

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Karin Mardo

***Pseudomonas syringae* levaansukraasi mutageniseerimine: mutantide
seleksioon ja iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: dots Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat
Triinu Visnapuu, magister

TARTU 2009

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 Levaansukraaside üldiseloomustus	5
1.2 Levaan ja fruktooligosahhariidid: ehitus ja funktsioonid	6
1.3 Grampositiivste ja gramnegatiivsete bakterite levaansukraaside võrdlus	8
1.4 Levaansukraaside substraadispetsiifika	10
1.5 Levaansukraaside struktuur ja reaktsioonimehhanism	12
1.6 Levaansukraaside uurimine mutantide abil	14
1.6.1 Mutageniseerimise moodused	14
1.6.2 Mutantsete levaansukraaside uurimine	15
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1 Töö eesmärgid	18
2.2 Materjal ja meetodika	18
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid	18
2.2.2 Söötmed ja rakkude kasvatamine	18
2.2.3 DNA eraldamine, klonimine, transformatsioon ja PCR	19
2.2.4 Keemiline mutageniseerimine ja bakterite elumuse määramine	19
2.2.5 Mutantide seleksioon ja isoleerimine	20
2.2.6 Rakuekstraktide tegemine ja levaansukraasi aktiivsuse määramine	21
2.2.7 Õhukese kihi kromatograafia ja plaadilt elueeritud produktide analüüs	22
2.2.8 Sekveneerimine	22
2.2.9 Valkude joondamine, mutatsioonide ja sekundaarstruktuuri analüüs	23
2.2 Tulemused ja arutelu	23
2.3.1 Levaansukraasi juhuslik mutageniseerimine, mutantide seleksioon ja sekveneerimine	23
2.3.2 Lsc3 valgu joondamine teiste gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidega, valkude sekundaarstruktuuri ja muteerunud aminohapete paiknemise ennustamine Lsc3 valkudel	25
2.3.3 Isoleeritud levaansukraasi mutantide iseloomustamine	29
KOKKUVÕTE	33
SUMMARY	35
KASUTATUD KIRJANDUS	36
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	41
LISA 1	42

KASUTATUD LÜHENDID

DNSA – 3,5-dinitrosalitsüülhape

DP – polümeerisatsiooniaste (*degree of polymerisation*)

EMS – etüülmetaansulfonaat

FOS – fruktooligosahhariidid

Ftf – *Streptococcus salivarius*'e levaansukraas

FtfA – *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 levaansukraas

GalG – melibioos

GalGalGF – stahhüoos

GalGF – rafinoos

GF – sahharoos

HpMALI – *Hansenula polymorpha* maltaasi geen

Km – kanamütsiin

Lev – *Lactobacillus reuteri* levaansukraas

LevU – *Zymomonas mobilis*'e levaansukraas

Lsc1, Lsc2, Lsc3 – *Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraasid

LsdA – *Gluconacetobacter diazotrophicus*'e levaansukraas

LsrA – *Rahnella aquatilis*'e levaansukraas

pv. – patovar (alamliik)

SacB – *Bacillus subtilis*'e levaansukraas

TAE – Tris-atsetaat-EDTA

TTC - tetrasooliumkloriid

SISSEJUHATUS

Levaansukraasid on bakteriaalsed eksoensüümid, mis sünteesivad levaani tüüpi polüfruktaani ja mõnikord ka fruktooligosahhariide (FOS), kasutades substraadina peamiselt sahharoosi. Pika ahelaga levaani toodavad peamiselt taimepatogeenid ja biokilet moodustavad bakterid, et kleepuda pinnale ja kaitsta rakku keskkonnamõjude eest.

Inuliini tüüpi polüfruktaanid on laialt levinud taimede varuainetena. Inuliinil ja FOS-l on näidatud prebiootilist toimet – nad stimuleerivad inimese jämesooles elavate probiootiliste bakterite kasvu ja on seetõttu kasutusele võetud toidulisanditena. Suure molekulmassiga levaanil on aga loomkatsetes näidatud immuunsüsteemi stimuleerivat ja rasvumisvastast toimet.

Hetkel tegeldakse levaansukraasi struktuuri ja substraadispetsiifika tundmaõppimisega, et selgitada välja, mis määrab ära sünteesitava fruktaanahela pikkuse ning substraatide spektri, mida levaansukraasid fruktosüüli doonorina ja aktseptorina kasutada saavad. Levaansukraaside struktuuri ja funktsiooni iseloomustamiseks on neid muteeritud nii koht-spetsiifiliselt kui ka juhuslikult. Mutantsed levaansukraasid, mis oleksid võimelised tootma suures koguses FOS-e, leiaksid ka praktilist rakendust prebiootikumide tootmisel.

Oma bakalaureusetööga osalesin ETF granti 7528 täitmisel, muteerisin *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi Lsc3 ning isoleerisin ja iseloomustasin mutantseid valke.

Minu töö eesmärgid olid (vt ka 2.1):

1. Muteerida *P. syringae* pv. tomato DC 3000 levaansukraasi (Lsc3) plasmiidil asuvat geeni etüülmetaansulfonaadiga, transformeerida saadud mutantidega *Escherichia coli*'t ja isoleerida selektiivsöötmeid kasutades muutunud fenotüübiga rekombinantseid kolooniaid.
2. Teha kindlaks mutatsiooni asukoht levaansukraasi geeni sekveneerimisega ja ennustada muteeritud aminohapete paiknemist valgu sekundaarstruktuuris.
3. Ekspresseerida muteeritud levaansukraasi geene *E. coli*'s ja iseloomustada rakulüsaatides levaansukraasi hüdrolyütilist aktiivsust, substraadispetsiifikat ja võimet sünteesida oligosahhariide.

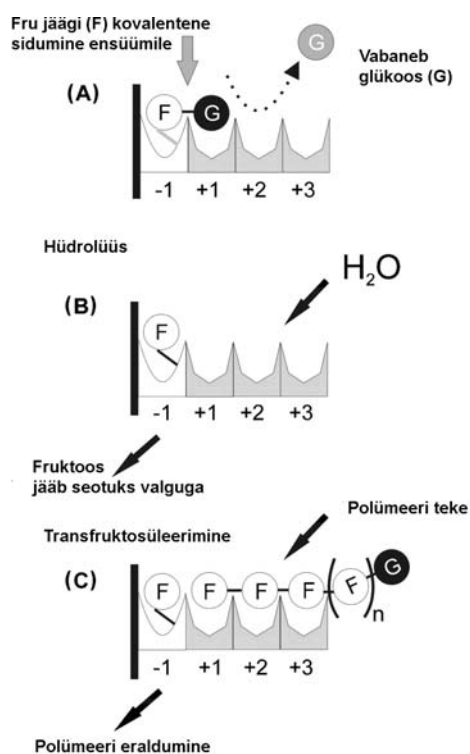
Töö tehti Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis Geneetika õppetoolis.

Tahaksin tänada oma juhendajaid Tiina Alamäed, aitas käesolevat tööd kokku panna, ning Triinu Visnapuud, kes oli abiks praktilises töös. Samuti sooviksin tänada teisi TÜMRI töötajaid, kes aitasid selle töö valmimisele kaasa.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Levaansukraaside üldiseloomustus

Levaansukraas on bakteriaalne eksoensüüm (EC 2.4.1.10), mis kuulub glükosiidi hüdrolaaside perekonda 68 (<http://www.cazy.org/CAZY/>). Ensüümi süstemaatiline nimetus on sahharoos: 2.6- β -D-fruktaan6- β -D-fruktosültransferaas. Levaansukraas viib läbi kahte tüüpi reaktsioone, tal on nii hüdrolüüsiv kui ka polümeriseeriv aktiivsus (Joonis 1). Levaansukraas lõhub sahharoosi molekulis fruktoosi ja glükoosi jäägi vahelise glükosiidsideme ja liidab sahharoosist vabastatud fruktosüljäägi erinevatele aktseptoritele nagu vesi (hüdrolüüsiv aktiivsus), glükoos (vahetusreaktsioon, mis tekitab tagasi sahharoosi), sahharoos ning FOS-d (polümeriseeriv aktiivsus) (Gross ja Rudolph, 1987; Song ja Jacques, 1999). On näidatud, et levaansukraasile võivad sobida fruktosüüli aktseptoriks ka alkoholid (Kim *et al.*, 2000), maltoos, maltotrioo, ksüloos ning arabiinoo (Tieking *et al.*, 2005).



Joonis 1. Levaansukraasi hüdrolüüsiv (B) ja polümeriseeriv aktiivsus (C). Näidatud on fruktosüüli doonori (sahharoosi) seostumine levaansukraasi aktiivtsentri piirkondadesse -1 ja +1 (A) ning fruktosüüli aktseptori (fruktaani) seostumine piirkondadesse +1, +2 ja +3 (C) (kasutatud joonist artiklist Ozimek *et al.*, 2006).

Levaansukraasi koguaktiivsust hinnatakse reaktsioonikeskkonda vabanenud glükoosi hulga järgi, hüdrolüüsivat aktiivsust vabanenud fruktoosi hulga järgi, polümeriseerivat aktiivsust aga näiteks

mõõtes levaani ja FOS-e teket (Gross ja Rudolph, 1987). Polümeriseerimis- ja hüdroolüüsireaktsiooni osakaal levaansukraasil sõltub eelkõige substraadi (enamasti on eksperimentides substraadina kasutatud sahharoosi) kontsentratsioonist. Madalal sahharoosi kontsentratsioonil (>50 mM) on eelistatud suhkru hüdroolüüs, kõrgel aga polümeriseerimine (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; Hernandez *et al.*, 1995). On näidatud, et sahharoosi hüdroolüüsil vabanev glükoos inhibeerib ensüümi polümeriseerivat aktiivsust (Hettwer *et al.*, 1995; van Geel-Schutten *et al.*, 1999).

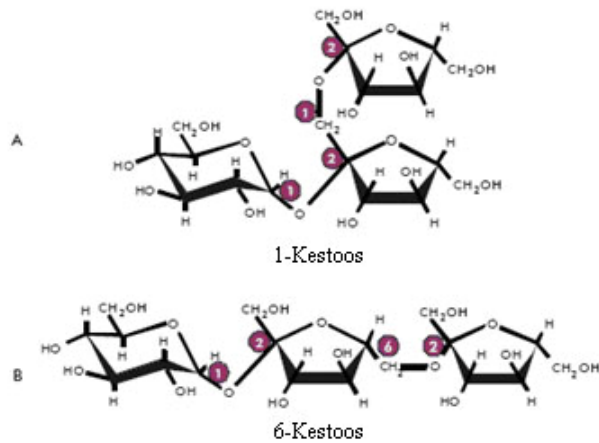
Levaansukraasi polümeriseeriv aktiivsus sõltub ka temperatuurist. Näiteks *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* levaani sünteesiks sobivaim temperatuur oli 18 °C ja sahharoosi hüdroolüüsi optimumtemperatuur oli 60 °C. Kui levaansukraasi inkubeeriti sahharoosiga temperatuuril 55 °C, siis ensüüm tootis ainult lühema ahelaga levaani molekule (Hettwer *et al.*, 1995). *Zymomonas mobilis*'e levaansukraasi temperatuurioptimum polümeriseerimisreaktsioonil oli 30 °C ja hüdroolüüsireaktsioonil 50 °C (Sangiliyandi *et al.*, 1999). Grampositiivsetest bakteritest on kõige paremini uuritud *Bacillus subtilis*'e ensüüm, millel on näidatud, et kõrgel temperatuuril ja suurel sahharoosi kontsentratsioonil sünteesitakse samuti enam FOS-e ja suure molekulmassiga levaani tekib vähem (Euzenat *et al.*, 1997). Soovitud produktide spektri saamiseks võiks seega varieerida reaktsiooni temperatuuri ja substraadi kontsentratsiooni.

Kuna levaansukraas on eksoensüüm, siis on oluline, et ta oleks stabiilne ja säilitaks oma ensümaatilise aktiivsuse ka väljaspool rakku, väliskeskkonnas. Vastasel korral ei oleks bakteril mõtet neid ensüüme sünteesida ja sekreteerida. Näiteks *P. syringae* pv. *phaseolicola* levaansukraas on äärmiselt vastupidav korduval külmutamisele ja sulatamisele, keemilistele denatureerijatele (SDS, urea) ja proteaasidele. Temperatuuril 4 °C hoituna ei kaotanud ensüüm aktiivsust isegi kuue kuu jooksul (Hettwer *et al.*, 1995). Ka *B. subtilis*'e levaansukraas talub suhteliselt hästi mitmeid raskemetalliioone ja detergente, näitkes Na-dodetsüülsulfaati (SDS) ja etüleendiamiintetraatsetaati (EDTA) (Esawy *et al.*, 2008). Samas taimepatogeeni *P. syringae* pv. *tomato* muidu väga stabiilsetele levaansukraasidele avaldavad mõned detergendid (SDS ja urea) tugevat inhibeerivat toimet (Toomemaa, 2007; Visnapuu, 2007).

1.2 Levaan ja fruktooligosahhariidid: ehitus ja funktsioonid

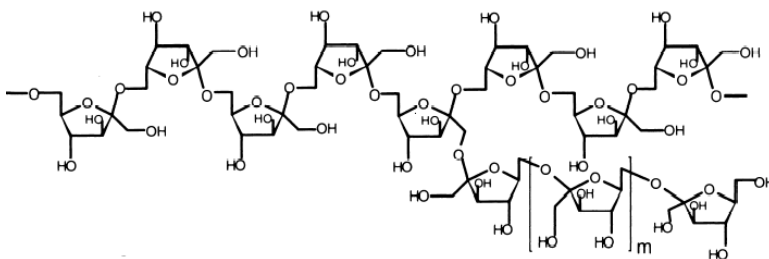
Levaansukraasid moodustavad sahharoosist põhiproduktina levaani ning mõnede levaansukraaside puhul moodustub lisaks levaanile ka märkimisväärset koguses FOS-e, näiteks

nüstoosi ja kestoosi, mille struktuur on näidatud Joonisel 2 (Bekers *et al.*, 2002; Homann *et al.*, 2007).



Joonis 2. 1-kestos (A) ja 6-kestos (B) on levaansukraaside oligomeersed reaktsiooniproduktid (Banguela ja Hernandez, 2006).

