

Uvođenje točkastih mutacija i njihov utjecaj na aktivnost lakaze CtLcc1 izložene na staničnoj stijenci kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Franković, Paola

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:013947>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Paola Franković
0058221200

**Uvođenje točkastih mutacija i njihov utjecaj na aktivnost lakaze CtLcc1
izložene na staničnoj stijenci kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija II

Mentor: doc. dr. sc. Bojan Žunar

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Uvođenje točkastih mutacija i njihov utjecaj na aktivnost lakaze CtLcc1 izložene na staničnoj stijenci kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Paola Franković, 0058221200

Sažetak:

Lakaze su bakar-ovisne polifenol oksidaze primjenjive u bioremedijaciji te prehrambenoj, tekstilnoj i farmaceutskoj industriji. Međutim, za povećanje ekonomske isplativosti ovih procesa, potrebno je razviti mikrobne proizvodne sojeve koji sintetiziraju aktivnije lakaze. U tu svrhu, prethodno je u Laboratoriju za biokemiju razvijen soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji efikasno izlaže lakazu CtLcc1 na površinu svoje stanične stijenke. U ovom radu konstruirano je šest novih inačica lakaze CtLcc1 izloženih na površinu stanične stijenke kvasca koje nose točkaste mutacije za koje je poznato da dovode do povećanja aktivnosti sličnih lakaza. Nakon konstrukcije odgovarajućih plazmida, sojevi kvasca *S. cerevisiae* koji ekspimiraju nove inačice lakaza nacijspljeni su na selektivnu podlogu s kromogenim supstratima ABTS i DMP te je procijenjena njihova lakazna aktivnost preko promjene boje kolonija. Rezultati su pokazali da su novouvedene mutacije uspješno modulirale aktivnost lakaze, iako nijedna od novih inačica nije nadmašila aktivnost izvornog enzima CtLcc1.

Ključne riječi: lakaza CtLcc1, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, stanična stijenka, izlaganje proteina na površinu stanične stijenke, ABTS

Rad sadrži: 26 stranica, 9 slika, 4 tablica, 29 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Bojan Žunar

Pomoć pri izradi: Antonia Paić, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 09. rujna 2024. god.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Introduction of point mutations and their effect on the activity of laccase CtLcc1
displayed on the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Paola Franković, 0058221200

Abstract:

Laccases are copper-dependent polyphenol oxidases applicable in bioremediation and the food, textile and pharmaceutical industries. To improve the economic viability of these processes, it is necessary to develop microbial production strains that synthesise more active laccases. For this purpose, a strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* that efficiently displays laccase CtLcc1 on the surface of its cell wall was previously developed in the Laboratory for Biochemistry. In this study, six new variants of laccase CtLcc1 were constructed, carrying point mutations known to increase the activity of similar laccases. After constructing the plasmids, *S. cerevisiae* strains expressing the new laccase variants were inoculated on selective media containing chromogenic substrates ABTS and DMP, and their laccase activity was assessed based on the colony colour change. The results demonstrated that the introduced mutations successfully modulated laccase activity, although none of the new variants outperformed the activity of the original CtLcc1 enzyme.

Keywords: laccase CtLcc1, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall, protein surface display on the cell wall, ABTS

Thesis contains: 26 pages, 9 figures, 4 tables, 29 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Bojan Žunar, PhD, Assistant Professor

Technical support and assistance: Antonia Paić, mag. ing. biotechn.

Thesis defended: September 9th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LAKAZE.....	2
2.1.1. STRUKTURA I MEHANIZAM DJELOVANJA LAKAZA.....	2
2.1.2. PRIMJENA LAKAZA	4
2.2. FUNGALNE LAKAZE	4
2.3. HETEROLOGNA EKSPRESIJA LAKAZA U KVASCU	5
2.4. GENETSKO INŽENJERSTVO LAKAZA U KVASCU.....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	7
3.1. MATERIJALI.....	7
3.1.1. KEMIKALIJE.....	7
3.1.2. UREĐAJI	8
3.1.3. LABORATORIJSKI SOJEVI	8
3.1.4. HRANJIVE PODLOGE	8
3.1.5. PLAZMIDI.....	10
3.1.6. POČETNICE	11
3.2. METODE	12
3.2.1. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR)	12
3.2.2. AGAROSNA GEL ELEKTROFOREZA.....	13
3.2.3. IZOLACIJA DNĀ IZ AGAROSNOG GELA.....	13
3.2.4. SASTAVLJANJE FRAGMENTA DNĀ PO GIBSONU	14
3.2.5. TRANSFORMACIJA BAKTERIJE <i>E. COLI</i>	14
3.2.6. IZOLACIJA PLAZMIDA IZ BAKTERIJE <i>E. COLI</i>	14
3.2.7. SEKVENCIRANJE PLAZMIDNE DNĀ PO SANGERU	14
3.2.8. TRANSFORMACIJA KVASCA <i>S. CEREVISIAE</i> LITIJEVIM ACETATOM	15
3.2.9. KOLORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LAKAZE NA KRUTIM PODLOGAMA.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. REZULTATI.....	17

4.1.1.	KONSTRUKCIJA PLAZMIDA pRSII423-ccw12LCC1-3HA_G, H, I, J, K, i L	17
4.1.2.	KONSTRUKCIJA SOJEVA KVASCA <i>S. CEREVISIAE</i>	19
4.1.3.	ISPITIVANJE AKTIVNOSTI NOVOKONSTRUIRANIH INAČICA LAKAZE CtLCC1	19
4.2.	RASPRAVA	21
5.	ZAKLJUČCI	23
6.	POPIS LITERATURE	24

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariot koji se često koristi u biotehnologiji, prehrambenoj industriji, proizvodnji heterolognih proteina te u biološkim i biomedicinskim istraživanjima. Njegovo kratko generacijsko vrijeme, sposobnost rasta na kompleksnim hranjivim podlogama, visoka efikasnost transformacije i sposobnost učinkovitog popravka dvolančanih lomova DNA homolognom rekombinacijom učinile su ovaj kvasac modelnim organizmom za brojna biološka istraživanja (Goffeau i sur., 1996). Danas se intenzivno istražuje i stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* kao struktura koja omogućuje izlaganje rekombinantnih proteina na površini stanice. Proteini izloženi na staničnoj stijenci mogu se lakše izolirati iz mikrobnih kultura (Yaver i sur., 1999) te djeluju i na supstrate koji inače neefikasno ulaze u stanicu.

Ovaj rad istraživao je utjecaj zamjene određenih aminokiselina na aktivnost na staničnoj stijenci izložene lakaze CtLcc1, ekstracelularnog fungalnog enzima koji oksidira odabrane fenolne spojeve (Riva, 2006). Naime, dostupna literatura opisuje točkaste mutacije koje povećavaju aktivnost lakaza sličnih lakazi CtLcc1 pa je bilo zanimljivo odrediti kako će uvođenje homolognih točkastih mutacija utjecati na aktivnost lakaze CtLcc1. Pritom je kao izvorna inačica lakaze CtLcc1 u ovom radu korištena lakaza CtLcc1-3xHA-Ccw12 koja se sastoji od lakaze CtLcc1 kojoj su pridodane tri uzastopne hemaglutininske oznake, nakon kojih slijedi dio proteina Ccw12 koji omogućuje kovalentno vezivanje lakaze na staničnu stijenu kvasca.

Cilj ovog završnog rada bio je konstruirati plazmide koji kodiraju za šest inačica rekombinantne lakaze CtLcc1-3xHA-Ccw12 i koji se od izvorne lakaze razlikuju u po jednoj do dvije aminokiseline te zatim ispitati aktivnost novokonstruiranih proteina. U tu svrhu, konstruirano je šest inačica gena CtLcc1-3xHA-Ccw12 koji su zatim eksprimirani u kvascu *S. cerevisiae*. Aktivnost novih inačica lakaze ispitana je uzgojem sojeva kvasca koji eksprimiraju navedene lakaze na krutim hranjivim podlogama obogaćenima supstratima za lakaze. Praćenje promjene boje navedenih podloga i stanica tijekom rasta kvasca omogućilo je procjenu katalitičke učinkovitosti novokonstruiranih inačica lakaza.

