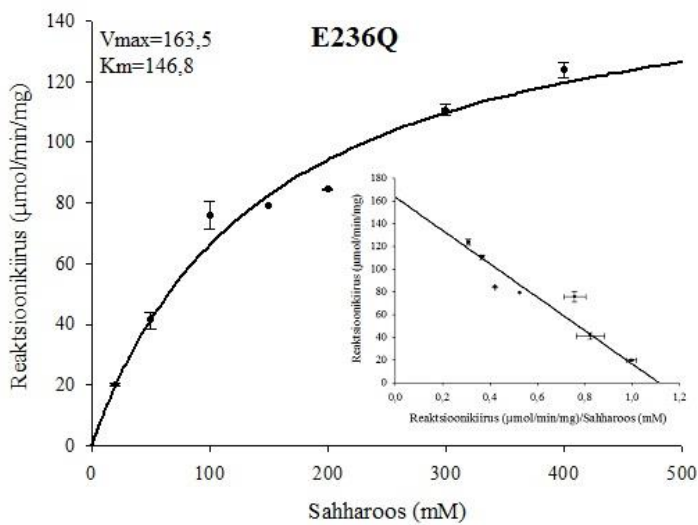
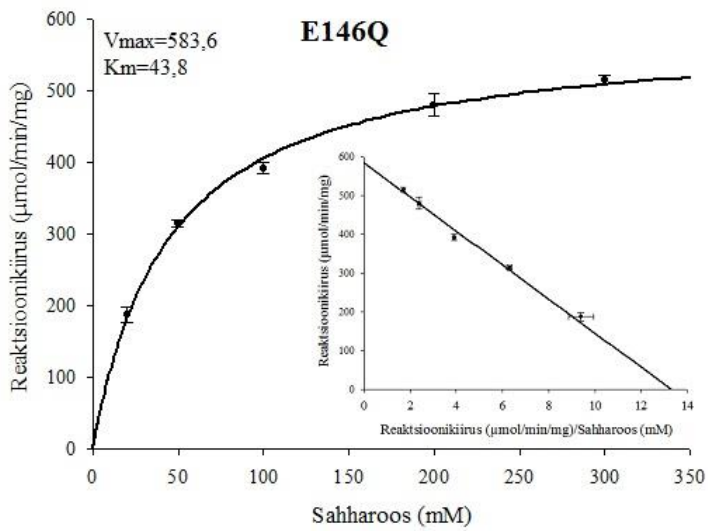
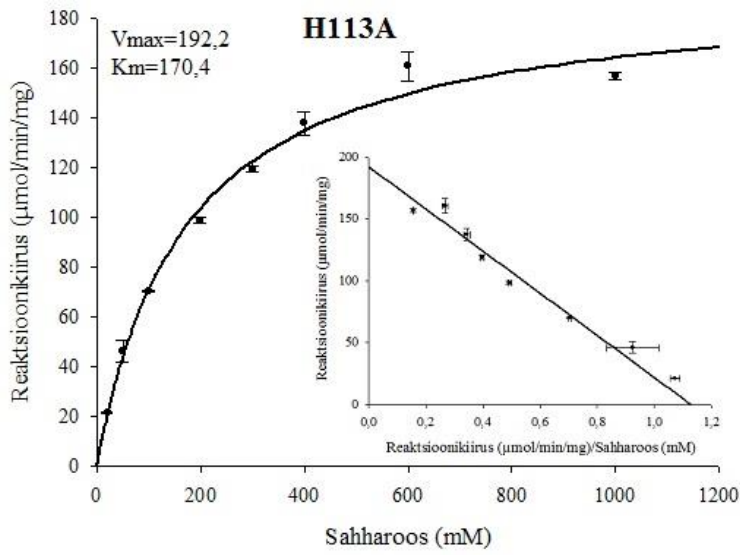
		640	650	660	670	680	690	700	
Q88BN6_Lsc3	357	LG	-----	NPPE	-----	QPFQ	TYSHCVMPN	---	LVTSF
Q8VW87_A.sp.K-1	429	LG	-----	NPTNL	NFLGGQPFAP	DFNQHPGHFQ	AYSHVMPG	---	LVOSF
Q93FU9_P.aurantiaca	348	LG	-----	NPSS	-----	QPFQ	TYSHCVMPN	---	LVTSF
Q43998_G.diazotrophicus	456	MG	-----	NPTDL	NTAAGTDFDP	SPDQNPRAFQ	YSYHVMFG	---	LVESF
Q46654_E.amylovora	341	LG	-----	NPSS	-----	QPFQ	TYSHCVMPN	---	LVTSF
O54435_R.aquatilis	341	LG	-----	NPSS	-----	QPFQ	TYSHCVMPN	---	LVTSF
Q60114_Z.mobilis	333	LG	-----	NPSS	-----	QPFQ	TYSHVMTN	---	LVTSF
58039338_G.oxydans	348	LG	-----	NPSS	-----	APME	TYSHVDEA	---	YVOSF
300710312_H.jeotgali	322	LT	-----	NPAN	-----	APYQ	AYSNVAFSH	---	REELVSGF
Q5V249_H.marismortui	327	AT	-----	NPEN	-----	APFQ	SYSNMAREH	---	SDEVLVOSF