Levaan on polüfruktaan, milles monomeerid on omavahel seotud peamiselt β -2.6 glükosiidsidemega. Võib esineda ka ahela hargnemist β -2.1 sideme kaudu (vt. Joonis 3). Mõlemat tüüpi sidemete teke on katalüüsitud levaansukraasi poolt (Gross ja Rudolph, 1987). Levaani molekulmass võib varieeruda 20 kilodaltonist (kDa) kuni mitme miljoni daltonini ja sünteesitava levaani molekulmass sõltub konkreetsest levaansukraasist. Näiteks grampositiivse bakteri *Lactobacillus reuteri* ensüüm toodab suure molekulmassiga (ca 90-100 kDa) levaani, samas kui mõnede gramnegatiivsete bakterite levaansukraasid sünteesivad väiksema molekulmassiga (50-60 kDa) levaani (Yanase *et al.*, 1992; Hernandez *et al.*, 1995; van Hijum *et al.*, 2001).



Joonis 3. Levaani struktuur (van Hijum *et al.*, 2004).

Mis kasu on bakteril levaani ja FOS-e sünteesist? Taimedel on tõestatud fruktaanide, rafinoosi ja stahhüoosi stabiliseeriv toime membraanidele, mis on eriti vajalik kuivastressi puhul (Valluru ja Van den Ende, 2008). Arvatakse, et levaan stabiliseerib ka bakterimembraane. *B. subtilis* on

mullabakter ja ta võiks kõrgmolekulaarset levaani kasutada mullaosakestele kinnitumiseks ning kaitseks kuivamise eest. Lisaks võiks levaankapsli ülesanne olla ka rakule toksiliste ainete sidumine (Ammar *et al.*, 2002; van Hijum *et al.*, 2006). Suuõõnes elav piimhappebakter *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 toodab sahharoosist levaani. Arvatakse, et ensüüm on bakterile virulentsusfaktoriks, mis aitab bakteril kinnituda ja pindu koloniseerida. Levaan osaleb hambakatu moodustamisel ja soodustab ka kaariese teket (Manly ja Richardson, 1968; Munro *et al.*, 1991; Jacques, 1993). Suhkruroo pinnal ja juhtkudedes elav *Gluconacetobacter diazotrophicus* sünteesib lisaks kõrgmolekulaarsele levaanile ka suuremas koguses tri- ja tetrasahhariide, mis võivad olla kasutatavad substraatidena taime fruktaanide sünteesil (Hernandez *et al.*, 1995).

Kuna levaansukraasi geen esineb ka taimepatogeenidel, arvatakse, et ensüüm võib osaleda fütopatogeneesis. Näiteks *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180 on sojaoa patogeen, ning *P. syringae* pv. *tomato* nakatab tomatit ja müürlooka (*Arabidopsis thaliana*), põhjustades lehtedel ja vartel nekroosilaike. Ilmselt osaleb levaan nekroosi tekkes, sest kui levaasukraasi geen inaktiveerida, siis haigusnähud vähenevad (Gross ja Rudolph, 1987). Levaani sünteesitakse taime nakatamise algusfaasis ja koos alginaadiga moodustab see kaitsekihi bakteri ja taimeraku vahel. Mutandid, kes ei suuda levaani sünteesida, on vähenenud virulentsusega (Geier ja Geider, 1993; Denny, 1995; Bereswill ja Geider, 1997; Hettwer *et al.*, 1998; Li ja Ullrich, 2001; Laue *et al.*, 2006).

Nii polü- kui ka ja oligofruktaanidel on kirjeldatud inimesele ja loomadele kasulikke omadusi. Levaanil ja eelkõige FOS-I, on täheldatud prebiootilist toimet (Jun Goh *et al.*, 2006; Wierdsma *et al.*, 2009). Prebiootikumid on inimorganismi poolt mitteseeditavad ained, mis soodustavad kasulike bakterite kasvu jämesooles (Gibson ja Roberfroid, 1995). Levaanil on näidatud ka kasvajate ja rasvumise vastast toimet (Yoo *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006). Seetõttu oleks võimalik levaansukraasi reaktsiooniprodukte kasutada toiduainetööstuses tervislike toodete loomisel.

1.3 Grampositiivste ja gramnegatiivsete bakterite levaansukraaside võrdlus

Levaansukraase on kirjeldatud nii grampositiivsetel kui ka gramnegatiivsetel bakteritel. Gramnegatiivsetest bakteritest on levaansukraasid näiteks liikidel *Z. mobilis*, *G. diazotrophicus*, *P. syringae*, *Rahnella aquatilis* ja grampositiivsetest bakteritest näiteks liikidel *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. megaterium*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. reuteri* (http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=2.4.1.10). Grampositiivsete ja -

negatiivsete bakterite levaansukraasid erinevad mitme tunnuse poolest. Näiteks, grampositiivsete bakterite levaansukraasid vajavad katalüütiliseks aktiivsuseks spetsiifiliselt Ca^{2+} ioone (Meng ja Fütterer, 2003; van Hijum *et al.*, 2004). Arvatakse, et kaltsium seob valgu erinevaid osi, stabiliseerides nii selle struktuuri. Seetõttu lisatakse grampositiivsete bakterite levaansukraaside uurimisel puhvritele kaltsiumkloriidi (Meng ja Fütterer, 2003).

Levaansukraasid kui eksoensüümid eksporditakse rakust välja. Selleks on grampositiivsete bakteritel valgu N-terminuses signaalpeptiid, mis membraani läbimisel ära lõigatakse (vt. Tabel 1). Grampositiivsete bakterite levaansukraaside C-terminaalne osa on seotud rakukesta külge erilise ankurdomeeni vahendusel (Tieking *et al.*, 2005; van Hijum *et al.*, 2006). Seega, kuigi ensüüm töötab väljaspool rakku, on ta vähemalt ajutiselt rakukestaga seotud. Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidest on sekretsioonimehhanism tuvastatud vaid *G. diazotrophicus*'e levaansukraasil LscA: 30 aminohappe pikkune N-terminaalne signaalpeptiid lõigatakse ära, kui ensüümi transporditakse periplasmasse. Seal võtab ensüüm oma lõpliku konformatsiooni ja ta kantakse edasi läbi välismembraani ilma edasise proteolüütilise töötlemiseta (Hernandez *et al.*, 1999). Teiste gramnegatiivsete bakterite levaansukraaside sekretsioonimehhanism on senini ebaselge (Li *et al.*, 2006).

Paljude bakterite geene ekspresseeritakse *Escherichia coli*'s, et vastavat valku kontrollitumalt toota. Sel juhul jäävad paljud levaansukraasid tsütoplasmasse või periplasmasse, sest *E. coli*'l puudub sellele valgule sobiv sekretsioonimehhanism. Näiteks kui *Erwinia amylovora* levaansukraasi ekspresseerida *E. coli*'s, siis see paikneb periplasmas (Geier ja Geider, 1993). Sahharoos difundeerub läbi *E. coli* välismembraani aspetsiifiliste pooride periplasmasse, kuid sealt edasi tungida ei saa (Decad ja Nikaido, 1976). Kui levaansukraas sünteesib bakteri periplasmas rohkesti levaani, siis on see rakkudele toksiline ja nad lõhkevad. Seetõttu on sahharoos toksiline näiteks *E. coli* rakkudele, kes sünteesivad *B. subtilis* levaansukraasi, mis paikneb peamiselt periplasmas (Steinmetz *et al.*, 1983). *Z. mobilis*'e levaansukraas jääb *E. coli*'s ekspresseerituna peamiselt tsütoplasmasse ja seetõttu sahharoosi toksilist efekti ei täheldatud (Yanase *et al.*, 1998). Meie töögrupi andmed näitavad, et *P. syringae* DC3000 levaansukraas Lsc3 paikneb *E. coli*'s ekspresseerituna põhiliselt (88% ulatuses) raku tsütoplasmas. Sel juhul ei puutu ensüüm kokku sahharoosiga, periplasmas on levaani tootmine väike ning sahharoos ei ole rakkudele toksiline (Visnapuu *et al.*, 2008).

Tabelis 1 on võrdlevalt ära toodud mõnede grampositiivsete ja -negatiivsete bakterite levaansukraaside suurused (pikkus aminohapetes, ah, ja molekulmass, kDa), valkude tähistused

ja N-terminaalse signaalpeptiidi esinemine. Tabelist 1 on näha, et üldiselt on levaansukraasid gramnegatiivsetel bakteritel palju väiksemad, kui grampositiivsetel bakteritel.

Tabel 1. Gramnegatiivsete ja -positiivsete bakterite levaansukraaside aminohappelise järjestuse pikkused, N-terminaalse signaali olemasolu ja valkude molekulmassid

(<http://www.cazy.org/fam/GH68.html>; http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=2.4.1.10)

Bakter	Valgu tähistus	Valgu pikkus (ah)	Molekulmass (kDa)	Signaal-peptiid
Gramnegatiivsed bakterid				
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	LsdA	584	63.5	+
<i>Rahnella aquatilis</i>	LsrA	415	45.9	-
<i>Zymomonas mobilis</i>	LevU	423	46.8	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola	3 Lsc'd	415 (1), 431 (2)	47.6	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. glycinea	LscA, B, C	415 (LscA); 431 (LscB, C)	45.8 (LscA); 47.6 (LscB, C)	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato*	Lsc1, 2, 3	415 (Lsc2); 431 (Lsc1, 3)	45.8 (Lsc2); 47.7 (Lsc1, 3)	-
Grampositiivsed bakterid				
<i>Streptococcus mutans</i>		795	87.4	+
<i>Streptococcus salivarius</i>	Ftf	969	103.9	+
<i>Bacillus subtilis</i>	SacB	473	53	+
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.392	FtfA	879	94.9	+
<i>Lactobacillus reuterii</i>	Lev	804	87.6	+

*Visnapuu *et al.*, 2008.

Grampositiivsetel bakteritel toimub levaansukraasi süntees ainult keskkonnas, kus on olemas sahharoosi või rafinoosi (Robrish *et al.*, 1972; Wenham *et al.*, 1979; Tang *et al.*, 1990). Seega on ensüümi süntees substraadiga indutseeritav. Gramnegatiivsetel bakteritel ei ole levaansukraasi süntees ensüümi substraadiga indutseeritav (Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Samas on näiteks tõestatud, et *E. amylovora* levaansukraasi ekspressiooni reguleeritakse hulगतunnetamisega (Geier ja Geider, 2003) ja psührofiilse taimepatogeeni *P. syringae* levaansukraasi süntees on sõltuv temperatuurist (Li *et al.*, 2006).

1.4 Levaansukraaside substraadispetsiifika

Paljude bakterite levaansukraasid on lisaks sahharoosile (α -D-Glcp-(1→2) β -D-Fruf; **GF**) võimelised substraadina kasutama ka rafinoosi (α -D-Galp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→2) β -D-Fruf; **GalGF**) ja stahhüoosi (α -D-Galp-(1→6)- α -D-Galp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→2)- β -D-Fruf; **GalGalGF**), mille molekulide ühisosa on alla joonitud. Näiteks rafinoosi kasutamisel liidetakse

rafinoosist eraldatud fruktoos teisele rafinoosi molekulile, mis toimib fruktosüüli aktseptorina, ja kõrvalproduktina vabaneb melibioos (α -D-Galp-(1→6)-D-Glc; **GalG**) (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/>).

Peamiseks substraadiks, mille kasutamist levaansukraasidel on uuritud, on sahharoos. Rafinoosi ja stahhüoosi kasutamist substraadina on seni suhteliselt vähe uuritud. Rafinoosi kasutamise võime on kirjeldatud *Z. mobilis*'e, *P. syringae* pv. tomato, *L. reuteri*, *Arthrobacter* sp ja *B. subtilis*'e levaansukraasidel. *Z. mobilis*'e ja *B. subtilis*'e levaansukraasid kasutavad substraadina ka stahhüoosi (Yanase *et al.*, 2002; Baciú *et al.*, 2004). Parimaks substraadiks *Z. mobilis*'e ensüümile on rafinoos: aktiivsus rafinoosiga, mõõdetuna redutseeriva suhkru tekke järgi, on 117% võrreldes tema aktiivsusega sahharoosi ja stahhüoosiga. On näidatud, et *Z. mobilis*'e levaansukraas sünteesib võrreldes sahharoosiga rafinoosist efektiivsemalt ka levaani, vahe oli eriti märgatav substraatide madalal kontsentratsioonil reaktsioonikeskkonnas (Andersone *et al.*, 2004). Ka *P. syringae* pv. tomato DC3000 Lsc2 ja Lsc3 valgud kasutavad substraadina rafinoosi. Lsc3 koguaktiivsus on rafinoosiga umbes poole madalam kui sahharoosi puhul. See tuleneb sellest, et ensüümi afiinsus sahharoosile on poole suurem, kui rafinoosile, K_m vastavalt 20.6 mM ja 41.3 mM (Visnapuu *et al.*, 2008; Tabel 2). Erinevalt Lsc2 ja Lsc3 valgudest, kasutab *P. syringae* pv. phaseolicola levaansukraas substraadina ainult sahharoosi, rafinoosi ta kasutada ta ei suuda (Hettwer *et al.*, 1995). Ka grampositiivsete bakterite, näiteks *L. reuteri* levaansukraasid suudavad kasutada rafinoosi (van Geel-Schutten *et al.*, 1999). Sarnaselt *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valguga, on bakteri *Arthrobacter* sp levaansukraasi koguaktiivsus rafinoosiga 61% koguaktiivsusest (Fujita *et al.*, 1990).

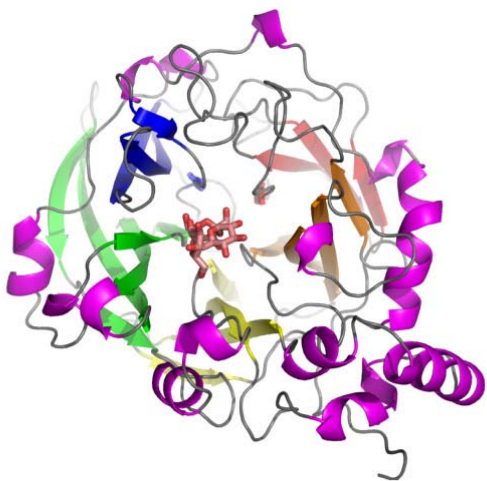
Tabel 2. Levaansukraaside afiinsused sahharoosile

Bakter	K_m (mM)	Viide
Grampositiivsed bakterid		
<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	7.0	van Hijum <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus subtilis</i>	4.0	Chambert <i>et al.</i> , 1991
<i>Streptococcus salvarius</i>	5.0	Song <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus megaterium</i>	6.6	Homann <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.392	13.1	Homann <i>et al.</i> , 2007
Gramnegatiivsed bakterid		
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 (Lsc3)	20.6	Visnapuu <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomas syringae</i> pv. phaseolicola	160.0	Hettwer <i>et al.</i> , 1995
<i>Zymomonas mobilis</i> 113S	51.5	Andersone <i>et al.</i> , 2004
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	11.8	Hernandez <i>et al.</i> , 1995

Tabelist 2 on näha, et grampositiivsete bakterite levaansukraasid seovad sahharoosi substraadina paremini, kui gramnegatiivsete bakterite ensüümid. Ka ei varieeru nende K_m väärtused eriti suurtes piirides, jäädes vahemikku 4-16 mM. Kõige afiinsem sahharoosile on *B. subtilis*'e levaansukraas – $K_m = 4$ mM (Chambert ja Petit-Clatron, 1991). Gramnegatiivsetel bakterite levaansukraaside afiinsused sahharoosile erinevad väga suurel määral. Kõige madalama afiinsusega on *P. syringae* pv. *phaseolicola* levaansukraas, mille K_m sahharoosile on 160 mM ja kõige suurema afiinsusega *G. diazotrophicus*'e levaansukraas (K_m sahharoosile ~12 mM).