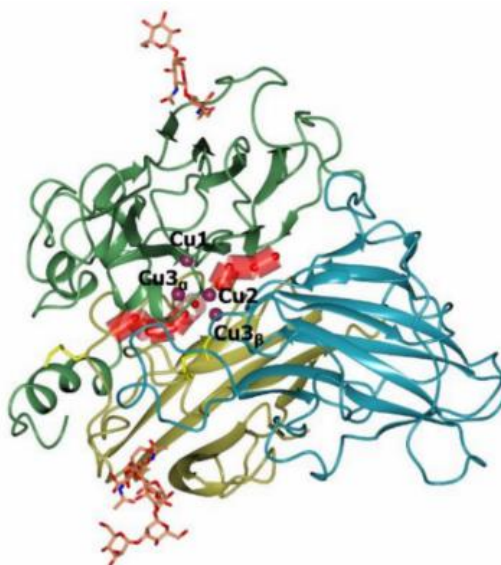
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lakaze

Lakaze su enzimi iz skupine plavih oksidaza koji kataliziraju oksidaciju širokog spektra spojeva, uključujući difenole, polifenole, amine, pa čak i određene anorganske tvari. Poznate i kao bakar-ovisne polifenol oksidaze, lakaze su prisutne u gotovo svim oblicima života, od bakterija, lišajeva i viših biljaka, do gljiva, insekata i spužvi (Dwivedi i sur., 2011). Do danas je većina lakaza izolirana iz biljnih i fungalnih izvora, pri čemu se gljive iz koljena *Basidiomycota* smatraju najvećim proizvođačima ovih enzima. Kao što i nagoviješta njihova široka rasprostranjenost u prirodi, lakaze nisu visoko selektivne te posjeduju različita svojstva koja variraju ovisno o njihovom podrijetlu. Tijekom oksidacije fenolnih i nefenolnih supstrata, kao rezultat simultane redukcije molekularnog kisika, lakaze proizvode molekulu vode, što ih čini ekološki prihvatljivim enzimima. Upravo iz ovog razloga, lakaze su predmet brojnih istraživanja još od 19. stoljeća, s ciljem razumijevanja njihovih karakteristika i potencijalnih primjena (Reiss i sur., 2013).

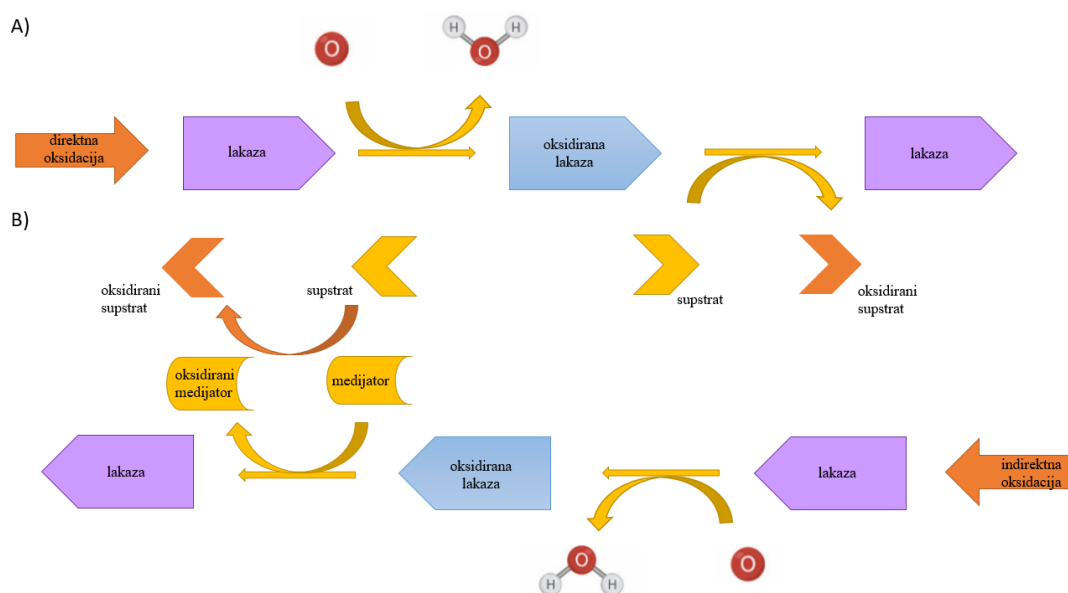
2.1.1. Struktura i mehanizam djelovanja lakaza

Strukturno gledano, lakaze su monomerni, dimerni ili tetramerni glikoproteini, pri čemu svaka monomerna jedinica sadrži četiri bakrova iona (Slika 1). Ovi bakrovi ioni tvore katalitičku jezgru enzima, ključnu za provođenje redoks reakcija. Katalitička jezgra sastoji se od tri različita bakrova središta ili centra, od kojih svaki ima specifičnu funkciju i karakteristike. Ova središta mogu se razlikovati pomoću tehnika poput elektronske paramagnetske rezonancije (EPR spektroskopije) ili UV/Vis spektroskopije, koje omogućuju detaljno ispitivanje njihovih strukturnih i funkcionalnih svojstava.



Slika 1. Strukturni prikaz monomerne lakaze izolirane iz gljive *Corioloopsis caperata*. Lakaza se sastoji od tri domene prikazane zelenom, žutom i plavom bojom. Bakrovi ioni prikazani su ljubičastim kuglicama. Preuzeto iz Loi i sur., 2021.

Prvi bakrov centar, poznat i kao tip 1 (T1), naziva se i "plavi centar" jer je odgovoran za plavo obojenje proteina u oksidiranom stanju budući da apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 610 nm. Ključna karakteristika pojedine lakaze je redoks potencijal T1 centra, jer on određuje koje supstrate lakaza može oksidirati. Naime, ako je redoks potencijal supstrata viši od 700 mV, sposobnost enzima da oksidira taj supstrat korelira s razlikom redoks potencijala supstrata i T1 centra. Drugi bakrov centar, tip 2 (T2), ne pridonosi obojenju i naziva se "obični bakrov centar". Konačno, dva bakrova iona u centru tipa 3 (T3) tvore binuklearnu strukturu koja se može detektirati u bliskom UV području. Mehanistički gledano, T1 centar najprije prihvaća elektrone od supstrata, dok T2 i T3 centri organizirani u trinuklearnu jezgru T2/T3 vežu molekularni kisik, istovremeno ograničavajući pristup drugim oksidacijskim sredstvima. U idućem koraku elektroni prelaze s T1 centra na T2/T3 jezgru, pri čemu se kisik reducira u vodu (Desai i Nityanand, 2011). Na ovaj način lakaze direktno oksidiraju supstrate (Slika 2). Međutim, lakaze mogu također indirektno oksidirati supstrate, pri čemu koriste medijatore, tj. niskomolekularne organske spojeve poput 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6)-sulfonske kiseline (ABTS) (Shraddha i sur., 2011). Pomoću medijatora, lakaze mogu djelovati i na nefenolne supstrate.



Slika 2. Shematski prikaz reakcija koje katalizira lakaza. Slika je prilagođena iz Khatami i sur. (2022). A) direktna oksidacija supstrata i B) indirektna oksidacija supstrata.

2.1.2. Primjena lakaza

Zbog svoje sposobnosti da oksidiraju širok spektar supstrata i sintetiziraju neškodljive nusprodukte, lakaze imaju značajnu primjenu u industriji i biotehnologiji. Među najvažnijim primjenama lakaza su razgradnja zagađivača, uklanjanje ksenobiotičkih tvari te kataliza reakcija polimerizacije (Sharma i sur., 2007). U bioremedijaciji, lakaze se koriste za uklanjanje fenolnih derivata i aromatskih ugljikovodika iz otpadnih voda ili tla kontaminiranog pesticidima i herbicidima (Viswanath i sur., 2014). Osim toga, lakaze imaju važnu ulogu u prehrambenoj industriji, gdje se koriste za selektivno uklanjanje fenolnih derivata s ciljem stabilizacije i produljenja roka trajanja pića kao što su pivo, vino i sokovi (Brijwani i sur., 2010). U industriji papira i celuloze, lakaze se primjenjuju za uklanjanje tinte tijekom recikliranja, delignifikaciju drvenih vlakana tijekom izbjeljivanja te poboljšanje kvalitete papirnih vlakana (Ali i Sreerkrishnan, 2001). U usporedbi s kemikalijama koje se tradicionalno koriste za izbjeljivanje celuloze, traperi i razgradnju tekstilnih boja, lakaze predstavljaju ekološki prihvatljiviju alternativu. Osim toga, lakaze su korisni katalizatori u proizvodnji određenih lijekova i čak se koriste u kozmetičkoj industriji kao dodaci bojama za kosu i preparatima za uklanjanje hiperpigmentacije kože (Golz-Berner i sur., 2004). Međutim, najveći izazovi u komercijalnoj proizvodnji i primjeni lakaza su niski prinosi tijekom izolacije ovih enzima te visoki troškovi proizvodnje potrebnih medijatora. Iako je u posljednjih nekoliko godina postignut značajan napredak u povećanju ekonomičnosti ovih procesa, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se optimizirala proizvodnja lakaza u heterolognim domaćinima (Couto i Herrera, 2006).