## LISA 2

Puhastatud Lsc3 W109A, E110D, H113A, E146Q JA E236Q ensüümide kineetika Michaelis-Menten'i (esitatud suurelt) ja Eadie-Hofstee (esitatud väiksemalt) tüüpi graafikud, mis on saadud programmiga SigmaPlot 2001. Toodud on ka vastavate andmete põhjal arvatud  $V_{max}$ ,  $K_m$ . Tulemused saadi nagu on näidatud pt. 2.2.6.





### LISA 3

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

Heiki Vija, Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, Tallinn

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

##### Proovide valmistamine

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

##### Vedelikkromatograafiline lahutamine

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

##### Tulemuste analüüs ja andmete töötlemine

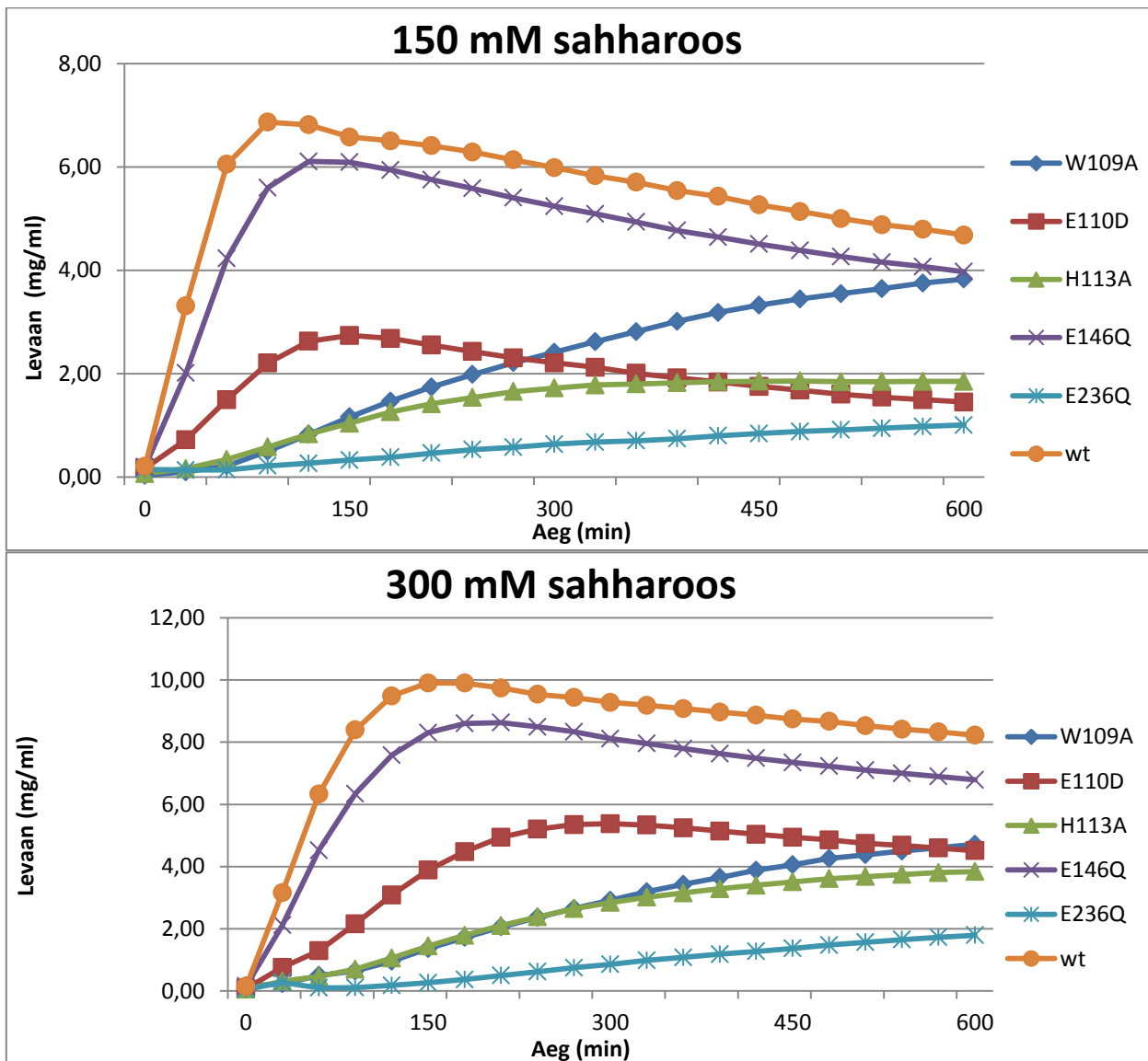
Standardsuhkrute väljumisaegade alusel identifitseeriti uuritavates proovides vastavad ained. Kõrgema polümerisatsiooniastmega FOS-id identifitseeriti kirjanduses toodud analoogia alusel