1.5 Levaansukraaside struktuur ja reaktsioonimehhanism

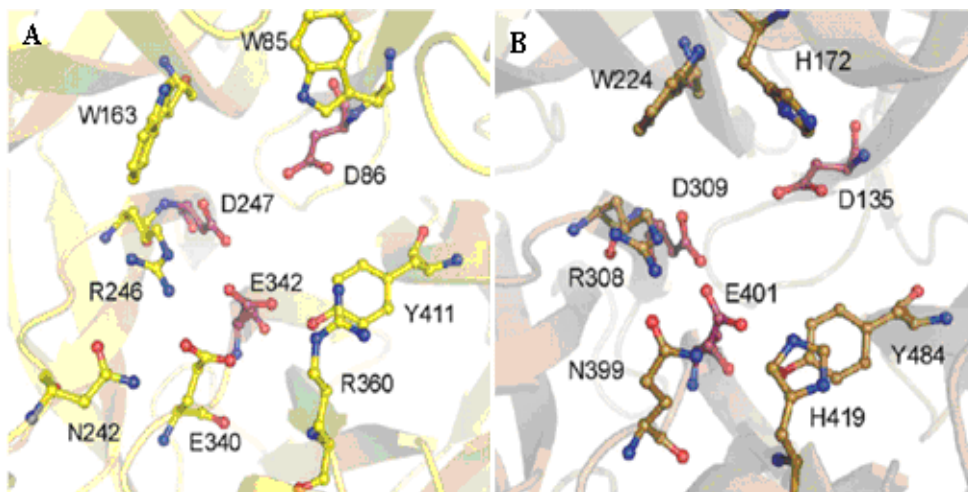
Kuigi levaansukraasid on erineva aminohappelise pikkuse ja molekulmassiga, on neil sarnane struktuur ja aktiivtsenter. Praeguseks on valgu kristallstruktuuri kirjeldatud *B. subtilis*'e ja *G. diazotrophicus*'e levaansukraasidel (Meng ja Fütterer, 2003; Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Levaansukraasi kristallstruktuur näitab, et valgul on viielabalise β -propelleri topoloogia (Joonis 4). Iga propelleri laba koosneb neljast antiparalleelsest β -lehest. Propelleri „lehtri“ põhjas on negatiivselt laetud (happeline) tasku, kuhu seostub substraat, näiteks sahharoos või rafinoos (Meng ja Fütterer, 2003). Esimesena kirjeldati sellist propellerstruktuuri bakteri *Cellvibrio japonicus* α -L-arabinanaasil (Nurizzo *et al.*, 2002).



Joonis 4. *B. subtilis*'e levaansukraas kompleksis rafinoosiga. Nooltega on tähistatud valgu β -lehed, mis moodustavad propelleri labad, spiraalid tähistavad α -heelikseid (Meng ja Fütterer, 2008).

Martinez-Fleites ja kaastöötajad (2005) uurisid *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi LsdA kristallstruktuuri ja võrdlesid seda *B. subtilis*e levaansukraasi omaga. Need kaks valku on omavahel aminohappeliselt järjestuselt 26% identsed. β -lehtede ja enamike α -heeliksiite paiknemine on aga mõlemal valgul sarnane (vt. Lisa 1).

Kolm olulist happelist aminohapet (nimetatud ka katalüütiliseks kolmikuks), mis osalevad substraadi sidumises ja katalüüsis, on konserveerunud kõigis seni uuritud levaansukraasides, aga ka näiteks invertaasides ja eksoinulinaasides (Lammens *et al.*, 2009). Nende aminohapete positsioonid *G. diazotrophicus*'e LsdA valgul on Asp135 (nukleofiil), Asp309 (stabiliseerija, paikneb RDP motiivis ja moodustab vesiniksidemeid substraadi Fru-jäägiga) ja Glu401 (alus-hape katalüüsija). Nukleofiil ja alus-hape katalüüsija osalevad otseselt glükosiidsideme lagundamises ja uue sünteesis. *B. subtilis*'e levaansukraasi valgus paiknevad vastavates positsioonides Asp86, Asp247 ja Glu342 (vt. Joonis 5).



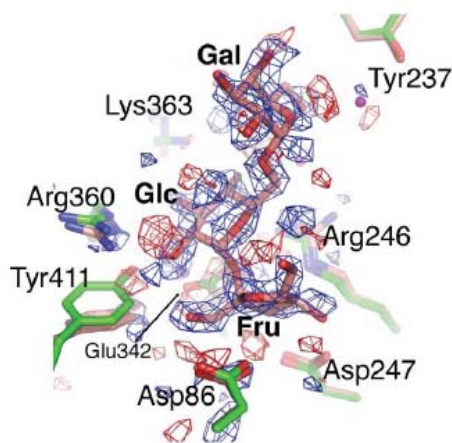
Joonis 5. Katalüütilise kolmiku aminohapped (tähistatud punaselt) *B. subtilise* (A) ja *G. diazotrophicus*'e (B) levaansukraasis. Valkude tunnuskoodid PDB andmebaasis vastavalt 1OYG ja 1W18 (Lammens *et al.*, 2009).

Need kolm katalüüsis olulist happelist aminohapet paiknevad levaansukraaside propelleri labade esimestel (sisemistel) β -lehtedel. Aktiivtsentri osa, mis osaleb sahharoosi glükoosijäägi sidumises, paikneb propelleri labade teise ja kolmanda β -lehe vahelises piirkonnas (Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Selles aktiivtsentri piirkonnas paikneb LsdA puhul näiteks His419. Homoloogilistes positsioonides *B. subtilis*'e levaansukraasis on Arg360 ja *Z. mobilis*'el His296, mis on olulised transfruktosüülimisreaktsioonis (Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Lammens *et al.*, 2009; vt. ka Joonis 5).

Grampositiivsete bakterite (näiteks *B. subtilis*'e) levaansukraasides on leitud konserveerunud ala Ca^{2+} sidumiseks. See on vajalik valgu konformatsiooni hoidmiseks. LsdA valgu stabiliseerimine toimub disulfiidsillaga, mis paigutub valgu mudelil samasse piirkonda, kuhu Ca^{2+} -vahendatud sild *B. subtilis*'e levaansukraasil (Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Selles stabiliseeritavas piirkonnas

paikneb üks kolmest võtmeasukoormil olevast katalüütilisest aminohappest Glu401 (LsdA) ja Glu342 (*B. subtilis*'e levaansukraas) konserveerunud piirkonnas D(E/Q)(T/I/V)ER (Meng ja Fütterer, 2003).

B. subtilis'e levaansukraasi kristalliseerimine kompleksis sahharoosiga ja rafinoosiga (Meng ja Fütterer, 2008) võimaldas identifitseerida aminohappeid, mis seostuvad sahharoosi fruktoosi jäägiga (aktiivtsentri piirkond -1) ja glükoosi jäägiga (+1 piirkond). +1 piirkond on vähem spetsiifiline ja sinna võib seonduda ka fruktoos. *B. subtilis*'e levaansukraasis (Ozimek *et al.*, 2006) osalevad seostumispiirkonna -1 loomises aminohapped Trp85, Asp86, Trp163, Arg246 ja Asp247, piirkonna +1 moodustumises aga aminohapped Arg246, Glu340, Glu342 ja Arg360.



Joonis 6. Rafinoosiga seotud *B. subtilis*'e levaansukraas. Näidatud on aminohapped, mis on kontaktis rafinoosi erinevate osadega: fruktoosiga (Fru), glükoosiga (Glc) ja galaktoosiga (Gal) (Meng ja Fütterer, 2008).

Levaansukraasi reaktsiooni sahharoosiga on kirjeldatud järgmiselt. Sahharoos siseneb propelleri põhjas asuvasse tunnelitaolisesse aktiivtsentrisse, fruktoosijääk ees ja seostub piirkondadesse -1 (Fru jäägiga) ja +1 (Glc jäägiga). Glükosiidside Fru ja Glc vahel katkeb, Fru seotakse kovalentselt ensüümiga piirkonda -1 ja Glc vabaneb tunneli kaudu. Seejärel saavad tunnelisse siseneda Fru jäägi aktseptorid: vesi või teine sahharoosi molekul. Seostumine toimub piirkondades +1 (Fru jääk) ja +2 (Glc jääk). Fru jääk kantakse üle kas veele (hüdrolüüsireaktsioon) või sahharoosile (moodustub kestoos). Tunnel vabastatakse ja uus sahharoosi molekul saab siseneda aktiivtsentrisse (Ozimek *et al.*, 2006; vt. ka Joonis 1).

1.6 Levaansukraaside uurimine mutantide abil

1.6.1 Mutageniseerimise moodused

Levaansukraaside katalüüsis oluliste aminohapete määratlemiseks on kasutatud levaansukraasi valku kodeeriva geeni kas juhuslikku või suunatud mutageneesi. Suunatud mutageneesiga on

võimalik geenis välja vahetada mõnda konkreetset aminohapet kodeeriv koodon, et valgus toimuks asendus soovitud aminohappega ning seejärel uurida muudetud järjestusega valgu omadusi. Suunatud mutageneesiks on enamasti kasutatud erinevaid kommertsiaalseid süsteeme, näiteks QuikChange® (Stratagene), milles mutatsioon viiakse sisse spetsiifilise muteeriva oligonukleotiidse praimeriga (Senthikumar *et al.*, 2003), kuid on kasutatud ka mittekommertsiaalset nn „megaprimeri“ meetodit (Li *et al.*, 2008). Suunatud mutageneesi on kasutatud *B. subtilis*'e, *B. megaterium*'i, *Z. mobilis*'e ja *G. diazotrophicus*'e levaansukraaside uurimisel (Batista *et al.*, 1999; Yanase *et al.*, 2002; Homann *et al.*, 2007; Ortiz-Soto *et al.*, 2008).

Juhusliku mutageneesiga muudetakse valku kodeerivat geeni kas *in vitro* või *in vivo* ja rekombinantsete bakterite fenotüübi alusel selekteeritakse välja variandid, mida lähemalt uuritakse. Mutatsiooni asukoht geenis tuvastatakse sekveneerimisega. Näiteks Yanase töögrupp (2002) tegi *in vitro* juhusliku mutageneesi *Z. mobilis*'e levaansukraasile, kasutades mutageenina 2 M lämmastikhapet. Selleks kloonitati ensüümi kodeeriv geen plasmiidsesse vektorisse ja plasmiidset DNA'd inkubeeriti lämmastikhappega. Muteeritud DNA puhastati, levaansukraasi kodeeriv insert kloonitati ümber uude plasmidi ja transformeeriti *E. coli*'sse. Rekombinantseid *E. coli* kolooniaid jälgiti selektiivsöötmetel lima (levaani) tekke järgi sahharoosist ja sahharoosi hüdrolüüsi järgi tetrasooliumkloriidi (TTC) sisaldaval söötmel. Kuna *E. coli* ei ole ise võimeline sahharoosi metaboliseerima (Reid ja Abratt, 2005) on selline süsteem hästi sobilik muteerunud levaansukraaside isoleerimiseks. Huvitava fenotüübiga rekombinantsetest kolooniast eraldati DNA ja tekkinud mutatsioonid tuvastati sekveneerimisega (Yanase *et al.*, 2002). Sangiliyandi ja Gunasekaran (2001) muteerisid *Z. mobilis*'e levaansukraasi geeni sisaldavat plasmidi *in vitro* 1 M hüdroksüülamiiniga ja transformeerisid saadud muteeritud plasmiidse DNA *E. coli*'sse. Antud töös isoleeriti mitu mutanti, millel sahharoosi hüdrolüüsiv võime oli säilinud, kuid levaani sünteesivõime oli kadunud.

1.6.2 Mutantsete levaansukraaside uurimine

Kõige rohkem on mutageniseeritud *Zymomonas mobilis*'e levaansukraasi. *Z. mobilis* on etanoolkääritaja, kes kasutab substraatidena sahharoosi, glükoosi ja fruktoosi. Kui teda kasvatada sahharoosil, siis alaneb etanooli saagis, sest levaansukraas konverteerib osa sahharoosi levaaniks. Seetõttu on uuritud, kuidas oleks võimalik *Z. mobilis*'e levaansukraasil kaotada levaani sünteesi võimet. Sangiliyandi ja Gunasekaran (2001) näitasid juhusliku mutageneesiga saadud mutantidel, et levaani sünteesivõime oli kadunud valkudel, milles oli toimunud kahe aminohappe

asendumine (Phe102→Leu ja Trp261→Lys). Phe102 võiks asuda valgu piirkonnas β-ID (propelleri esimese laba välimine β-leht), kui võtta arvesse levaansukraaside joondamist (vt. Joonis 9) ja *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi sekundaarstruktuuri (Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Lisa 1). Trp261 on konserveerunud gramnegatiivsete bakterite levaansukraasides (vt. Joonis 9). *G. diazotrophicus*'e levaansukraasis vastab sellele piirkonnale β-IIID (propelleri kolmanda laba välimine β-leht). V. Senthikumar jt. (2003) asendasid *Z. mobilis*'e levaansukraasis tsüsteiini jäägid seriinidega, et uurida tsüsteiinide vajalikkust ensüümi funktsioonile. Need aminohapped ei asu valgu konserveerunud piirkonnas. Kõigis mutantides langes sahharoosi hüdroolüüs umbes kaks korda ja levaani moodustamise võime kadus täiesti, võimalik et konformatsiooniliste muutuste tõttu. Järelikult on tsüsteiini jäägid olulised valgu konformatsiooni hoidmiseks, mis võimaldab fruktoosijääkide polümeriseerimist (Senthikumar *et al.*, 2003).