2.2. Fungalne lakaze

Prva lakaza izolirana je 1883. godine iz mliječnog soka japanskog lak drveta *Rhus vernicifera*. Nešto više od deset godina kasnije, 1896. godine, izolirana je i prva fungalna lakaza, te je od tada većina opisanih lakaza upravo fungalnog podrijetla (Thurston, 1994). Fungalne lakaze su ekstracelularni glikoproteini čija molekulska masa varira između 60 i 140 kDa. Ove enzime proizvode fungi kada rastu na površini supstrata, a ponekad i tijekom svojeg submerznog uzgoja. Očekivano, proizvodnja lakaza ovisi o parametrima uzgoja proizvodnog soja, kao što su pH, temperatura, sastav hranjive podloge, izvor dušika i koncentracija mikroelemenata. Fungalne lakaze karakterizira niži udio ugljikohidrata, od 15 do 25 %, i izoelektrična točka oko pH vrijednosti 4,0. Uz to, fungalne lakaze su gotovo uvijek N-glikozilirane, što povećava njihovu masu za otprilike 10 do 15 %, iako u nekim slučajevima taj postotak može biti i dvostruko veći. Ovaj ugljikohidratni dio lakaza osigurava im konformacijsku stabilnost te ih štiti od proteolize ili inaktivacije radikalima.

Fungalne lakaze posjeduju veći redoks potencijal u odnosu na biljne ili bakterijske lakaze, što ih čini posebno pogodnima za brojne biotehnološke procese u razgradnji lignina. Fungalne

lakaze nižeg potencijala imaju redoks potencijal u rasponu od 400 do 600 mV, dok lakaze visokog potencijala imaju redoks potencijal od 600 do 800 mV. Najvažniji proizvođači lakaza su gljive bijele truleži kao što su *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor* i *Pleurotus ostreatus*. Također, značajni proizvođači ovih enzima su gljive iz roda *Trichoderma*, poput *T. atroviridie*, *T. longibrachiatum* i *T. harzianum*, te gljive iz koljena *Basidiomycota*, kao što su *Theiophora terrestris* i *Phanerochaete chrysosporium*. Osim u kopnenim gljivama, lakaze su pronađene i u morskim gljivama kao što su *Corioloopsis byrsina*, *Diaporthe phaseolorum* i *Cerrena unicolor* (Giardina i sur., 2010).

Dok gotovo sve vrste gljiva bijele truleži mogu sintetizirati lakaze, gljive smeđe truleži generalno ne proizvode lakaze. Do sada je otkriveno tek nekoliko vrsta gljiva smeđeg truljenja koje imaju sposobnost oksidacije ABTS-a, što je znak potencijalne aktivnosti lakaza. Međutim, u gljivi *Gloeophyllum trabeum* otkrivena je DNA sekvenca homologna onima koje za lakaze kodiraju u gljivama bijelog truljenja. Današnja istraživanja usmjerena su na otkrivanje novih producenata fungalnih lakaza ili na genetičku modifikaciju sojeva radi poboljšanja ekspresije lakaza (Gochev i Krastanov, 2007).

2.3. Heterologna ekspresija lakaza u kvascu

Glavna prepreka u proizvodnji lakaza iz nativnih funga je visoka cijena ovog proizvodnog procesa i složenost pročišćavanja. Zbog toga se danas fokus premješta na konstrukciju rekombinantnih lakaza koje je lakše izolirati iz povoljnih domaćina, što značajno smanjuje troškove proizvodnje. Heterologna ekspresija također omogućava promjenu promotorskih i signalnih sekvenci, koje usmjeravaju lakazu van stanice, čime se osigurava jednostavno, brzo i ekonomično pročišćavanje enzima (Majeau i sur., 2010; Colao i sur., 2006).

Za heterolognu ekspresiju proteina, jedan od najpogodnijih domaćina je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Kao eukariot, kvasac *S. cerevisiae* u rekombinantne proteine uvodi odgovarajuće posttranslacijske modifikacije, kao što su glikozilacija i disulfidni mostovi. Osim što posjeduje GRAS status (engl. Generally Recognized As Safe), ovaj kvasac također ima kratko generacijsko vrijeme, jednostavan je za održavanje te ga je relativno lako ciljano genetski manipulirati, kao i nad njim provoditi nasumičnu mutagenezu. Ovakvo uvođenje mutacija može povećati njegovu koncentraciju i pozitivno utjecati na specifična svojstva enzima, poput termostabilnosti i otpornosti na koncentrirana organska otapala (Zumarraga i sur., 2007) ili prisustvo klora (Kittl i sur., 2012).

Jedan od sustava za heterolognu ekspresiju proteina uključuje izlaganje proteina na površini stanice, tj. na staničnoj stijenci kvasca (engl. surface display). Ovakav pristup podrazumijeva fuziju enzima od interesa s odabranim proteinom stanične stijenke, poput α -aglutinina ili

flokulina, koji omogućuju izlaganje fuzioniranog rekombinantnog proteina na površini stanične stijenke. Kako bi se lokalizirali na staničnu površinu, ovakvi rekombinantni proteini najprije prolaze kroz sekretorni put (Kato-Murai i Ueda, 2008) te se nakon izlaska iz stanice na staničnu stjenku vežu kovalentno ili nekovalentno.

Pored kvasca *S. cerevisiae*, za heterolognu ekspresiju lakaza često se koriste i drugi kvasci, poput vrsta *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* i *Ogataea methanolica*. Međutim, mogućnost ekspresije različitih lakaza značajno se razlikuje između pojedinih vrsta. Primjerice, lakaza Lcc1 iz gljive *T. versicolor* uspješno se eksprimira u kvascu *P. pastoris*, ali ne i u kvascu *S. cerevisiae*. S druge strane, lakazu Lcc2 moguće je uspješno ekspimirati i u kvascu *S. cerevisiae* (Cassland i Jonsson, 1999). Iako kvasci nisu primarni proizvođači lakaza te se ne mogu mjeriti s filamentoznim gljivama u pogledu prirodne proizvodnje ovih enzima, ipak posjeduju brojne prednosti, poput otpornosti na nepovoljne uvjete te jednostavnosti uzgoja i rukovanja. Ipak, za ekonomski isplativu proizvodnju lakaza potrebna su daljnja istraživanja i prilagodbe heterolognih sustava ekspresije (Antošova i Sychrova, 2015).

2.4. Genetsko inženjerstvo lakaza u kvascu

Genetske manipulacije lakaza u kvascima često uključuju uvođenje nasumičnih ili ciljanih mutacija kako bi se dobile nove, modificirane inačice lakaza. Takve lakaze mogu imati karakteristike povoljnije za industrijsku primjenu, poput povećane stabilnosti enzima, šireg raspona optimalnog pH i povećanog afiniteta za različite supstrate. Osim što olakšavaju industrijsku primjenu, modificirane lakaze također omogućuju bolje razumijevanje odnosa između strukture i funkcije enzima.

Novija istraživanja sve više se oslanjaju na alate sintetske biologije, s naglaskom na primjenu *de novo* sintetiziranih gena s optimiziranim omjerima sinonimnih kodona, koji su se pokazali ključnima za postizanje većih prinosa enzima (Lu i sur., 2012). Osim toga, primjenjuje se i usmjerena evolucija, kojom je identificirano 14 mutacija koje su za lakazu iz gljive *M. thermophila* ekspimirane u kvascu *S. cerevisiae* dovele do 170-strukog povećanja ukupne aktivnosti enzima, 22-strukog povećanja katalitičke aktivnosti (k_{cat}) te poboljšane tolerancije na organska otapala (Bulter i sur., 2003). Konačno, uspješno su konstruirane i lakazne kimere, nastale kombiniranjem fragmenata lakaze iz gljive *P. cinnabarinus* i fragmenata lakaze PM1 iz bazidiomiceta. Ove kimere pokazale su veću stabilnost u širem rasponu temperatura i pH, kao i bolji afinitet za odabrane supstrate (Pardo i sur., 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- agarozna – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- agar, kvaščev ekstrakt – Biolife (Milano, Italija)
- tripton – Difco (Detroit, SAD)
- oligonukleotidi korišteni za provođenje reakcije PCR – Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska)
- triptofan – Acros Organics (Geel, Belgija)
- uracil – ThermoFischer Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- leucin – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- soli: natrijev klorid – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska), kalcijev klorid – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD), litijev acetat – Acros Organics (Geel, Belgija)
- ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- voda za provođenje reakcije PCR – HZTH (Zagreb, Hrvatska)
- D(+) glukoza, bezvodna – Lach-ner (Továrni, Češka)
- sinapinska kiselina, 2,6-dimetoksifenol (DMP), gvajakol, etidijev bromid, polietilen glikol (PEG) 4000, dimetil sulfoksid (DMSO), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) (ABTS) – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- visokotočna Q5 DNA polimeraza, pufer za lančanu reakciju polimerazom Q5 (PCR), restrikcijski enzim DpnI, deoksiribonukleotidi (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), boja za nanošenje uzorka na gel koja ne sadrži SDS (6x koncentrirana), standard za DNA elektroforezu – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- jednonančani DNA nosač izoliran iz sperme lososa – Invitrogen (Waltham, Massachusetts, SAD)
- komplet kemikalija za izolaciju DNA iz agaroznog gela, komplet kemikalija za izolaciju plazmidne DNA iz bakterije *Escherichia coli* – Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)
- komplet kemikalija za visokoefikasnu transformaciju kompetentnih stanica bakterije *E. coli* - New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)