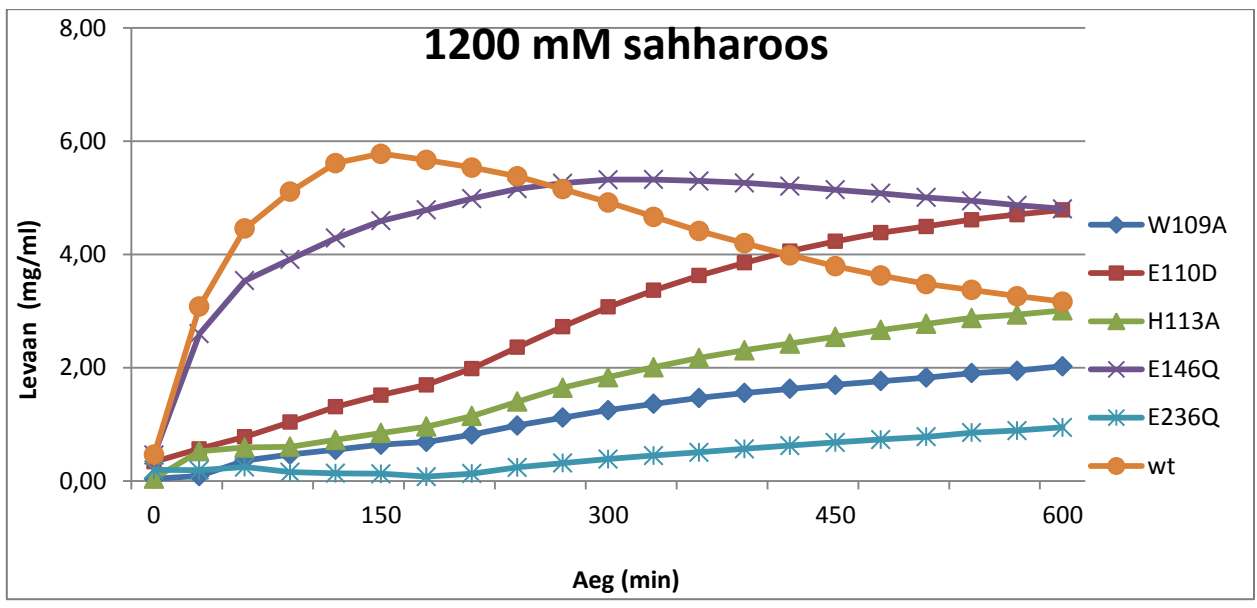
(Downes ja Terry, 2010). FOS-ide polümerisatsioonistmega 3-10 kogused kalibreeriti rafinoosi abil. Proovide analüüsil saadud kromatogrammid integreeriti. Tehti kalibreerimisgraafik erinevate kontsentratsiooniga suhkrute standardlahuste kromatogrammide piikide pindala ja suhkru kontsentratsiooni logaritmidest. Saadud lineaarsele sõltuvusele arvutati funktsioonivõrrand kujul  $y=ax+b$ . Kuna glükoosi piigi pindala erines märgatavalt teiste suhkrute piigi pindalast, siis arvutati glükoosi ja teiste suhkrute jaoks erinevad funktsioonivõrrandid. Saadud võrrandite alusel arvutati uuritavates proovides registreeritud piikide pindalade alusel suhkrute kontsentratsioon võttes arvesse uuritavatele proovidele tehtud lahjendust. Paralleelproovide tulemuste alusel saadi määramisveaks kuni 10%. Kõikide reaktsioonisegu komponentide sisaldused leiti milligrammides ühe ml kohta. Vaba glükoosi ja fruktoosi sisalduse järgi arvutati transfruktosüüliv aktiivsus ehk reaktsiooniproduktidesse seotud fruktoosi protsentuaalne osakaal. Levaansukraaside võime toota FOS-e väljendati grammides mg valgu kohta.

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

#### LISA 4

Levaani teke (mg/ml) erinevatel sahharoosi kontsentratsioonidel (150, 300 ja 1200 mM) 20 h jooksul. Reaktsioonisegu sisaldas McIlvaine'i puhvrit, sahharoosi ja 10 µg/ml puhastatud levaansukraasi ning reaktsioon toimus temperatuuril 30°C. Levaani teket mõõdeti 400 nm lainepikkusel. Levaani kogus leiti nagu on näidatud pt. 2.2.6.





## LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Maria Gromkova

*(autori nimi)*

(sünnikuupäev: 02.08.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
*Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraasi Lsc3 transfruktosüülimisreaktsiooniks  
oluliste aminohapete kindlakstegemine mutatsioonanalüüsiga,  
*(lõputöö pealkiri)*

mille juhendajad on dots Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat; teadur Triinu Visnapuu, PhD; Karin Mardo, magister,

*(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 **28.05.2015** 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, 28.05.2013 *(kuupäev)*