Z. mobilis'e levaansukraasil näidati juhusliku mutageneesiga Glu278 ja suunatud mutageneesiga Asp194 olulisust sahharoosi hüdroolüüsi reaktsioonis (Yanase *et al.*, 2002). Levaansukraaside joonduse alusel (Joonis 9) vastavad need aminohapped alus-hape katalüüsijale (Glu278) ja sahharoosi seostumise stabiliseerijale RDP motiivis (Asp194). *Z. mobilis*'e levaansukraasi polümeriseerumivat võimet mõjutab aminohapete Val223, Gln339, Pro340, Glu211, His296 muteerimine. Kui need aminohapped välja vahetada, siis langeb oluliselt transfruktosüleerimise aktiivsus, samas säilib hüdroolüüsimisvõime (Yanase *et al.*, 2002).

G. diazotrophicus'e levaansukraasil muudeti kohtspetsiifilise mutageneesi teel Asp309 asparagiiniks ja sellega kaasnes ensüümi katalüütilise koguaktiivsuse järsk langus (75 korda). Asp309 kuulub samuti konserveerunud RDP (Arg-Asp-Pro) motiivi. Ensüüm oli võimeline sahharoosi siduma, kuid polnud võimeline seda hüdroolüüsima (Batista *et al.*, 1999).

Suunatud mutageneesiga on näidatud, et levaansukraaside polümeriseerimisvõimes on väga olulised kas konserveerunud histidiini jäägid (gramnegatiivsete bakterite valkudel) või arginiini jäägid (grampositiivsete bakterite valkudel). Nendeks on His296 (*Z. mobilis*), His419 (*G. diazotrophicus*), Arg360 (*B. subtilis*) ja Arg370 (*B. megaterium*). *Z. mobilis*'e levaansukraasil mõjutas His296 muteerimine tugevasti nii polümeriseerimisvõimet kui ka substraadispetsiifikat (alandas ensüümi afiinsust sahharoosile ja suurendas ensüümi võimet reageerida rafinoosiga) (Yanase *et al.*, 2002). His296 muteermisel moodustab *Z. mobilis*'e levaansukraas peamiselt FOS- e ja pika ahelaga levaani ei sünteesi. Autorid (Li *et al.*, 2008) oletavad, et His296 osaleb fruktosüüli aktseptori äratundmisel ja seostamisel. *B. subtilis*'e levaansukraasi Arg360

muteerimisel alaneb samuti valgu afiinsus sahharoosile, polümeriseerimisvõime ja ensüüm moodustab peamiselt oligosahhariide (Chambert ja Petit-Clatron, 1991; Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Need histidiinid või arginiinid paiknevad levaansukraaside aktiivtsentri +1 piirkonnas, kuhu seondub sahharoosi molekuli glükoosi jääk (Meng ja Fütterer, 2003; Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Arvatakse, et aktiivtsentri selles piirkonnas on oluline positiivne laeng (His- ja Arg-jäägid) ja elektrone hajutav keskkond. Seda võiks luua nimetatud piirkonnas paiknev Tyr-jäägi aromaadne tuum, (Tyr484 LsdA ja Tyr411 *B. subtilis*'e levaansukraasi puhul) (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; tähistatud ka Joonisel 5).

Ortiz-Soto jt. (2008) uuris *B. subtilis*'e levaansukraasi stabiilsust ja leidis, et üks vastupidavuse eest vastutav ah on Ser164. Selle aminohappe vahetusalaniiniga muudab ensüümi algsest muteerimata valgust 12 korda stabiilsemaks, aga langeb ensüümi aktiivsus. Ser164 asub propelleri labade teisel β -lehel. Seal ta stabiliseerib kontakti katalüütilise nukleofiilina toimiva aminohappega. Konstrueeritud Ser164 mutantidest oli Ser164alaniiniks muteeritud variant ainuke, millel säilis minimaalne sahharoosi hüdrolüüsi ja levaani polümeriseerimise võime, kuigi katalüütiline aktiivsus oli vähenenud 26 korda (Ortiz-Soto *et al.*, 2008).

Muteerimise tulemusena on selgitatud välja mitmete bakterite levaansukraaside katalüüsis olulised aminohapped. On selgunud, et hüdrolüüsimise ja polümeriseerimise eest vastutavad levaansukraasi aktiivtsentri erinevad piirkonnad ja et valgu stabiliseerimisel on olulised kas disulfiidsillad või Ca-ioonid.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

See bakalaureusetöö on tehtud Eesti Teadusfondi grantiprojekti 7528 raames, milles tegeldakse ka bakteriaalsete levaansukraaside omaduste uurimisega. Tööks püstitati järgmised ülesanded:

1. alustada *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi (Lsc3) aktiivsuses oluliste aminohapete kindlakstegemisega, kasutades *lsc3* geeni juhuslikku mutageniseerimist;
2. muteerida ekspressiooniplasmiidi kloonitud *lsc3* geeni etüülmetaansulfonaadiga, transformeerida DNA *Escherichia coli*'sse ja isoleerida selektiivsõotmeid kasutades muutunud fenotüübiga rekombinantseid kolooniaid;
3. teha kindlaks, kas rekombinantsete bakterite rakuekstrakte saab kasutada levaansukraasi preparaadina fruktooligosahhariidide ja levaani tuvastamiseks reaktsiooniproductide hulgas;
4. iseloomustada väljavalitud mutantseid levaansukraase hüdrofüütilise aktiivsuse, substraadispetsiifika ning sahharoosist sünteesitavate productide spektri alusel;
5. teha kindlaks mutatsiooni asukoht levaansukraasi geeni sekveneerimisega ja ennustada muteeritud piirkonna asukohta valgussekundaarstruktuuris.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutati plasmidi pHIPMalprom-lsc3 (8256 ap) (Visnapuu *et al.*, 2008), mida ekspresseeriti melibiaasnegatiivses *E. coli* tüves RA11r ($\Delta lacZY melA recA$) (Hanatani *et al.*, 1984). Selles plasmiidis on *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi geen (*lsc3*) pärmis *Hansenula polymorpha* maltaasi geeni (*HpMALI*) promootori kontrolli all.

Muteerimiseks kasutati plasmidi pHIPMalprom-lsc3 ning selles töös isoleeritud mutantse levaansukraasiga plasmiidid nimetati pHIPMalprom-lsc3T41I ja pHIPMalprom-lsc3P400L.

2.2.2 Sõotmed ja rakkude kasvatamine

Tansformante kasvatati Luria-Bertani (LB) tard- või vedelsõotmes, kuhu lisati plasmidi selektsiooniks kanamütsiini (Km; 0.1 mg/ml). Vedelkultuure aereeriti loksutil. Sõotmeplaatidele

külvatud *E. coli*'t kasvatati 37 °C termostaadis üleöö. Mutantide selekteerimiseks kasutati LB tardsöödet kanamütsiiniga, kuhu oli lisatud 10% sahharoosi, et jälgida lima (levaani) teket.

2.2.3 DNA eraldamine, klonimine, transformatsioon ja PCR

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati AxyPrep™ Plasmid Miniprep komplekti (Axygen Biosciences, USA) ja vastavat tootjapoolset protokollit.

Mutantseid levaansukraase kodeerivate plasmiidide konstrueerimiseks „lõigati” eelnevalt mutageniseeritud plasmiidsest DNA'st restriктаasidega *Bam*HI ja *Sal*I välja *lsc3* geeni sisaldav fragment. See kloneriti samu restriктаase kasutades vektorisse pHIPMalprom. Kasutati firma Fermentas (Leedu) restriктаase ja kataloogis ettenähtud tingimusi. Vektoriga ligeerimine tehti vastavalt standardmetoodikale (Sambrook *et al.*, 1989).

Restriksioonifragmente ning PCR'i (*Polymerase Chain Reaction*) produkte kontrolliti agarosgeelil. Proovid kanti etiidiumbromiidi (0.5 µg/ml) sisaldavale 1% agarosgeelile 0.5xTAE puhvril (40 mM Tris-atsetaatpuhver, 1mM EDTA; pH 8.2). Elektrofooresiga lahutatud restriksioonifragmentid lõigati geelist välja ja puhastati MO BIO (USA) kitiga, kasutades vastavat standardprotokollit.

Transformatsiooniks kasvatati *E. coli* RA11r tüve rakke 5ml LB söötmes, kuni optiline tihedus (OD₆₀₀) jõudis väärtuseni ~0.5. Rakud muudeti transformatsioonikompetentseteks 0.1 M kaltsiumkloriidiga (Sambrook ja Russell, 2001) ning transformandid selekteeriti 0.1 mg/ml kanamütsiini sisaldaval söötmel.

Levaansukraasi sisaldava fragmendi olemasolu nii *E. coli* transformantides kui ka puhastatud DNA's testiti PCR'iga. Selleks kasutati praimeritepaari Lsc1ja3Fw1 (5'gcatcgccaaagtacg3') ja Lsc3Rev2 (5'tcattggccggtacggaccg3'), mis amplifitseerivad *lsc3* geenist ~550 bp pikkuse fragmendi. Isoleeritud mutantsed levaansukraasid sekveneriti, et selgitada välja vastava mutatsiooni asukoht geenil (vt. 2.2.8).

2.2.4 Keemiline mutageniseerimine ja bakterite elumuse määramine

DNA keemiline mutageniseerimine teostati modifitseeritud Kamal *et al.* (2003) meetodil. *E. coli* tüve RA11r transformante, mis sisaldasid plasmiidit pHIPMalprom-lsc3, kasvatati 30 ml LB söötmes kuni tiheduseni ~2.5-3 (OD₆₀₀). Kultuur jagati 5 ml kaupa katseklaasidesse ja rakud sadestati tsentrifuugimisega 5 minuti jooksul, ~5000 g (4 °C). Rakke pesti steriilse 100 mM fosfaatpuhvriga (pH 7.0) ja suspendeeriti samas puhvril, kuhu oli lisatud etüülmetaansulfonaati

(EMS) lõppkontsentratsiooniga 2%. Suspensioone inkubeeriti mutageeniga erinevat aega (10, 30, 45 ja 60 min) 37 °C termostaadis, neid aeg-ajalt segades. Mutageen inaktiveeriti Na-tiosulfaadi lisamisega (lõppkontsentratsioon 7%). Rakke pesti 2x steriilse fosfaatpuhvriga (100 mM; pH 7.0) ja määrati erinevatel ajapunktidel võetud proovides olevate rakkude elumus.

Rakususpensioonidest tehti lahjendused (10^{-1} - 10^{-4}) ja plaaditi kindlates kogustes välja LB Km söötmeplaatidele. Võrdlusena elumuse määramisel kasutati EMS'iga töötlemata bakterikultuuri. Peale söötmeplaatide inkubeerimist temperatuuril 37 °C loeti kolooniad ja arvatati bakterirakkude elumus protsentides, võrrelduna mutageeniga töötlemata rakkude suhtes. Erinevat aega mutageeniga töödeldud rakud külvati 5 ml LB Km vedelsöötmesse ja kasvatati loksutil temperatuuril 37 °C üleöö. Seejärel pesti mutante fosfaatpuhvriga, suspendeeriti 30% glütseroolilahuses ning säilitati edasiste katsete jaoks temperatuuril -80 °C. Selles töös kasutati materjalina mutantide kogumit, mille puhul elumus pärast mutageniseerimist oli 10%.

2.2.5 Mutantide selektsioon ja isoleerimine

Mutantide saamisel ja selektsioonil kasvatati *E. coli* rakke temperatuuril 37 °C, kui ei ole teisiti märgitud. Glütserooliga säilituskultuurist külvati välja mutageniseeritud *E. coli* transformandid. Rakukultuure lahjendati M9 mineraalsöötmega (Adams, 1959) ja külvati välja 22-le LB Km söötmeplaadile nii, et igal tassil kasvaks ca 600-1600 kolooniat. Moodustunud kolooniad pesti söötmeplaatidelt steriilse destilleeritud veega maha ja neist eraldati plasmiidne DNA (vt. 2.2.3), millega transformeeriti *E. coli* RA11r tüve. Transformandid külvati välja LB Km söötmele, moodustunud kolooniatest külvati 1500 juhusliku valikuna edasi ruutudena LB Km söötmele, kasvatati üles ja tembeldati edasi 10% sahharoosiga LB Km söötmele. Kultuure kasvatati temperatuuril 37 °C üleöö ning järgnevalt 4-5 päeva toatemperatuuril. Klooniidel jälgiti lima (levaani) teket sahharoosist. Võrdluseks külvati neile söötmetele ka *E. coli* RA11r tüved, mis sisaldasid kas plasmidi pHIPMalprom-lsc3 (kodeerib metsiktüüpi levaansukraasi; Visnapuu *et al.*, 2008) või pHIPMalprom (tühi vektor). Vaatluse tulemusena valiti välja 98 mutatsioonikahtlusega rekombinantset kolooniat, millel oli lima teke võrreldes metsiktüüpi levaansukraasi ekspresseeriva tüvega (kontrolliga) vähenenud. Geeni olemasolu transformantides kontrolliti kolooniatel tehtud PCR'iga, mille tulemusena selekteerus edaspidiseks uurimiseks 68 kolooniat. Need kolooniad külvati välja ruutudena LB Km tassidele. Järgnes uus selekteerimine, mille tulemusena valiti välja 20 kolooniat, mis erinesid kontrollist kõige enam. Nendest kolooniatest eraldati plasmiidne DNA, „lõigati“ välja levaansukraasi sisaldav fragment ja kloonitati uuesti ekspressioonivektorisse pHIPMalprom, et vabaneda mutatsioonidest, mis võisid

paikneda vektoris ja sellega mõjutada mutantide valikut. Saadud plasmiidid transformeeriti uuesti *E. coli* RA11r tüvesse (vt. 2.2.3). Mõnedel rekombinantsetel *E. coli* kloonidel taastus sahharoosiga söötmel kontrollvariandiga sarnane lima teke. Ilmselt oli algne mutantne fenotüüp nende kloonide puhul tingitud mutatsioonidest plasmidi selgroos ja nad jäeti edasisest tööst kõrvale. Lõpuks selekteerus välja 4 mutantset klooni, millest kaks tootsid sahharoosist minimaalselt lima ja kahe limaproduksioon oli natuke vähenenud. Neist kolooniatest eraldati plasmiidne DNA, kontrolliti *lsc3* geeni olemasolu PCR'iga ning mutatsioonide asukohta kindlakstegemiseks geenid sekveneeriti (vt. 2.2.8).