3.1.2. Uređaji

- automatske pipete (10 µL, 100 µL, 1000 µL) – Sartorius (Gottingen, Njemačka)
- autoklav Tuttnauer 2540M – Tuttnauer (Breda, Nizozemska)
- uređaj za provođenje reakcije PCR Mastercycler nexus X2 – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- kadice za elektroforezu MiniSub Cell GT – Bio-Rad (Hercules, California, SAD)
- transiluminator s UV svjetlom UVIDOC HD6 – Uvitec (Cambridge, UK)
- spektrofotometar NanoDrop One – ThermoFischer Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- transiluminator s plavim svjetlom Skylight SuperBlue – Vilber (Collégien, Francuska)
- spektrofotometar Helios γ – ThermoElectric Corporation (West Chester, Philadelphia, SAD)
- centrifuga Centric 322 A – Tehnica (Podplat, Slovenija)
- termostat Dry Block Thermostat Bio TDB-100 – Biosan (Riga, Latvija)
- automatska tresilica Corning LSE – Corning (New York, SAD)
- centrifuga Minispin – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)

3.1.3. Laboratorijski sojevi

Za transformaciju bakterije *Escherichia coli* i konstrukciju željenih plazmida korištene su kompetentne stanice bakterije *E. coli*, soj NEB Stable, genotipa F' *proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zsf::Tn10 (Tet^R)/Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14⁻ Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*.

Aktivnost novokonstruiranih inačica enzima lakaze CtLcc1 ispitivana je u soju BY 4741 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, genotipa MATa *his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*.

3.1.4. Hranjive podloge

Hranjive podloge korištene tijekom izrade ovog završnog rada pripremljene su otapanjem dolje navedenih sastojaka u deioniziranoj vodi, nakon čega su autoklavirane u trajanju od 15 minuta, pri temperaturi od 121°C i nadtlaku od 1 bara.

Hranjive podloge za uzgoj bakterije *E. coli*

– Kruta hranjiva podloga LB

Za pripremu krute hranjive podloge korišteni su tripton (10 g/L), NaCl (10 g/L), kvašičev ekstrakt (5 g/L) i agar (15 g/L). Ampicilin je dodan u hranjivu podlogu prije njezina izlivanja kako bi omogućio selekciju transformiranih bakterija *E. coli*. Konačna koncentracija antibiotika u hranjivoj podlozi iznosila je 100 µg/mL.

– Tekuća hranjiva podloga 2xYT

Za pripremu tekuće hranjive podloge korišteni su tripton (16 g/L), NaCl (5 g/L) i kvašičev ekstrakt (10 g/L). Ampicilin je dodan u hranjivu podlogu neposredno prije njezine upotrebe tako da je njegova konačna koncentracija iznosila 100 µg/mL.

Hranjive podloge za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*

- Hranjiva podloga YPD

Za pripremu tekuće YPD podloge korišteni su pepton (20 g/L), kvašičev ekstrakt (10 g/L) i glukoza (20 g/L).

- Hranjiva podloga YNB His⁻

Za pripremu tekuće YNB His⁻ podloge korišteni su dušična suspenzija za uzgoj kvasca s dodatnim amonijevim sulfatom (6,8 g/L), glukoza (20 g/L), smjesa „drop-out“ (2 g/L), uracil (0,08 g/L), triptofan (0,08 g/L) i leucin (0,16 g/L). Sastav smjese „drop-out“ prikazan je u Tablici 1. Za pripremu krute YNB His⁻ podloge u tekuću podlogu je dodan i agar (16 g/L).

Tablica 1. Sastav smjese „drop-out“.

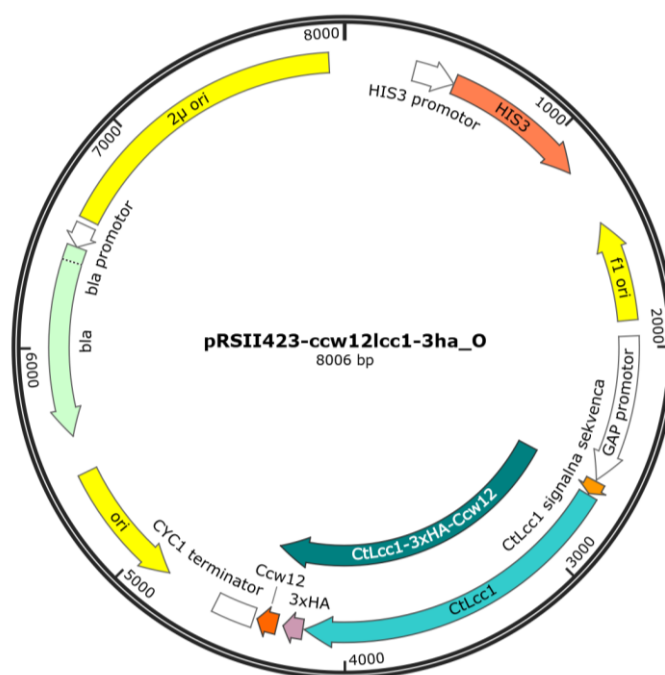
adenin	3,0 g	L-metionin	2,0 g
L-arginin	2,0 g	L-fenilalanin	2,0 g
L-asparagin	2,0 g	L-prolin	2,0 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g	L-serin	6,0 g
L-cistein	2,0g	L-treonin	2,0 g
L-glutamin	2,0 g	L-tirozin	2,0 g
L-glutaminska kiselina	2,0 g	L-valin	2,0 g
L-glicin	2,0 g	p-aminobenzojeva kiselina	0,2 g

L-izoleucin	2,0 g	inozitol	2,0 g
-------------	-------	----------	-------

3.1.5. Plazmidi

Plazmid pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O

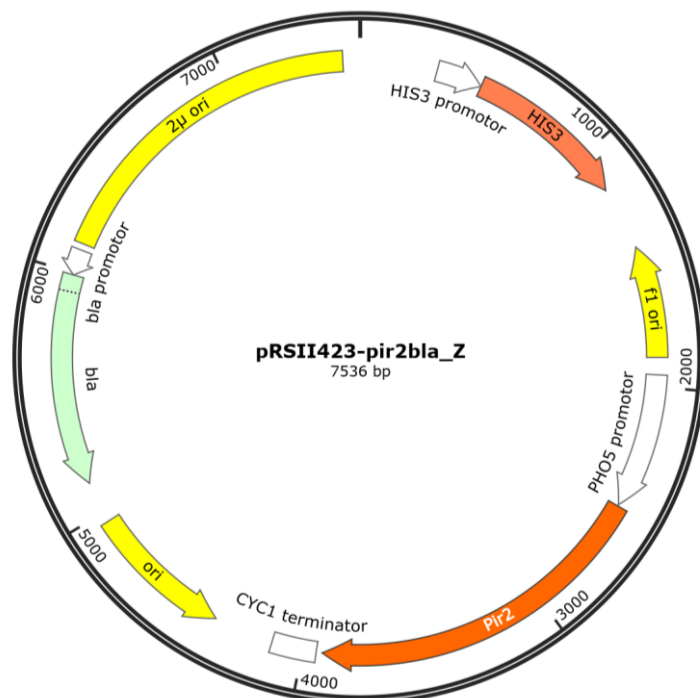
Plazmid pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O (Slika 3) je kružna DNA molekula veličine 8.006 pb koja je tijekom izrade ovog završnog rada korištena kao kalup za konstrukciju ostalih plazmida. Navedeni plazmid sadrži otvoreni okvir čitanja koji kodira za fungalnu lakazu CtLcc1 fuzioniranu sa signalnom sekvencom proteina Ccw12, tri puta uzastopce ponovljenom HA-oznakom i C-terminalnim dijelom proteina Ccw12. Ove sekvence lakazu CtLcc1 usmjeravaju u sekretorni put, omogućuju njezinu detekciju imunoblotom te je kovalentno vežu na kvaščevu staničnu stijenku.



Slika 3. Mapa plazmida pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O. Oznake: 2μ ori – ishodište replikacije kvaščevog plazmida 2μ , ori – plazmidno ishodište replikacije bakterije *E. coli*, bla – selektivni biljeg koji bakteriji *E. coli* omogućava otpornost na antibiotik ampicilin, HIS3 – selektivni biljeg koji kvaščevim auksotrofima za histidin omogućava rast na podlozi bez histidina, f1 ori – ishodište replikacije filamentoznog bakteriofaga M13, GAP promotor – konstitutivan promotor kvaščevog gena *TDH3*, CtLcc1-3xHA-Ccw12 – otvoreni okvir čitanja koji kodira za fuzijski protein fungalne lakaze CtLcc1 i kvaščevog proteina stanične stijenke Ccw12, CtLcc1 – otvoreni okvir čitanja koji kodira za fungalnu lakazu CtLcc1, 3xHA – tri puta uzastopce ponovljena HA proteinska oznaka, CYC1 terminator – terminator kvaščevog gena *CYC1*.

Plazmid pRSII423-pir2bla_Z

Plazmid pRSII423-pir2bla_Z (Slika 4) ne sadrži gen koji kodira za lakazu Lcc1. Soj kvasca transformiran ovim plazmidom služio je kao negativna kontrola tijekom ispitivanja aktivnosti sojeva koji proizvode lakaze budući da derivati soja BY4741 koji ga sadrže mogu rasti na podlozi bez histidina.



Slika 4. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla_Z. Oznake su identične onima na Slici 1, izuzev promotora *PHO5*, koji je inducibilni kvašćev promotor, te gena Pir2 koji kodira za kvašćev protein Pir2.

3.1.6. Početnice

Tablica 2. Početnice korištene za lančanu reakciju polimerazom.

Plazmid	Početnica
pRSII423- ccw12lcc1-3ha- H208Y_G	pb23-083 (GTTTGGATCGCAAGACAA)
	pb23-084 (TTTGTCTTGCGATCCAAACATGTTTTCTCTATCGATGGTCA)
pRSII423- ccw12lcc1-3ha- A239P_H	pb23-085 (TGACTCCATTCAAATTTTTCTGCCCAAAGATACTCCT)
	pb23-086 (AAAATTTGAATGGAGTCAACGG)

pRSII423- ccw12lcc1-3ha- F332A_I	pb23-087 (TTGAATATGGCTTTTGGTTGCTGGTGGTAAGTTTACT)
	pb23-088 (ACCAAAAGCCATATTCAAAGC)
pRSII423- ccw12lcc1-3ha- A458L_J	pb23-089 (ATTGATTTTCATTTGGAATGGTTTCGCTGTTGTTATG)
	pb23-090 (TTCCAAATGAAAATCAATATGGCA)
pRSII423- ccw12lcc1-3ha- P390A_K	pb23-091 (ACCAGCTACTGCTGCTGCTCTGGTTTTCCACATCCATT)
	pb23-092 (AGCAGCAGCAGTAGCTGG)
pRSII423- ccw12lcc1-3ha- P394H_L	pb23-093 (CTGCTGCTCCTGGTTTTCCATCCATTTCACTTGCATGG)
	pb23-094 (GAAAACCAGGAGCAGCAG)

3.2. Metode

3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction) korištena je u ovom radu u svrhu konstrukcije plazmida pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G, H, I J, K, i L. Početnice (Tablica 2) korištene za umnožavanje DNA omogućile su umnažanje cjelokupnog plazmida pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O te istovremeno umetanje točkastih mutacija unutar otvorenog okvira čitanja gena *CtLCC1*. Za provođenje reakcije PCR korištena je visokotočna DNA polimeraza Q5 (New England Biolabs, Ipswich, SAD). U reakcijsku smjesu redom je dodano 33 μ L sterilne deionizirane vode (sdH₂O), 10 μ L 5x koncentriranog Q5 pufera, 2,5 μ L odgovarajućih početnica (10 μ M) te 1 μ L otopine dNTP-ova (10 mM). U smjesu je konačno dodano i 0,5 μ L plazmidne DNA i 0,5 μ L DNA polimeraze Q5. Lančana reakcija polimerazom odvijala se kroz 30 ciklusa na uređaju Mastercycler nexus X2 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Uvjeti provođenja reakcije PCR prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti odvijanja lančane reakcije polimerazom.

	Temperatura (°C)	Vrijeme trajanja
Početna denaturacija	98	30 s
Denaturacija	98	10 s
Sparivanje početnica	61 (pb23-083 – pb23-090)	20 s
	65 (pb23-093, pb23-094)	
	69 (pb23-091, pb23-092)	
Sinteza DNA	72	9 min
Završna sinteza	72	9 min

3.2.2. Agarozna gel elektroforeza

Agarozna gel elektroforeza provedena je u 0,7 %-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen vaganjem 0,21 g agaroze i njenim otapanjem u 30 mL TAE pufera. Nastala otopina zagrijana je do vrenja te potom ohlađena na 50 °C i izlivena u prethodno pripremljeni kalup. Nakon formiranja gela, kalup je prenesen u kadnicu za elektroforezu i uronjen u 0,5 x koncentriran TAE pufer. U jažice su nanoseni uzorci DNA pomiješani sa 6 x koncentriranom bojom za nanošenje uzorka na gel. Elektroforeza je provedena u trajanju od 30 min pri 140 V, nakon čega je gel 20 min inkubiran u otopini etidijeva bromida. Razvijene vrpce vizualizirane su pomoću uređaja UviDoc HD6 (Uvitech, Cambridge, Velika Britanija).

3.2.3. Izolacija DNA iz agaroznog gela

PCR produkti najprije su tretirani s restrikcijskim enzimom DpnI koji cijepa dam⁺ metiliranu DNA, to jest kalup korišten za PCR reakciju. U idućem koraku provedena je agarozna gel elektroforeza (Poglavlje 3.2.3.), nakon koje je gel inkubiran u etidijevom bromidu. DNA vrpce vizualizirane su pomoću plavog svijetla (480 nm) na transiluminatoru Skylight Super-Blue (Vilber, Collegien, Francuska) i izrezane iz gela pomoću špatule. Izolacija DNA iz gela provedena je pomoću seta kemikalija Nucleo-Spin Gel and PCR Clean Up (Machery-Nagel, Düren, Njemačka) prema protokolu proizvođača. Gel je najprije otopljen u NTI puferu na 60 °C na termostatu Dry Block Bio TDB-100 (Biosan, Riga, Latvija), a zatim prenesen na kolonu s membranom. Kolona je dva puta isprana od nečistoća puferom NT3, osušena centrifugiranjem i prebačena u mikrokivetu od 1,5 mL. Zatim je DNA adsorbirana na membranu puferom za eluciju isprana s kolone. Koncentracija izolirane DNA izmjerena je spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop One (ThermoFischer Scientific, Waltham, SAD).

3.2.4. Sastavljanje fragmenata DNA po Gibsonu

Sastavljanje PCR fragmenata u kružne molekule provedeno je pomoću 2 µl otopine NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, SAD) kojoj je dodano 2 µl uzorka DNA izoliranog iz agaroznog gela. Smjesa je zatim inkubirana u uređaju za PCR Mastercycler nexus X2 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) 1 h/50 °C.

3.2.5. Transformacija bakterije *E. coli*

Za transformaciju su korištene kompetentne stanice soja NEB Stable bakterije *E. coli* (New England Biolabs, Ipswich, SAD), prethodno odmrznute na ledu. U otopinu stanica dodano je 2 µl plazmidne DNA te je smjesa pažljivo promiješana okretanjem kivete. Stanice su tada izložene temperaturnom šoku tako što je smjesa inkubirana 30 min na ledu, zatim 30 s na 42 °C te konačno 5 min na ledu. U smjesu je dodano 950 µl otopine hranjivog medija SOC zagrijanog na sobnu temperaturu, nakon čega je smjesa inkubirana na tresilici na 37 °C/180 okr min⁻¹/60 min. Konačno, transformanti su nacijepljeni na LB hranjive podloge s ampicilinom i inkubirani preko noći na 37 °C.