2.2.6 Rakuekstraktide tegemine ja levaansukraasi aktiivsuse määramine

E. coli rakud kasvatati ette temperatuuril 37 °C 5 ml LB Km vedelsöötmes, külvati edasi 30 ml LB Km söötmesse algtihedusega ($OD_{600} \sim 0.1$) ja kasvatati hilisesse eksponentsiaalsesse kasvufaasi ($OD_{600} \sim 2.5$). Rakud sadestati tsentrifuugimisega ~ 5000 g 5 min jooksul (4 °C), pesti 5 ml 50 mM K-fosfaatpuhvriga (pH 7.4) ja suspendeeriti 1 ml McIlvaine'i puhvris (0.04 M sidrunhape; 0.13 M Na_2HPO_4 ; pH 6.0) (McIlvaine, 1921). Rakuekstrakti tegemiseks purustati rakud sonikeerimisega. Sonikeeritud rakke tsentrifuugiti 13 700 g 20 min (4 °C) ja supernatanti kasutati rakuekstraktina.

Levaansukraasi koguaktiivsuse määramiseks mõõdeti sahharoosi hüdrolüüsil vabanenud glükoosi hulka, mis on võrdne levaansukraasiga reageerinud sahharoosi hulgaga. Selleks kasutati GLUCOSE Liquicolor'i reaktiivi (Human GmbH, Saksamaa) ja eelnevalt väljatöötatud meetodikat (Visnapuu *et al.*, 2008). Levaansukraasi preparaadina kasutati kas metsiktüüpi või mutantset levaansukraasi geeni ekspresseeriva *E. coli* rakuekstrakti. Reaktsioon viidi läbi temperatuuril 37 °C McIlvaine'i puhvris (pH 6.0), mis sisaldas rakuekstrakti ja 100 mM sahharoosi, ning eralduv glükoosi hulk määrati tootjafirma protokoll järgides. Levaansukraasi koguaktiivsus väljendati sahharoosist vabanenud glükoosi kogusena mikromoolides minutis ühe mg valgu kohta rakuekstraktis (U/mg).

Et võrrelda levaansukraasi võimet hüdrolüüsida sahharoosi ja rafinoosi, määrati sahharoosist ja rafinoosist (mõlemad on mitteredutseerivad suhkrud) vabanevat redutseerivate suhkrute hulka 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNSA) reaktiiviga (Miller, 1959). Reaktsioonisegu sisaldas levaansukraasi ekspresseeriva *E. coli* rakuekstrakti ja 100 mM sahharoosi või 100 mM rafinoosi McIlvaine'i puhvris (pH 6.0) (Visnapuu, 2007). Ensüümiaktiivsus väljendati sahharoosist või rafinoosist 1 min jooksul moodustunud redutseerivate suhkrute kogusena mikromoolides 1 mg

valguga rakuekstraktis (U/mg). Valgu kontsentratsiooni määramiseks rakuekstraktist kasutati Lowry (1951) meetodit.

Reaktsioonisegu levaansukraasi hüdroolüüsiva ja polümeriseeriva aktiivsuse hindamiseks sisaldas McIlvaine'i (pH 6.0) puhvrit, 1200 mM sahharoosi ja levaansukraasi sisaldavat rakuekstrakti (0.3 või 0.6 U/ml). Reaktsioon viidi läbi temperatuuril 37 °C 20 h jooksul ja lõpetati proovide kuumutamiseks 5 min jooksul temperatuuril 96 °C. Reaktsioonisegus määrati ensümaatilisel meetodil (kasutati heksokinaasi, heksoosfosfaadi isomeraasi ja glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaasi) glükoosi ja fruktoosi hulka, mille vahe kaudu saab arvutada välja levaansukraasi polümeriseerivat aktiivsust (Schmidt, 1961; Toomemaa, 2007)

2.2.7 Õhukese kihi kromatograafia ja plaadilt elueeritud produktide analüüs

Levaansukraasi reaktsiooniproduktide spektrit uuriti samades 20 tundi 1200 mM sahharoosiga inkubeeritud proovides, millest määrati levaansukraasi polümeriseerivat aktiivsust (vt. 2.2.6). Produktide lahutamiseks kasutati õhukese kihi kromatograafiat (*Thin Layer Chromatography* – TLC). 0.5 µl proovi (reaktsioonisegu) kanti koos sama ruumala markeritega kontsentreeriva tsooniga TLC plaadi stardijoonele (Silica gel 60 F254; Merck, Saksamaa). Markeriteks kasutati 2% levaani, 25 mM kestoosi ja nüstoosi, 0.1 M fruktoosi ja sahharoosi ja 4% kommertsiaalseid oligofruktaanide segusid Orafiti[®]P95 (P95) ja 4% Orafiti[®]Synergy1 (Synergy1) firmalt Orafiti (Tienen, Belgia).

Suhkrud lahutati plaatidel voolutiga kloroform-metanol-vesi (90:65:15) (Tajima *et al.*, 2000). Fruktoosi sisaldavate produktide detekteerimiseks kasteti plaat urea reaktiiviga (3% urea, 1 M fosforhape veega küllastatud butanoolis) ja kuumutati temperatuuril 120 °C kuni suhkrulaikude värvumiseni (~10 minutit) (Trujillo *et al.*, 2004).

Õhukese kihi kromatograafia (TLC) plaatidelt destilleeritud veega elueeritud mitteliikuvale fraktsioonil (levaanil) määrati polümerisatsiooni aste (keskmine DP). Levaan hüdroolüüsiti 10% soolhappes 1 h jooksul temperatuuril 85 °C. Pärast neutraliseerimist Na-hüdroksiidiga määrati proovides ensümaatilisel glükoosi ja fruktoosi sisaldus (Toomemaa, 2007).

2.2.8 Sekvencerimine

Isoleeritud mutantsed *lsc3* geenid sekvenceriti, et kindlaks teha mutatsiooni asukoht. Selleks kasutati BigDye[®] (Applied Biosystems, Kanada) kitti ja tootja poolt soovitatud meetodikat. Eelnevalt valmistati PCR produkt praimeritepaariga MAL30 (5'tataagaccttcgctc3') ja

Lsc1ja3Rev1 (5'tgcgcttcggttgataatagg3'), millega amplifitseeriti 730 ap pikkune DNA lõik, mis sisaldab *lsc3* geeni ala esimest poolt. Levaasukraasi geeni teine pool (950 ap) paljundati praimeritega Lsc1ja3Fw1 (5'gcgatcgccaaagtacg3') ning Lsc3RevSalI. PCR produktidele tehti ExoI-SAP ensümaatiline töötlus, kus reaktsioonisegusse lisati aluseline fosfataas (*Shrimp Acid Phosphatase* – SAP; Fermentas) ja eksonukleas ExoI (Fermentas), et lagundada praimerid ja algne DNA. Seejärel DNA sadestati ja valmistati reaktsioonisegu vastavalt tootjapoolsetele soovitusetele. Proovid sekveneeriti ABI 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, Kanada) sekvenaatori abil.

2.2.9 Valkude joondamine, mutatsioonide ja sekundaarstruktuuri analüüs

Levaansukraaside valgujärjestuste joondamiseks kasutati programmi BioEdit moodulit Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Valkude sekundaarstruktuuri ennustamine tehti Soft Berry veebilehel (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=sspred&group=programs&subgroup=propt>) kättesaadava programmi SSPRED (Mehta *et al.*, 1995) abil. Järjestuste vaatlemiseks, transleerimiseks ja plasmiidide virtuaalseks klonerimiseks kasutati programmi PlasmidDraw (<http://www.geocities.com/acaclone/>).

2.2 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Levaansukraasi juhuslik mutageniseerimine, mutantide selektsioon ja sekveneerimine

Levaansukraas on ensüüm, mis hüdrolyüsib glükosiidsidet sahharoosis ja polümeriseerib eraldatud fruktoosi jäägid levaaniks. *P. syingae* pv. tomato DC3000 genoomis on kolm levaansukraasi valku kodeerivat geeni: *lsc1*, *lsc2* ja *lsc3* (Visnapuu *et al.*, 2008). Selles töös oli uurimisobjektiks Lsc3 valk. Eelnevalt oli meie töögrupi poolt konstrueeritud Lsc3 valgu ekspressiooniplasmiid pHIPMalprom-lsc3, mis võimaldas saavutada väga kõrget levaansukraasi ekspressiooni taset *E. coli*'s. Levaansukraasi eriaktiivsus rakuekstraktis oli kõrge ja Lsc3 valk moodustas raku valkudest olulise osa – kuni 20% (Visnapuu *et al.*, 2008). Leiti, et Lsc3 on võimeline kasutama substraadina lisaks sahharoosile ka rafinoosi ning stahhüoosi ning et ensüümi afiinsus sahharoosile on ligi kaks korda suurem kui teistele substraatidele (Visnapuu, 2007). Varem on näidatud, et Lsc3 valk sünteesib lisaks pika ahelaga levaanile ka väiksemaid fruktooligosahhariide polümerisatsiooniastmega (DP) kuni 5, millel võiks eeldada prebiootilist toimet (Visnapuu *et al.*, 2009).

Valkude uurimiseks kasutatakse tihti mutageneesi, kas juhuslikku või kohtsuunatud (vt. ka pt. 1.6.1). Selle abil saab kindlaks teha valgu funktsioonis olulisi aminohappeid ja piirkondi.

Käesolevas töös keskenduti *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi Lsc3 mutantide saamisele juhusliku keemilise mutageneesiga ja nende esialgsele iseloomustamisele.

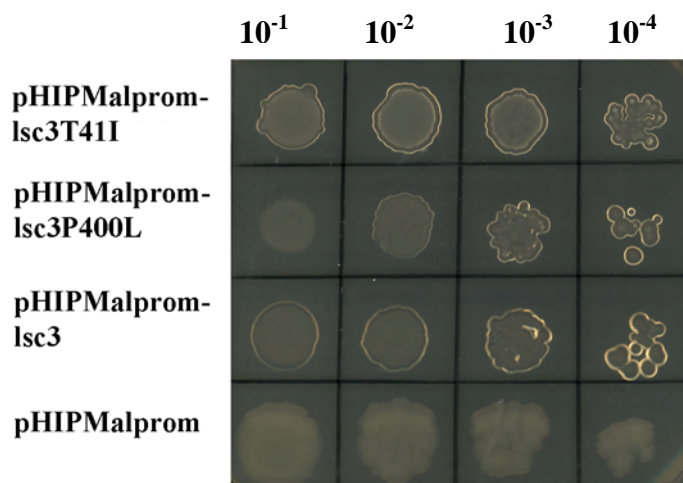
Mutageeninina kasutati alküülivat ühendit etüülmetaansulfonaati. Mutandid tekitati ja selekteeriti, nagu on kirjeldatud osas 2.2.4. Algselt valiti ligi 1500 mutageniseeritud rekombinantse *E. coli* RA11r kloni hulgast 100 huvipakkuvat. *E. coli* RA11r ei suuda kasutada ei sahharoosi ega rafinoosi. Sahharoosi või rafinoosi sisaldaval LB tardsöötmel lähevad limaseks need kloonid, mis sisaldavad plasmiidil polümeriseerimisvõimelist levaansukraasi kodeerivat geeni. Eeldasime, et muteerunud levaansukraasidel võiks polümeraasne aktiivsus olla vähenenud – seega otsisime kloonide, mis ei suuda sahharoosist või rafinoosist lima moodustada või millel limateke on võrreldes kontrolliga vähenenud (vt. Joonis 7).



Joonis 7. Mutantseid levaansukraase sisaldavate *E. coli* RA11r kloonide selekteerimine 10% sahharoosi sisaldaval LB Km söötmel. Osa kloonide on limase fenotüübiga, osa mitte.

Levaansukraasi geeni olemasolu kloonidel kontrolliti PCR'iga (vt. 2.2.3). Selgus, et mitte kõik kolooniad ei andnud PCR'i produkti, ja seleksiooni jätkati 68 klooniga. Nendest kloonidest eraldati plasmiidne DNA ja levaansukraasi sisaldav fragment kloneeriti uuesti vektorisse pHIPMalprom, millega transformeeriti *E. coli* tüve RA11r, et vabaneda mutatsioonidest vektori *lsc3* geeni mittesisaldavas alas (vt. 2.2.3). Testides kloonide uuesti, valiti välja 4 mutanti, millest kaks tootsid sahharoosist minimaalselt lima ja kahe limaproduktioon oli võrreldes algse tüvega mõnevõrra vähenenud. Nendest kloonidest eraldatud plasmiididel määrati *lsc3* geeni järjestus, et teha kindlaks mutatsiooni asukoht. Neljast väljavalitud levaansukraasi kloonist oli kahel metsiktüüpi ehk muteerumata levaansukraasi järjestus. Kahel kloonil tuvastati *lsc3* geenis

punktmutatsioon, mille tulemusena toimus valgus aminohappe vahetus. Ühel mutandil oli Lsc3 valgus Thr positsioonis 41 asendunud Ile-ga (T41I), teisel mutandil oli Pro400 muutunud Leu-ks (P400L). Mutandil P400L oli toimunud veel üks mutatsioon (GTA koodon asendus GTG koodoniga), mis aga kodeeritavat aminohapet (Leu) ei muutnud. Mutantseid levaansukraase sisaldavad plasmiidid tähistati vastavalt pHIPMalprom-lsc3T41I ja pHIPMalprom-lsc3P400L. Nimetatud kahe mutandi levaani sünteesi võimet iseloomustab Joonis 8. Mutantseid levaansukraase ekspresseerivatel *E. coli* RA11r transformantidel on oluliselt vähenenud lima tootmise võime, eriti mutandil T41I.



Joonis 8. Mutantsete levaansukraaside iseloomustamine rekombinantsete *E. coli* RA11r kloonide kasvuomaduste kaudu. Transformantide suspensioonidest algtihedusega OD₆₀₀=0.3 tehti lahjendused 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ja 10⁻⁴ ja külvati 5 µl täppidena LB Km agarsöötmele, mis sisaldas 10% sahharoosi. Transformandid sisaldasid plasmide pHIPmalprom (tühi vektor), pHIPMalprom-lsc3 (kodeerib algset muteerimata Lsc3 valku), pHIPMalprom-lsc3T41I ja pHIPMalprom-lsc3P400L (kodeerivad mutantseid aminohapete vahetusega levaansukraase).