3.2.6. Izolacija plazmida iz bakterije *E. coli*

Transformanti porasli na krutim LB hranjivim podlogama precijepljeni su u tekuće LB hranjive podloge s ampicilinom i inkubirani preko noći na 37 °C. Izolacija plazmidne DNA iz ovih bakterijskih kultura provedena je pomoću kompleta kemikalija Nucleo-Spin Plasmid (Machery-Nagel, Düren, Njemačka) prema protokolu proizvođača. Uzet je alikvot od 3 mL prekonodne kulture stanica *E. coli* i centrifugiran uz izdvajanje supernatanta. Stanice su resuspendirane dodatkom 250 µL pufera A1, nakon čega je u otopinu dodano 250 µL pufera za lizu A2. Smjesa stanica promiješana je okretanjem kivete i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi kako bi se stanice lizirale. U sljedećem koraku dodano je 300 µL pufera A3 za neutralizaciju lizata te je provedeno centrifugiranje u trajanju od 10 min. Supernatant je nanesen na kolonu s membranom kako bi se plazmidna DNA pročistila od nečistoća. Kolona je isprana dodatkom 500 µL pufera AW, zatim 600 µL pufera A4 te osušena centrifugiranjem. Plazmidna DNA eluirana je s membrane u mikrokivetu pomoću 50 µL pufera AE. Koncentracija plazmidne DNA kvantificirana je pomoću uređaja NanoDrop One (ThermoFischer Scientific, Waltham, SAD).

3.2.7. Sekvenciranje plazmidne DNA po Sangeru

Uzorci za sekvenciranje pripremljeni su u kivetama od 1,5 mL tako da je u 12 µL otopine plazmidne DNA (100 ng/µL) dodano 3 µL otopine odgovarajuće početnice (20 µM). Pripremljeni uzorci otpremljeni su u tvrtku Microsynth (Beč, Austrija) koja je provela sekvenciranje metodom po Sangeru prema protokolu Economy Run.

3.2.8. Transformacija kvasca *S. cerevisiae* litijevim acetatom

Stanice kvasca *S. cerevisiae* uzgojene su do logaritamske faze rasta, odnosno do optičke gustoće od približno 2 OD₆₀₀/mL. Uzgoj stanica proveden je tako da je kolonija kvasca naciyepljena u 10 mL tekuće YPD podloge i inkubirana preko noći na tresilici pri 30 °C. Iz prekonodne kulture izuzeto je 2,9 mL suspenzije kojom je naciyepljeno 50 mL podloge YPD. Novonaciyepljena kultura inkubirana je na tresilici 4 h/180 okr min⁻¹/30 °C. Kada je optička gustoća ove kulture dosegla 1,7 OD₆₀₀/mL, kultura je centrifugirana 5 min/3.000 okr min⁻¹/20 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen dok je talog stanica resuspendiran u 6 mL 0,1 M litijeva acetata. Nastala suspenzija ponovno je centrifugirana 10 min/3.000 okr min⁻¹/20 °C, nakon čega je supernatant ponovno odbačen. Stanice su resuspendirane u 1,2 ml sdH₂O, nakon čega je za svaku transformacijsku smjesu iz suspenzije izuzeto po 100 µL. U sljedećem koraku denaturiran je DNA nosač UltraPure™ Salmon Sperm DNA Solution (Invitrogen, Waltham, SAD) zagrijavanjem 8 min/100 °C, nakon čega je otopina hlađena 5 min na ledu. U svaki uzorak sa 100 µL suspenzije kvasaca dodano je po 10 µL denaturiranog DNA nosača i 2 µL izolirane plazmidne DNA, nakon čega su uzorci 30 min inkubirani na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorci su vorteksirani te je u njih dodano 790 µl smjese PEG-LiOAc-DMSO (600 µl PEG₃₃₅₀ (50 %), 90 µl LiOAc (1 M), 100 µl DMSO). Suspenzija stanica promiješana je okretanjem kivete. Uzorci su zatim inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi te zatim u termostatu Dry Block Bio TDB-100 (Biosan, Riga, Latvija) 14 min/42 °C. Nakon ovog koraka, uzorci su centrifugirani 2 min/8.000 okr min⁻¹/20 °C, uz izdvajanje supernatanta. Stanice su resuspendirane u 250 µL otopine CaCl₂ (5 mM) i inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi. Konačno, transformacijske smjese naciyepljene su na krute YNB His⁻ hranjive podloge i inkubirane 2 dana/30 °C. Nakon što su kolonije porasle na pločama, po dvije kolonije su odabrane sa svake hranjive podloge i precijepljene u tekuću YNB His⁻ hranjivu podlogu.

3.2.9. Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti lakaze na krutim podlogama

Aktivnost lakaza ispitivana je na krutim YNB His⁻ hranjivim podlogama (Poglavlje 3.1.4.) s dodatkom supstrata na kojima su lakaze aktivne. U podlogu su osim supstrata za lakaze dodani i bakrovi ioni koji služe kao kofaktori esencijalni za aktivnost lakaza. Kao supstrati korišteni su ABTS i 2,6-dimetoksifenol (DMP). Lakaze oksidiraju ABTS do kationskog radikala zelene boje, i DMP do narančasto-smeđe obojenog produkta (Camarero i sur., 2012).

Svi potrebni sastojci za hranjive podloge, izuzev supstrata za lakaze i bakrova sulfata, najprije su odvagani i otopljeni u 50 mL vode te autoklavirani 15 min/121 °C i nadtlaku od 1 bara. Otopine supstrata lakaza, koncentracija prikazanih u tablici 4, i bakrov sulfat otopljeni su u sdH₂O ili kemikaliji DMSO i sterilno filtrirani. Nakon autoklaviranja, YNB His⁻ podloge ohlađene su na 50-60 °C te su u njih netom prije izlivanja u Petrijeve zdjelice dodani potrebni volumeni

supstrata i bakrova sulfata. Podloge su preko noći skladištene u mraku na 4 °C. Konačne koncentracije supstrata u hranjivim podlogama prikazane su u Tablici 4.

Aktivnost lakaza ispitana je praćenjem rasta i obojenja kvašćevih transformanata na podlogama sa supstratima. Na svaku hranjivu podlogu naneseo je po 5 µL kvašćevih stanica koje su nosile plazmid pRSII423-pir2bla_Z (Slika 4), zatim 5 µL stanica koje su sadržavale ishodni plazmid pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O (pozitivna kontrola, Slika 3), te po 5 µL stanica koje su sadržavale novokonstruirane plazmide. Ispitana su po dva transformanta svakog plazmida. Podloge su inkubirane na 30 °C tijekom 2-3 dana, do obojenja pozitivne kontrole.

Tablica 4. Koncentracija korištenih otopina supstrata za lakaze.

Supstrat	Koncentracija radne otopine (mg/mL)	Koncentracija u podlozi (mM)	Volumen radne otopine CuSO ₄ (1 M) (mL)
ABTS	10,0	0,500	0,0500
Gvajakol	0,1	0,805	0,0175
Sinapinska kiselina*	2,8	0,250	0,0500
DMP	19,3	3,000	0,0500

*otopljena u DMSO-u

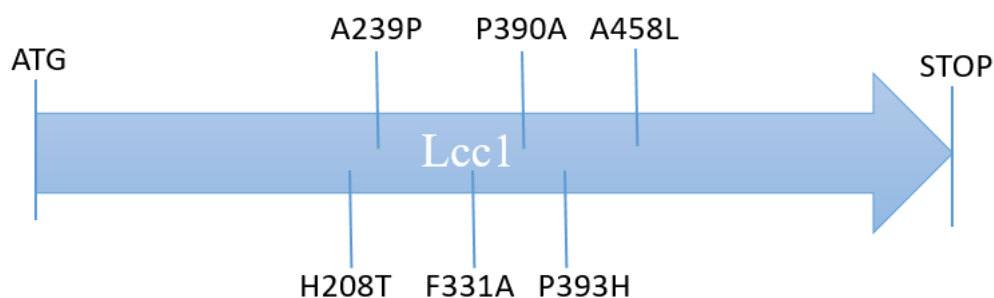
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

Cilj ovog završnog rada bio je uvesti točkaste mutacije u gen koji kodira za rekombinantnu fungalnu lakazu CtLcc1-3xHA-Ccw12, novokonstruirane inačice gena eksprimirati u kvascu *S. cerevisiae* te odrediti kako uvedene mutacije utječu na aktivnost rekombinantne lakaze. U tu svrhu konstruirani su plazmidi pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G, H, I J, K, i L, od kojih je svaki u otvorenom okviru čitanja gena *CtLCC1-3xHA-CCW12* nosio po jednu točkastu mutaciju (Poglavlje 4.1.1.). Ovim plazmidima transformiran je soj BY 4741 kvasca *S. cerevisiae* (Poglavlje 4.1.2.) nakon čega su odabrani transformanti nacijepljeni su na hranjive podloge sa supstratima koje lakaze mogu oksidirati, pri čemu nastaju obojeni produkti na temelju kojih se može procijeniti aktivnost novokonstruiranih inačica rekombinantne lakaze (Poglavlje 4.1.3.).

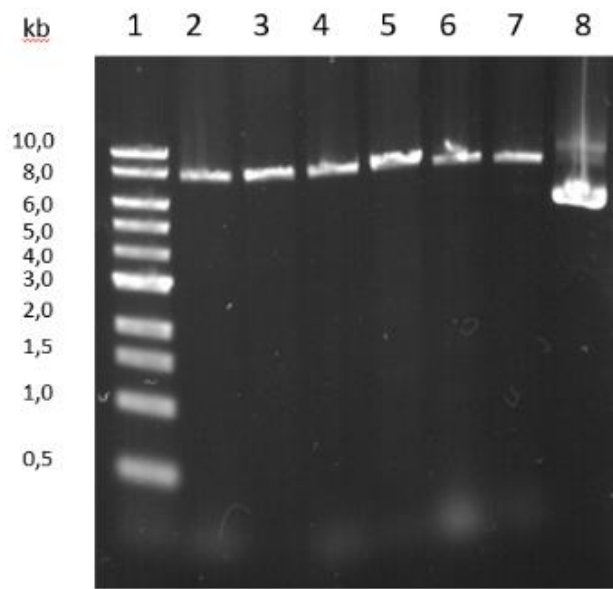
4.1.1. Konstrukcija plazmida pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G, H, I J, K, i L

U prethodnim istraživanjima provedenima u Laboratoriju za biokemiju konstruiran je plazmid pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O (Poglavlje 3.1.5.). Navedeni plazmid kodira za rekombinantnu fungalnu lakazu CtLcc1-3xHA-Ccw12 koju kvasac *S. cerevisiae* kovalentno veže na svoju staničnu stijenku i koja na svojem C-kraju nosi tri puta uzastopce ponovljenu hemaglutininsku proteinsku oznaku te dio proteina Ccw12. Ovaj plazmid korišten je kao kalup za sintezu plazmida pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G, H, I J, K, i L, koji se od izvornog plazmida razlikuju u po jednoj točkastoj mutaciji (slika 5).



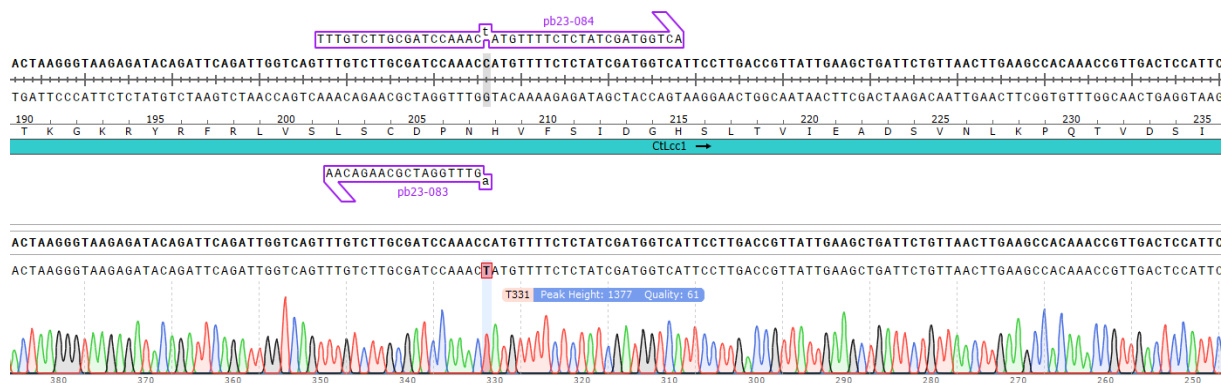
Slika 5. Shematski prikaz mutacija uvedenih u otvoreni okvir čitanja koji kodira za rekombinantnu lakazu CtLcc1-3xHA-Ccw12. 1) H208T: supstitucija citozina s timinom mijenja 208. aminokiselinu (histidin) u tirozin, 2) A239P: supstitucija gvanina s citozinom mijenja 239. aminokiselinu (alanin) u prolin, 3) F331A: supstitucija dva timina s gvaninom i citozinom mijenja 331. aminokiselinu (fenilalanin) u alanin, 4) P390A: supstitucija citozina s gvaninom mijenja 390. aminokiselinu (prolin) u alanin, 5) P393H: supstitucija citozina s adeninom i adenina s citozinom mijenja 393. aminokiselinu (prolin) u histidin, 6) A458L: supstitucija gvanina s citozinom i citozina s timinom mijenja 458. aminokiselinu (alanin) u leucin.

Uvođenje preciznih točkastih mutacija u okosnicu plazmida pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O provedeno je lančanom reakcijom visokotočnom polimerazom Q5 (Poglavlje 3.2.1.), pri čemu su korištene početnice navedene u tablicu 2. Uspješnost reakcije provjerena je agaroznom gel elektroforezom (Poglavlje 3.2.2.) prilikom čega je veličina nastalih fragmenata na gelu (Slika 6) uspoređena sa standardom za elektroforezu i s veličinom superzavijenog izvornog plazmida pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O koji je služio kao kalup.



Slika 6. Rezultat agarozne gel elektroforeze fragmenata umnoženih lančanom reakcijom polimerazom. 1) standard za DNA elektroforezu NEB 1 kb Ladder; 2-7) redom, PCR produkti potrebni za konstrukciju plazmida pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G, H, I, J, K i L; 8) plazmid pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O.

PCR fragmenti izolirani su iz agaroznog gela i pročišćeni kompletom kemikalija NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Poglavlje 3.2.3.) te potom cirkularizirani metodom sastavljanja DNA fragmenata po Gibsonu (poglavlje 3.2.4.). Cirkularizirane molekule zatim su korištene za transformaciju soja NEB Stable bakterije *E. coli* (Poglavlje 3.2.5.). Nakon provedene transformacije bakterije su nacijepljene na selektivne hranjive podloge s ampicilinom te inkubirane preko noći na 37 °C (Poglavlje 3.2.5.). Nakon što su transformanti porasli, odabrana je po jedna kolonija sa svake ploče i precijepljena u tekuću LB podlogu s ampicilinom. Ovako pripremljena bakterijska kultura inkubirana je preko noći na 37 °C nakon čega je iz nje izolirana plazmidna DNA pomoću kompleta kemikalija NucleoSpin Plasmid prema protokolu proizvođača (Poglavlje 3.2.6.). Izolirani plazmidi zatim su podvrgnuti sekvenciranju metodom po Sangeru (Poglavlje 3.2.7.) koja je potvrdila da oni sadrže željene mutacije (Slika 7).



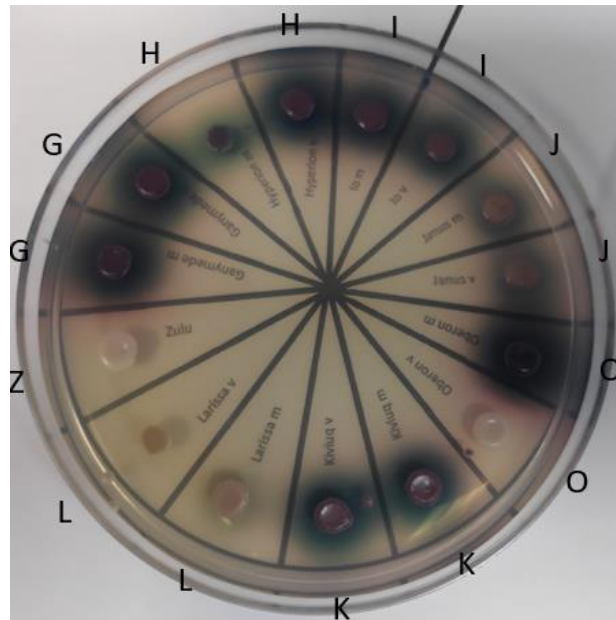
Slika 7. Rezultati sekvenciranja plazmida pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G metodom po Sangeru. U gornjem djelu slike prikazana je izvorna regija plazmida kao i mjesto sparivanja početnica, dok su u donjem djelu slike su prikazani rezultati sekvenciranja po Sangeru koji potvrđuju da plazmid nosi željenu mutaciju.