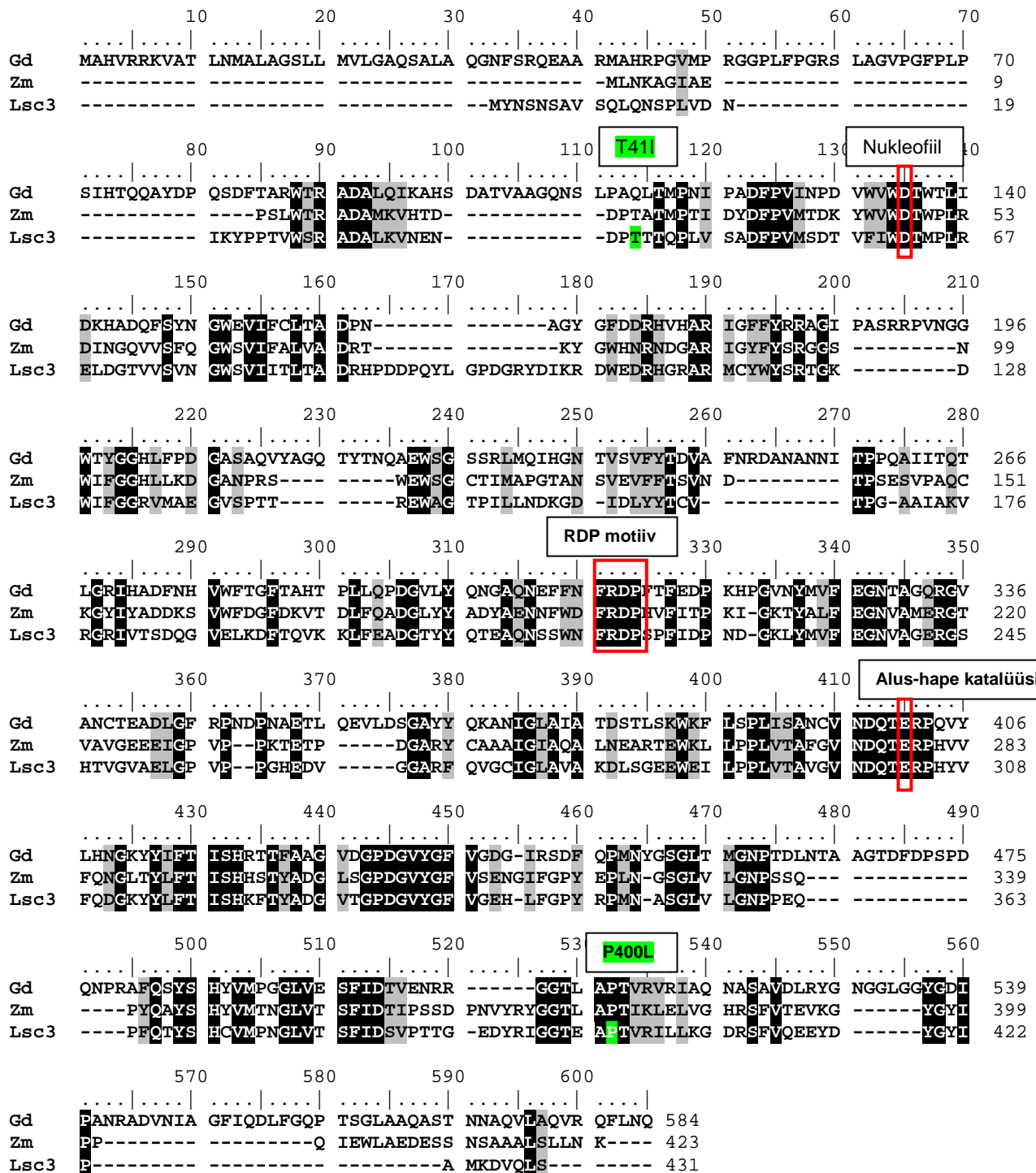
2.3.2 Lsc3 valgu joondamine teiste gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidega, valkude sekundaarstruktuuri ja muteerunud aminohapete paiknemise ennustamine Lsc3 valkudel

Et võrrelda *P. syringae* DC3000 Lsc3 valgu järjestuse alusel teiste bakterite levaansukraasidega, võeti CAZY andmebaasist (<http://www.cazy.org/fam/GH68.html>) gramnegatiivsete bakterite *Z. mobilis*'e ja *G. diazotrophicus*'e levaansukraaside järjestused ja joondati Lsc3 valgu järjestusega (Visnapuu *et al.*, 2008), kasutades programmi BioEdit Clustal W moodulit.

Z. mobilis'e levaansukraasi on palju uuritud ja muteeritud (Yanase *et al.*, 2002), *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi kohta on aga olemas kristallstruktuur ning ka selle ensüümi

funktsiooni on mutatsioonanalüüsiga uuritud (Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Valkude joendus on esitatud Joonisel 9.

Jooniselt on näha, et gramnegatiivsete bakterite levaasukraasid joonduvad omavahel hästi – neil on palju sarnaseid piirkondi. Joonisel on tähistatud konserveerunud katalüütilise kolmiku aminohapped: nukleofiil, aspartaat RDP motiivis, mis osaleb Fru jäägi seostumisel stabiliseerijana ja alus-hape katalüüsija (Laemmens *et al.*, 2009). *G. diazotrophicus*'e LsdA valgus on need aminohapped vastavalt Asp135, Asp309 ja Glu401 (vt. Joonis 9). Vastavalt LsdA valgu kristallstruktuurile ja Joonisel 9 näidatud joendusele, võiks Lsc3 valgus mutatsiooni T41I toimumise koht olla N-terminuse lähedal paiknevas α -heeliksis. LsdA valgus on vastavas piirkonnas lühike kolmeaminohappeline (AQL) α -heeliks enne β -propelleri esimest laba. Selle laba sisemisel β -lehel paikneb katalüütiline nukleofiil Asp-135 (Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Lsc3 valgu mutatsioon P400L lokaliseerub valgu C-terminaalsesse osasse. LsdA valgus paikneb selles piirkonnas β -propelleri viies laba (Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Nimetatud proliini jääk on konserveerunud nii grampositiivsete kui ka -negatiivsete bakterite levaansukraasides (Meng ja Fütterer, 2003; Martinez-Fleites *et al.*, 2005).



Joonis 9. Lsc3 valgu joendus gramnegatiivsete bakterite (*Zm*, *Z. mobilis*; *Gd*, *G. diazotrophicus*) levaansukraasidega. Joendus tehti programmiga Clustal W. Valkude omavahelised identsed positsioonid on näidatud mustal taustal, sarnased hallil taustal. Katalüüsis olulised aminohapped ja Lsc3 valgu mutantidel tuvastatud mutatsioonid on joonisel tähistatud.

Et ennustada Lsc3 ja meie poolt isoleeritud mutantsete valkude sekundaarstruktuuri, kasutasime programmi SSPRED (Secondary Structure **P**REDiction) veebilehel

<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=sspred&group=programs&subgroup=propt.>

Vastavalt ennustusele, ei muuda T41I mutatsioon Lsc3 valgu N-terminaalses osas valgu sekundaarstruktuuri (Joonis 10).

```

Lsc3
          10          20          30          40          50
SS                bbbbaaaaaaa
AA  MYNSNSAVSQLQNSPLVDNIKYPPTVWSRADALKVNENDPITTQPLVSAD

          60          70          80          90          100
SS      bbbbbb   aaa   bbbb   bbbbbbbb
AA  FPMVSDTVFIWDTMPLRELDGTVVSVNGWSVIIITLTADRHPDDPQYLGPD

Lsc3 T41I
          10          20          30          40          50
PredSS                bbbbaaaaaaa
AA  MYNSNSAVSQLQNSPLVDNIKYPPTVWSRADALKVNENDPITTQPLVSAD

          60          70          80          90          100
PredSS      bbbbbb   aaa   bbbb   bbbbbbbb
AA  FPMVSDTVFIWDTMPLRELDGTVVSVNGWSVIIITLTADRHPDDPQYLGPD
  
```

Joonis 10. Valkude Lsc3 ja Lsc3 T41I N-terminaalse osa sekundaarstruktuur ennustatuna programmiga Soft Berry SSPRED. SS, sekundaarstruktuur (b tähistab β -lehe aminohapet, a tähistab α -heeliksi aminohapet); AA, valgu aminohappeline järjestus. Muteerunud aminohape on tähistatud punasel taustal. Potentsiaalne katalüütiline nukleofiil on tähistatud rohelisel taustal.

Sama programmiga ennustasime ka Lsc3 mutandi P400L sekundaarstruktuuri. Tulemused on esitatud Joonisel 11.

```

Lsc3
          360          370          380          390          400
SS                bbbbbb   bbbb
AA  NASGLVLGNPPEQPFQTYSHCVMPNGLVTSFIDSVPTTGEDYRIGGTEAP

          410          420          430
SS      bbbbbbbb   bbbbbbbb
AA  TVRILLKGDERSFVQEEYDYGYPAMKDVQLS

Lsc3 P400L
          360          370          380          390          400
SS                bbbbbb   bbbbbb   aaaa
AA  NASGLVLGNPPEQPFQTYSHCVMPNGLVTSFIDSVPTTGEDYRIGGTEAP

          410          420          430
SS      aaaaaaa   aaaaaaaaaa
AA  TVRILLKGDERSFVQEEYDYGYPAMKDVQLS
  
```

Joonis 11. Valkude Lsc3 ja Lsc3 P400L C-terminaalse osa sekundaarstruktuur ennustatuna programmiga Soft Berry SSPRED. SS, sekundaarstruktuur (b tähistab β -lehe aminohapet, a tähistab α -heeliksi aminohapet). AA, valgu aminohappeline järjestus. Muteerunud aminohape tähistatud punasel taustal.

Vastavalt valkude joondusele (Joonis 9) ja LsdA valgu kristallstruktuuri andmetele (Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Lisa 1) paiknevad Joonisel 11 näidatud Lsc3 valgu β -lehed β -propelleri viiendal labal. Mutandi P400L C-terminaalse osa sekundaarstruktuur on ennustatavalt tugevasti muutunud – kahe β -lehe asemel ennustatakse α -heelikseid. See võib olla põhjustatud sellest, et proliin takistab valkudes α -heeliksile moodustumist ja β -lehtede piirkonnas katkestab neid, paiknedes seetõttu β -lehtede vahelistel lingudel ja pööretel (http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Proteins/Structures#Beta_Pleated_Sheet). Näiteks Pro511 LsdA valgus (Martinez-Fleites *et al.*, 2005) ja Pro445 *B. subtilis*'e levaansukraasis (Meng ja Fütterer, 2003) katkestavad propelleri viienda laba kolmanda β -lehe β VC (Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Lisa 1). Nendele proliinidele vastabki Lsc3 valgus Pro400 (Joonis 9).

2.3.3 Isoleeritud levaansukraasi mutantide iseloomustamine

Mutantseid Lsc3 valke kodeerivad plasmiidid pHIPMalprom-lsc3T41I ja pHIPMalprom-lsc3P400L transformeeriti *E. coli*'sse, et uurida, millised muutused on meie poolt isoleeritud mutantsetel levaansukraasidel toimunud koguaktiivsuses, polümeriseerivas aktiivsuses ja oligosahhariide moodustavas võimes. Ensüümpreparaadina kasutati *E. coli* transformantide rakuekstrakte. Mutantsete levaansukraaside koguaktiivsust määrati 100 mM sahharoosi hüdrolyüsil vabanenud glükoosi hulga järgi ($\mu\text{mool/mg} \times \text{min}$; U/mg). Mõõtmistulemustest selgus, et mõlemal mutandil langes levaansukraasi koguaktiivsus, võrreldes metsiktüüpi levaansukraasiga. Vastavad väärtused olid mutandil T41I 0.24 ± 0.01 U/mg, mutandil P400L 0.38 ± 0.24 U/mg ja muteerimata Lsc3 valgul 6.64 ± 0.97 U/mg. Seega oli muteerimata Lsc3-ga võrreldes mutantsete levaansukraaside koguaktiivsus langenud vastavalt 17 (mutant P400L) ja 27 (mutant T41I) korda. Mutatsioon T41I lokaliseerub valgu N-terminaalsesse piirkonda, mis on suhteliselt lähedal oletatavalt propelleri esimesel labal paiknevale konserveerunud Asp62-le, mis võiks levaansukraaside joonduse alusel toimida katalüütilise nukleofiilina. Sellega võiks seletada suuremat katalüütilise aktiivsuse langust selle mutandi puhul. Meie poolt määratud madalad mutantsete levaansukraaside koguaktiivsused võivad olla tingitud ka ensüümide afiinsuse alanemisest sahharoosi suhtes, sest aktiivsuse määramisel kasutatud sahharoosi kontsentratsioon (100 mM) ei pruugi olla ensüümile küllastav. Lsc3 valgu K_m sahharoosile on 21 mM (Visnapuu *et al.*, 2008). Mitmete mutantsete levaansukraaside puhul on näidatud tugevat afiinsuse langust (K_m väärtuse tõusu) sahharoosile. Näiteks *Z. mobilis*'e levaansukraasi mutantidel Asp194Asn ja

Glu117Gln suurenes K_m 3-4 korda võrreldes muteerimata ensüümiga. Afiinsuse langus sahharoosile aga ei muutnud mutantsete levaansukraaside transfruktosüleerimise võimet ja nad olid võimelised tootma levaani (Yanase *et al.*, 2002). *B. subtilis*'e levaansukraasi Arg360 muteerimine teisteks aminohapeteks vähendas samuti tugevasti levaansukraasi afiinsust sahharoosile (Chambert ja Petit-Clatron, 1991; Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Kõige tugevamini mõjus Arg360 muteerimine seriiniks, mis suurendas ensüümi K_m sahharoosile ligi 20 korda (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Kuna oletasime, et mutantidel võiks olla muutunud ka substraadispetsiifilisus, hindasime mõlemal mutantsel valgul võimet hüdrolüüsida 100 mM sahharoosi ja 100 mM rafinoosi, mõõtes redutseerivate suhkrute (glükoos ja fruktoos sahharoosist ning fruktoos ja melibioos rafinoosist) moodustumist. Eelnevalt oleme näidanud, et Lsc3 valgule on sahharoos sobivam substraat kui rafinoos: ta moodustab 100 mM sahharoosist ~50% rohkem redutseerivaid suhkruid kui 100 mM rafinoosist. Lsc3 valgu afiinsus rafinoosile on ligikaudu poole madalam, kui sahharoosile (Visnapuu *et al.*, 2008). Tulemused mutantsete levaansukraaside sahharoosi ja rafinoosi kasutamise kohta on kokku võetud Tabelis 3.

Tabel 3. Levaansukraaside sahharoosi ja rafinoosi hüdrolüüsi võime, määratuna redutseerivate suhkrute tekke järgi. Aktiivsus rafinoosiga on väljendatud protsentides levaansukraasi aktiivsusest sahharoosiga.

Redutseerivate suhkrute teke		
Levaansukraas	100 mM sahharoosist	100 mM rafinoosist
Lsc3 T41I	100 %	46 %
Lsc3 P400L	100 %	52 %
Lsc3 (muteerimata)	100 %	48%*

*Visnapuu *et al.*, 2008

Nagu Tabelist 3 võib näha, on mutantsete levaansukraaside võime kasutada substraadina rafinoosi jäänud suhteliselt sarnaseks muteerimata Lsc3 valguga, moodustades ligikaudu 50% ensüümi aktiivsusest sahharoosiga. Sellest võib järeldada, et kuigi afiinsused mõlema substraadi suhtes võivad olla ensüümidel langenud, on sahharoos endiselt jäänud mutantsetele levaansukraasidele sobivamaks substraadiks kui rafinoos.

Kuna on teada, et levaansukraas polümeriseerib fruktoosi jääke, moodustades nii pikaahelalist levaani kui ka fruktooligosahhariide (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; Song ja Jacques, 1999), siis hindasime ka mutantsete levaansukraaside polümeriseerivat aktiivsust. Seda määrati reaktsioonisegus, mis sisaldas 1.2 M sahharoosi McIlvaine'i puhvris ja mutantset ensüümi sisaldavat rakuekstrakti (0.3 - 0.6 U/ml). 20 tunni möödudes reaktsioon peatati ja segus määrati ensümaatilisel vaba glükoosi ja fruktoosi hulk (vt 2.2.6). Kui polümeriseerimist ei toimuks, oleks

produktidena vabanevad glükoosi ja fruktoosi hulgad võrdsed. Kui kogu sahharoosist vabanev fruktoos polümeriseeritaks, oleks levaansukraasi polümeriseeriv aktiivsus 100%. Tabelist 4 on näha, et mutantsete ensüümide polümeriseeriv aktiivsus on ~80%. Mutageniseerimata Lsc3 valgul on samades tingimustes määratud polümeriseerimisaktiivsus 76% (Visnapuu, avaldamata andmed). Seega ei ole see näitaja mutantsetel valkudel algsest Lsc3 valgust erinev.

Tabel 4. Mutantsete levaansukraaside polümeriseeriv aktiivsus, tekkinud levaani hulk ja levaani arvutuslik keskmine polümerisatsiooniaste (DP).

Levaansukraas	Polümeriseeriv aktiivsus (%)*	Levaani keskmine DP
Lsc3 T41I	80 ± 4	33
Lsc3 P400L	82 ± 1	14

* Kahe katse keskmine ± standardhälve

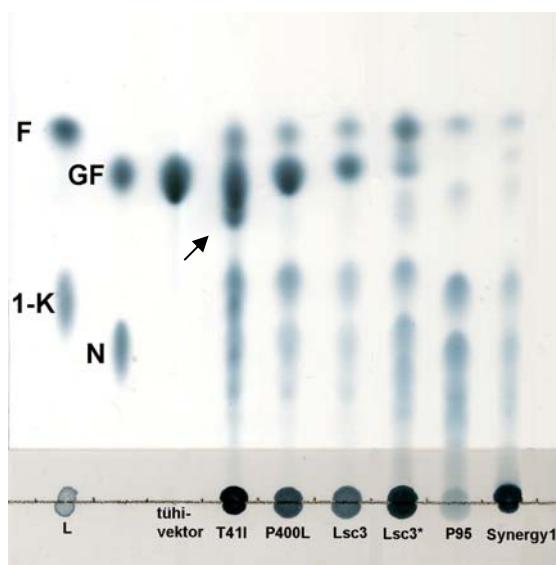
Et teha kindlaks mutantsete levaansukraasidega 1.2 M sahharoosist 20 h jooksul sünteesitud levaani keskmist polümerisatsiooniastet (DP), elueeriti TLC plaadilt voolutamisel mitteliikunud fruktaanide fraktsioon. Et saada rohkem materjali, kanti iga proovi peale viies kordustes. Happega hüdrolüüsitud proovides määrati ensümaatilisel fruktoosi ja glükoosi hulk. Kuna iga levaaniahel algab glükoosi molekuliga, siis sõltub glükoosi osakaal proovis levaani ahela keskmisest pikkusest.

Selgus, et Lsc3 mutant T41I tootis pikema ahelaga levaani molekule (DP~33), kui mutant P400L (DP~14). Muteerimata Lsc3 valk toodab levaani keskmise arvutusliku polümerisatsiooniastmega ~70 (Visnapuu, avaldamata andmed). Seega, oli mõlemal mutantsetel levaansukraasil, eriti aga mutantil P400L, alanenud võime sünteesida pika ahelaga levaani.

Pro400 paikneb Lsc3 valgu C-terminaalses osas, valgu kohupikkus on 431 aminohapet (Joonis 9). C-terminuse lähedal paiknevaid aminohappeid on muteeritud *B. subtilis*'e levaansukraasil. Selle valgu mutantidel Tyr429Asn ja Arg433Ala (valgu kogupikkus 473 aminohapet) oli samuti alanenud võime sünteesida pika ahelaga levaani – nad sünteesisid sahharoosist peamiselt fruktooligosahhariide. Tyr429 ja Arg433 paiknevad kristallstruktuuri andmetel *B. subtilis*'e levaansukraasi propelleri viienda laba teisel β-lehel ja sellele järgneval lingul (Meng ja Fütterer, 2003; vt. ka Lisa 1). Autorid järeldasid, et need aminohapped võiksid osaleda fruktosüüli aktseptori seondumisel ja seetõttu polümeriseerimisreaktsioonis (Ortiz-Soto *et al.*, 2008).

Et testida, kas puhastamata levaansukraasi preparaati saab kasutada levaansukraasi reaktsiooniproduktide tuvastamiseks õhukese kihi kromatograafiaga, analüüsiti võrdlevalt puhastatud Lsc3 valguga ja Lsc3 valku ekspresseeriva *E. coli* rakuekstraktiga 1.2 M sahharoosist

sünteesitud produkte. Joonisel 12 (rajad Lsc3 ja Lsc3*) on näha, et rakuekstrakti saab kindlasti kasutada levaansukraasi puhastamata preparaadina produktide analüüsiks õhukese kihi kromatograafiaga: produktide spekter on mõlemal preparaadil sarnane. Kui analüüsiti *E. coli* tühja vektoriga transformeeritud rakkude ekstrakti, siis oli näha, et reaktsioonisegus oli ilmunud vaid substraadina lisatud sahharoos ning rakuekstraktis ei sisaldanud mingeid komponente, mis segaksid polümerisatsiooniproduktide tuvastamist plaatidel.



Joonis 12. Mutantsete levaansukraaside reaktsiooniproduktide lahutamine õhukese kihi kromatograafiaga silikageelplaadil. Mutantseid valke (T41I ja P400L) sisaldavaid rakuekstrakte lisati reaktsioonisegudele aktiivsuse ühikute järgi, vastavalt 0.3 ja 0.6 U/ml ja inkubeeriti 1.2 M sahharoosiga McIlvaine'i puhvis 20 tundi. Reaktsioonisegusid lahjendati 4x ja plaadile kanti kõiki lahuseid 0.5 µl. Võrdlusena kanti plaatidele ka kontrollsegud, milles levaansukraasi preparaadina kasutati kas puhastatud algset Lsc3 valku (Lsc3*; 2.7 U/ml; proovi lahjendati enne plaadile kandmist 8x), algset Lsc3 valku sisaldavat rakuekstrakti ja negatiivse kontrollina tühja vektoriga (pHIPMalprom) transformeeritud *E. coli* rakuekstrakti.

Markersuhkrud: N – nüstoos, 1-K – 1-kestoos, GF – sahharoos, F – fruktoos ja L – levaan. Lisaks on plaadile kantud ka oligofruktaanide segud P95 (Orafti®P95) ja Synergy1 (Orafti® Synergy1).

Õhukese kihi kromatograafia näitas, et sünteesitavate produktide spekter on kahel mutantsetel levaansukraasil erinev. Mutant T41I toodab sahharoosist enam pikema ahelaga fruktaane, kui mutant P400L. Seda näitas ka levaani polümerisatsiooniastme määramine (vt. Tabel 4). Samas on näha ka Lsc3 muteerimata valgule sarnaste oligosahhariidide teket. Huvitav on produkt, mille liikuvus on sahharoosi ja 1-kestoosi liikuvuste vahepealne (1-K; Joonisel 12 märgitud noolega). Arvame, et tegu võib olla mõne teise trisahhariidi või difruktoosiga (F₂), mida see mutant, erinevalt algsest valgust, toodab. Mutant P400L toodab ka suhteliselt palju levaani, kuid oligosahhariide tundub ta sünteesivat vähem, kui mutant T41I ja algne Lsc3 valk. Peamiselt moodustub 1-kestoos, sellest suuremaid oligosahhariide moodustub vähem.

KOKKUVÕTE

Levaansukraasid on valgud, mida esineb nii grampositiivsetel kui ka -negatiivsetel bakteritel. Levaansukraas viib läbi kahesugust reaktsiooni: hüdroolüüsib peamise substraadina toimiva sahharoosi glükosiidsidet ja polümeriseerib vabanenud fruktoosi jäägid β -2,6 sidemega levaaniks.

Bakterite *Gluconacetobacter diazotrophicus* ja *Bacillus subtilis* levaansukraasidel on kristallstruktuur määratud. Neil valkudel on viielabalise β -propelleri topoloogia: iga propelleri laba koosneb neljast antiparalleelselt β -lehest, mida ühendavad α -heeliksid. Mitmete bakterite levaansukraase on muteeritud, et selgitada välja, millised aminohapped ja piirkonnad on olulised ensüümi tööks. Siiani ei ole selge, millest sõltub levaansukraasi substraadispetsiifika ja mis määrab ära sünteesitavate erineva ahelapikkusega produktide spektri.

Antud töös keskenduti põhiliselt *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi Lsc3 juhuslikule muteerimisele, et alustada selle valgu struktuur-funktsioon uuringutega. *P. syringae* pv. tomato DC 3000 kodeerib kolme levaansukraasi valku, mille funktsioonid bakteris on seni ebaselged. Eelnevalt on meie grupis kirjeldatud Lsc3 valgu biokeemilisi omadusi. On selgunud, et Lsc3 saab substraatidena kasutada lisaks sahharoosile ka rafinoosi ja stahhüoosi ning ta sünteesib ka fruktooligosahhariide (Visnapuu *et al.*, 2008; 2009). Lsc3 valku kodeerivat geeni muteeriti etüülmetaansulfonaadiga, ekspresseeriti *Escherichia coli* tüves RA11r, isoleeriti selektiivsõotmeid kasutades mutantseid valke ekspresseerivad kloonid, tehti kindlaks mutatsiooni asukoht ja iseloomustati mutantseid levaansukraase.

Töö põhitulemused olid järgmised:

- 1) Töös kasutatud mutageniseerimise meetodikaga saab tekitada levaansukraaside mutante ning valitud selektsioonisüsteem sobib muutunud omadustega levaansukraaside selektsiooniks.
- 2) Muteerunud valkude substraadispetsiifika ja sünteesitavate oligosahhariidsete produktide mustri kirjeldamisel saab ensüümpreparaadina kasutada muteeritud levaansukraasi geeni ekspresseeriva *E. coli* rakuekstrakti.
- 3) Töö tulemusena isoleeriti kaks levaansukraasi mutanti, T41I ja P400L, milles kummaski oli toimunud ühe aminohappe asendus. Võrreldes algse muteerimata levaansukraasiga oli nende mutantide levaansukraasne aktiivsus oli vähenenud ja sünteesitav levaan oli lühema ahelapikkusega.

- 4) Mutant T41I sünteesis sahharoosist oligosahhariidi, mida ei esinenud algse levaasukraasi produktide hulgas.
- 5) Mutatsioonid T41I ja P400L ei muuda Lsc3 valgu sahharoosi ja rafinoosi kasutamise substraadispetsiifikat – sahharoos jääb endiselt rafinoosist sobivamaks substraadiks.
- 6) Mutantsete levaansukraaside sekundaarstruktuuri ennustamine näitas, et P400L mutatsioon võib muuta ära valgu C-terminaalse osas viienda propelleri laba ehituse – kahe C-terminaalse β -lehe asemele ennustatakse mutatsioonijärgselt α -heelikseid.
- 7) T41 ja P400 on Lsc3 valgus olulised funktsionaalsed aminohapped, mille muteerimine mõjutab valgu koguaktiivsust ja sahharoosist sünteesitavate produktide koostist, ei mõjuta aga ensüümi substraadispetsiifikat.

Mutagenesis of the *Pseudomonas syringae* levansucrase: selection and characterization of mutants

Karin Mardo

SUMMARY

Levansucrases catalyze production of levan and fructo-oligosaccharides using sucrose as main substrate. Levan is a polyfructan that bacteria use to protect their cells against harmful environmental effects and plant defence mechanisms. For example, levan participates in forming of the dental plaque and biofilm. Levansucrases of grampositive and gramnegative bacteria have different size, but they have similar structure. Levansucrase proteins fold as a propeller with 5 blades consisting of four antiparallel β -sheets. The active center is located in the middle of the propeller, in the bottom of negatively charged pocket that binds the substrate – sucrose. Many mutations have been introduced in order to determine the catalytic amino acids and other regions of importance for the levansucrases. From the structure/function aspect, levansucrases of *Bacillus subtilis*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Zymomonas mobilis* have mostly been studied.

The aim of this thesis was to initiate structure-function studies of the levansucrase protein Lsc3 of a plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. We performed chemical mutagenesis of the *lsc3* gene on an expression plasmid and elaborated appropriate selection method of bacterial transformants expressing mutant levansucrases. As a result of this study, two mutant levansucrases were isolated. Sequencing of respective genes revealed following amino acid changes: in one mutant (T41I), Thr41 was replaced by Ile, and in the second (P400L), Pro400 was changed to Leu. Replacement of the Pro400 residue caused a change in secondary structure of the C-terminal part of the protein as predicted by computer analysis. These mutations brought about a total reduction of activity of the enzyme (about 20 times compared to the wild-type enzyme). Both mutant enzymes were still able to use raffinose being thus similar to the wild-type Lsc3 protein.

The sucrose polymerization products of mutated levansucrases were investigated using thin layer chromatography (TLC). We found that mutants T41I and P400L produced levan of lower degree of polymerization than the wild-type enzyme. We conclude that our mutagenesis and selection procedures were suitable for the isolation of levansucrase mutants, and that Thr-41 and Pro-400 have a role in supporting polymerizing and total catalytic activity of the *P. syringae* pv. tomato Lsc3 protein.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams, M. H. (1959). Bacteriophages, p. 445-447. Interscience Publishers Inc., New York
- Ammar, Y. B., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Minamiura, N. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. J. Biotechnol. 99: 111-119
- Andersone, I., Auzina, L., Vigants, A., Mutere, O., Zikmanis, P. (2004). Formation of levan from raffinose by levansucrase of *Zymomonas mobilis*. Eng. Life Sci. 4: 56-59
- Baciu, I.-E., Jördening, H.-J., Seibel, J., Buchholz, K. (2004). Investigations of the transfructosylation reaction by fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogue galactosyl-fructoside. J. Biotechnol. 116: 347-357
- Banguela, A., Hernandez, L. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. Biotech. Appl. 23: 202-210
- Batista, F. R., Hernandez, L., Fernandez, J. R., Arrieta, J., Menendez, C., Gomez, 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
- Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L., Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. Process Biochem. 38: 701-706
- Bereswill, S., Geider, K. (1997). Characterization of the *rcsB* gene from *E. amylovora* and its influence on exopolysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. J. Bacteriol. 179: 1454-1361
- 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
- Decad, G. M., Nikaido, H. (1976). Outer membrane of Gram-negative bacteria XII. Molecular-sieving function of cell wall. J. Bacteriol. 128: 325-336
- Denny, T. P. (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 173-197
- Esawy, M. A., Mahmoud, D. A. R., Fattah, A. F. A. (2008). Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. Braz. J. Chem. Eng. 25: 237-246
- Euzenat, O., Guibert, A., Combes, D. (1997). Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. Process Biochem. 32: 237-243
- Fujita, K., Hara, K., Haskimoto, H., Kitakata, S. (1990). Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp K- 1. Agric. Biol. Chem. 54: 913-919
- Geier, G., Geider, K. (1993). Characterization and influence on virulence of levansucrase gene from the fireblight pathogene *Erwinia amylovora*. Physiol. mol. plant pathol. 42: 387-404
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125: 1401-1412

- Gross, M., Rudolph, K. (1987). Studies on the extracellular polysaccharides (EPS) produced *in vitro* by *Pseudomonas phaseolicola*. III. Kinetics of levan and alginate formation in batch culture and demonstration of levansucrase activity in crude EPS. *J. Phytopathol.* 119: 289-297
- Gross, M., Rudolph, K. (1987). Studies on the extracellular polysaccharides (EPS) produced *in vitro* by *Pseudomonas phaseolicola*. II. Characterization of levan, alginate and LPS. *J. Phytopathol.* 119: 206-215
- Hanatani, M., Yazyu, H., Shiota-Niiya, S., Moriyama, Y., Kanazawa, H., Futai, M., Tsuchiya, T. (1984). Physical and genetic characterization of the melibiose operon and identification of the gene products in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259: 1807-1812
- Hernandez, L., Arrieta, J., Betancourt, L., Falcon, V., Madrazo, J., Coego, A., Menendez, C. (1999). Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Curr. Microbiol.* 39: 146–152
- Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F., Chambert, R. (1995) Isolation and enzymatic 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
- Hettwer, U., Jaekel, F. R., Boch, J., Meyer, M., Rudolph, K., Ullrich, M. S. (1998). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3180-3187
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis - mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *J. Biochem.* 407: 189–198
- Jacques, N. A. (1993). The fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *New Phytol.* 123: 429-435
- Jun Goh, Y., Zhang, C., Benson, A. K., Schlegel, V., Lee, J.-H., Hutkins, R. W. (2006). Identification of a putative operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus paracasei*. *Environ. Microbiol.* 12: 7518–7530
- Kamal, F., Mehrgan, H., Assadi, M. M., Mortazavi, S. A. (2003). Mutagenesis of *Xanthomonas campestris* and selection of strains with enhanced xanthan production. *Iran Biomed. J.* 7: 91-98
- Kang S. A., Hong K., Jang K. H., Kim Y. Y., Choue R., Lim Y. (2006). Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. *J. Nutr. Biochem.* 17: 419–426
- Kim, M. G., Kim, C. H., Lee, J. S., Song, K. B., Rhee, S. K. (2000). Synthesis of methyl β -D-fructoside catalyzed by levansucrase from *Rahnella aquatilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 646-651
- 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
- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T. R., Molin, S., Ullrich, M. S. (2006). Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *J.*

Gen. Microbiol. 152: 2909-2918

Li, H., Ullrich, M. S. (2001). Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. 183: 3282-3292

Li, H., Schenk, A., Srivastava, A., Zhurina, D., Ullrich, M. S. (2006). Thermo-responsive expression and differential secretion of the extracellular enzyme levansucrase in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. FEMS Microbiol. Lett. 265: 178-185

Li, S. Y., Chen, M., Li, G., Yan, Y. L., Yu, H. Y., Zhan, Y. H., Peng, Z. X., Wang, J., Lin, M. (2008) Amino acid substitutions of His296 alter the catalytic properties of *Zymomonas mobilis* 10232 levansucrase. Acta Biochim. Pol. 55: 201–206

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-75

Manly, R. S., Richardson, D. T. (1968). Metabolism of levan by oral samples. J. Dent. Res. 47: 1080-1086

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

McIlvaine, T. C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. J. Biol. Chem. 49: 183-186

Mehta, P. K., Heringa, J., Argos, P. (1995). A simple and fast approach to prediction of protein secondary structure from multiply aligned sequences with accuracy above 70%. Protein Sci. 4: 2517–2525

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

Munro, C., Michalek, S. M., Macrina, F. L. (1991). Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. Infect. Immun. 59: 2316-2323

Nurizzo, D., Turkenburg, J. P., Charnock, S. J., Roberts, S. M., Dodson, E. J., McKie, V. A., Taylor, E. J., Gilbert, H. J., Davies, G. J. (2002). *Cellvibrio japonicus* α -L-arabnanase 43A has a novel five-blade β -propeller fold. Nat. Struct. Biol. 9: 665-668

Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudino-Pinera, E., Olvera, C., Lopez-Munguia, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. Protein Eng. Des. Sel. 21: 589–595

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

Reid, S. J., Abratt, V. R. (2005). Sucrose utilisation in bacteria: genetic organization and regulation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 312–321

Robrish, S. A., Reid, W., Krichevsky, M. I. (1972). Distribution of enzymes forming polysaccharide from sucrose and the composition of extracellular polysaccharide synthesized from *Streptococcus mutans*. Appl. Microbiol. 24: 184-190

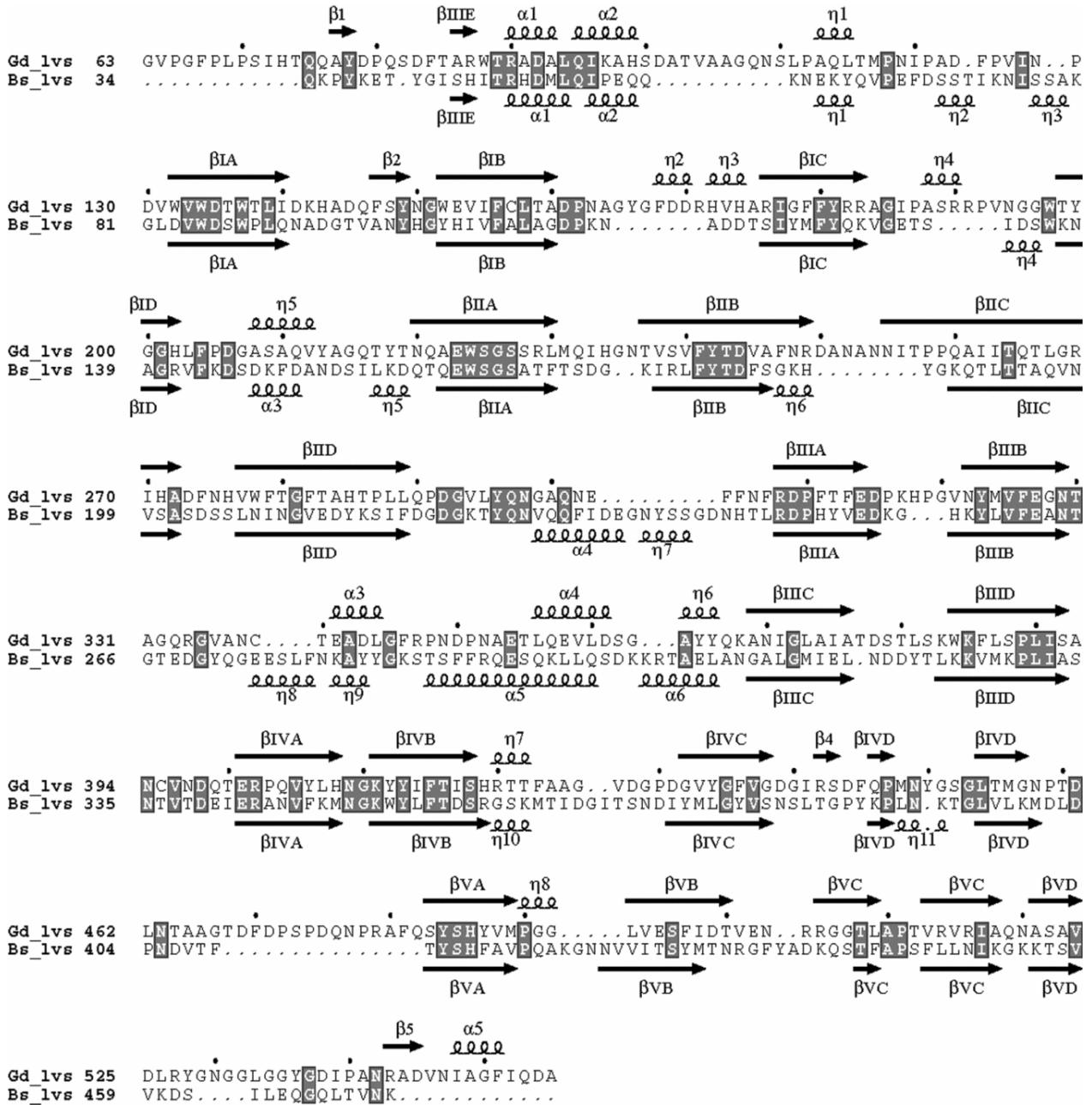
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning*, 3rd edition, by. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sambrook, J., Fritsch, E. T., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sangiliyandi, G., Gunasekaran, P. (2001). Polymerase and hydrolase activities of *Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by in vitro mutagenesis and elevated temperature. *J. Process Biochem.* 36: 543-548
- Sangiliyandi, G., Ray, K. C., Gunasekaran, P. (1999). Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 21: 179-182
- Schmidt, F.H. (1961). Die enzymatische bestimmung von glucose und fructose nebeneinander. *Klinische Wochenschrift.* 39: 1244-1247
- Senthikumar, V., Bushby, S. J. W., Gunasekaran, P. (2003). Serine substitution for cysteine residues in levansucrase selectively abolishes levan forming activity. *Biotechnol. Lett.* 25: 1653-1656
- Song, D. D., Jacques, N. A. (1999). Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*. *J. Biochem.* 341: 285-291
- Song, D. D., Jacques, N. A. (1999). Mutation of aspartic acid residues in the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *J. Biochem.* 344: 259-264
- Steinmetz, M., Le Coq, D., Djemia, H. B., Gay, P. (1983). Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 191: 138-144
- 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
- Tang, L. B., Lenstra, R., Borchert, T. V., Nagarajan, V. (1990). Isolation and characterization of levansucrase-encoding gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Gene.* 96: 89-93
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680
- Tieking, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F., Gänzle, M. G. (2005) Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 655-663
- Toomemaa, R. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraaside omaduste uurimine. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool
- Trujillo, L. E., Gomez, R., Banguela, A., Soto, M., Arrieta, J. G., Hernandez, L. (2004). Catalytical properties of N-glycosylated *Gluconoacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast. *Electron. J. Biotechnol.* 7: 116-123
- Valluru, R., Van den Ende, W. (2008). Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *J. Exp. Bot.* 59: 2905-2916
- van Geel-Schutten, G. H., Faber, E. J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M. R., Ten Brink, B., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Dijkhuizen, L. (1999). Biochemical and structural

- characterisation of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3008-3014
- van Hijum, S. A. F. T. (2004). Fructosyltransferases of *Lactobacillus reuteri*: characterization of genes, enzymes, and fructan polymers. Doktoritöö, Groningeni Ülikool
- 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., 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. Rev.* 70: 157-176
- Visnapuu, T. (2007). Levaansukraasi geenide ekspresseerimine *E. coli*'s ja valkude omaduste uurimine. Magistritöö, Tartu Ülikool
- Visnapuu, T., Mäe, A., Alamäe, T. (2008). *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter with sigma 70-like elements is feasible for *Escherichia coli*-based biotechnological applications: Expression of three genomic levansucrase genes of *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. *Process Biochem.* 43: 414-422
- Visnapuu, T., Zamfir, A. D., Mosoarca, C., Stanescu, M. D., Alamäe, T. (2009). Fully automated chip-based negative mode nano-electrospray mass spectrometry of fructooligosaccharides produced by heterologously expressed levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23: 1337-1346
- Wenham, D. G., Hennessy, T. D., Cole, J. A. (1979). Regulation of glucosyl and fructosyltransferase synthesis by continuous cultures of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* 114: 117-124
- Wierdsma, N. J., van Bodegraven, A. A., Uitdehaag, B. M., Arjaans, W., Savelkoul, P. H., Kruizenga, H. M., van der Schueren, M. V. (2009). Fructo-oligosaccharides and fibre in enteral nutrition has a beneficial influence on microbiota and gastrointestinal quality of life. *Scand. J. Gastroenterol.* 6: 1-9
- Yanase, H., Fujimoto, J., Maeda, M., Okamoto, K., Kita, K., Tonomura, K. (1998). Expression of the extracellular levansucrase and invertase genes from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli* cells. *Biosci. Biotechnol., Biochem.* 62:1802-1805
- Yanase, H., Iwata, M., Nakahigashi, R., Kita, K., Kato, N., Tonomura, K. (1992). Purification, crystallization, and properties of extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biosci. Biotechnol., Biochem.* 56: 1335-1337
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., Okamoto, K. (2002). Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J. Biochem.* 132: 565-572
- Yoo, S. H., Yoon, E. J., Cha, J., Lee, H. G. (2004). Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 34: 37-41

VEEBIAADDRESSID

1. http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Proteins/Structures#Beta_Pleated_Sheet
2. <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=sspred&group=programs&subgroup=propt>
3. http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=2.4.1.10
4. <http://www.cazy.org/CAZY/>
5. <http://www.cazy.org/fam/GH68.html>
6. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/>
7. <http://www.geocities.com/acaclone/>

LISA 1



Bacillus subtilis'e ja *Gluconacetobacter diazotrophicus*'e levaansukraaside joonus ja sekundaarstruktuur (Martinez-Fleites *et al.*, 2005).