4.1.2. Konstrukcija sojeva kvasca *S. cerevisiae*

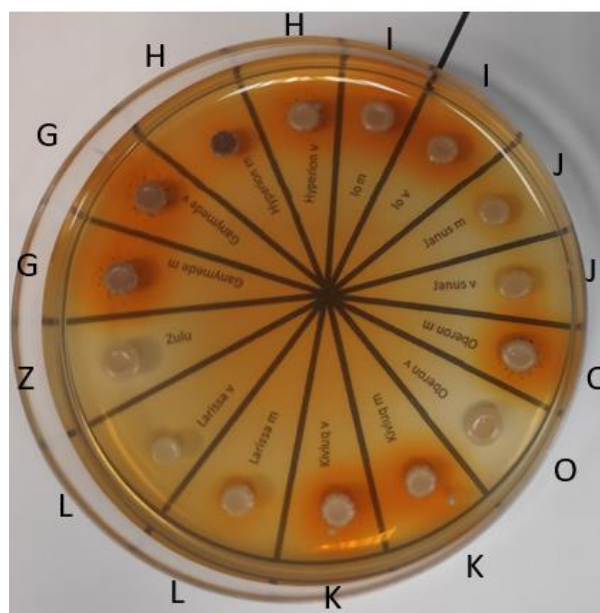
Kako bismo ispitali aktivnost novokonstruiranih lakaza, soj BY 4741 transformiran je plazmidima pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G, H, I, J, K i L. Transformacija kvasca provedena je pomoću litijevog acetata nakon čega su transformanti selekcionirani na YNB His⁻ krutim hranjivim podlogama. Nakon što su transformanti porasli na krutim selektivnim podlogama, oni su precijepljeni u tekuće hranjive podloge YNB His⁻ (Poglavlje 3.2.8.).

4.1.3. Ispitivanje aktivnosti novokonstruiranih inačica lakaze CtLcc1

Kako bi ispitali aktivnost novokonstruiranih inačica lakaza, transformanti kvasca *S. cerevisiae* koji nose odgovarajuće plazmide nacijepšeni su na krute hranjive podloge obogaćene bezbojnim kromogenim supstratima ABTS (slika 8) i DMP (slika 9). Ove supstrate lakaze prevode u intenzivno obojene produkte. Specifično, ABTS je sintetski nefenolni medijator koji lakaze oksidiraju u zeleno obojeni radikalni kation ABTS⁺, dok je DMP fenolni spoj čijom oksidacijom nastaje simetrični smeđe-narančasto obojeni dimer. Uz transformante koji su nosili šest novokonstruiranih plazmida, na kromogene podloge također je nacijepšeni i soj koji je nosio izvoran plazmid pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O, tj. soj koji kodira za izvornu inačicu rekombinantne lakaze CtLcc1-3xHA-Ccw12, kao i negativna kontrola, tj. soj s plazmidom pRSII423-pir2bla_Z koji ne kodira za lakazu (Poglavlje 3.1.5.).



Slika 8. Rast i obojenje transformanata kvasca koji ekspimiraju lakaze na kromogenoj podlozi obogaćenom supstratom ABTS. Obojenje stanica i njihove okoline korelira s količinom lakaze koju stanice izlažu na površini stanične stijenke. Za svaki ispitivani plazmid naciijepljena su po dva transformanta. H) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_H, I) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_I, J) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_J, O) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O, K) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_K, L) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_L, Z) pRSII423-pir2bla_Z, G) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G.



Slika 9. Rast i obojenje transformanata kvasca koji ekspimiraju lakaze na kromogenoj podlozi obogaćenom supstratom DMP. Obojenje stanica i njihove okoline korelira s količinom lakaze koju stanice izlažu na površini stanične stijenke. Za svaki ispitivani plazmid naciijepljena su po dva transformanta. H) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_H, I) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_I, J)

pRSII423-ccw12lcc1-3ha_J, O) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O, K) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_K, L) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_L, Z) pRSII423-pir2bla_Z, G) pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G.

Podloge s kromogenim supstratima jasno su pokazale da uvedene mutacije značajno utječu na aktivnost lakaza. U usporedbi sa šest novokonstruiranih inačica lakaza, izvorna inačica lakaze Lcc1, kodirana na plazmidu pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O (uzorak 6 na slikama 8 i 9), imala je najveću aktivnost na oba testirana kromogena supstrata. Iako novouvedene mutacije nisu potpuno inaktivirale enzim, primjetno su smanjile njegovu aktivnost. Pritom su se aktivnosti pojedinih inačica lakaza na oba kromogena supstrata okvirno podudarale, pri čemu su inačice CtLcc1-3xHA-Ccw12_G, H i K bile zamjetno aktivnije od inačica J i L. Dodatno, po dva transformanta koji nose plazmide pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O (uzorci 6 i 7) i H (uzorci 1 i 15) međusobno su pokazivala značajne razlike u aktivnosti, što sugerira postojanje najmanje dviju subpopulacija transformanata i potencijalnu nestabilnost konstrukata. Dakle, ovi rezultati pokazuju da uvedene točkaste mutacije smanjuju aktivnost rekombinantne lakaze CtLcc1-3xHA-Ccw12 u različitoj mjeri te ukazuju na moguću nestabilnost određenih konstrukata.

4.2. Rasprava

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanični modelni eukariot koji se često koristi kao proizvodni organizam u tradicionalnoj i suvremenoj biotehnologiji. U posljednjih nekoliko desetljeća razvijene su metode za izlaganje rekombinantnih proteina na površini njegove stanične stijenke, čime se ova struktura pretvara u katalitički aktivan materijal. Ova tehnologija omogućuje direktnu primjenu kvasca u različitim biotehnološkim procesima, gdje sama površina stanice služi kao biokatalizator, povećavajući efikasnost i specifičnost katalitičkih reakcija.

Cilj ovog završnog rada bio je konstruirati nove inačice rekombinantne lakaze CtLcc1-3xHA-Ccw12, koje se od izvorne inačice enzima razlikuju zamjenom jedne do dvije aminokiseline, te ispitati utjecaj tih zamjena na enzimsku aktivnost. Za konstrukciju novih inačica enzima korištena je metodologija sklapanja fragmenata po Gibsonu u kombinaciji s lančanom reakcijom polimerazom Q5, visokotočnom polimerazom sposobnom za umnažanje DNA fragmenata do 20 kb. U ovom pristupu, željene mutacije bile su kodirane u početnicama korištenima za provođenje reakcije PCR, omogućujući jednostavnu zamjenu nekoliko parova baza u plazmidnoj okosnici. Nakon reakcije PCR, plazmidni kalup je razgrađen endonukleazom DpnI, a nastali linearni PCR produkt cirkulariziran je kako bi se dobio mutirani plazmid. Ovaj pristup pokazao se bržim, jednostavnijim i jeftinijim od klasične mutageneze prema Kunkelu.

U ovom završnom radu aktivnost lakaza određivana je uzgojem stanica kvasca na krutoj

selektivnoj hranjivoj podlozi obogaćenoj kromogenim supstratima za lakaze ABTS i DMP. Iako je ova metoda semikvantitativna, omogućila je efikasnu usporedbu novokonstruiranih inačica lakaza s izvornom rekombinantnom lakazom CtLcc1-3xHA-Ccw12_O. Međutim, korišteni kromogeni supstrati omogućili su određivanje aktivnosti lakaza samo za određeni podskup supstrata te nisu pružili mogućnost kvantitativne usporedbe različitih inačica lakaza. Za precizniju kvantitativnu analizu potrebno je razviti dodatne metode koje bi kombinirale korištenje kromogenih supstrata s uzgojem stanica u tekućoj hranjivoj podlozi, čime bi se omogućila točnija evaluacija aktivnosti enzima.

Konačno, rezultati ovog završnog rada pokazali su da točkaste mutacije koje povećavaju aktivnost lakaza sličnih lakazi CtLcc1 nemaju isti učinak na ispitivanu rekombinantnu lakazu CtLcc1-3xHA-Ccw12. Naime, ove mutacije su smanjile aktivnost rekombinantne lakaze vezane na staničnu stijenkku, vjerojatno destabilizirajući tercijarnu strukturu enzima, smanjujući efikasnost njegovog prolaska kroz endoplazmatski retikulum ili otežavajući njegovo zadržavanje na staničnoj stijenci. Da bi se identificirale točkaste mutacije koje bi mogle povećati aktivnost ispitivane rekombinantne lakaze, bilo bi uputno provesti nasumičnu mutagenezu proteina CtLcc1-3xHA-Ccw12 i dobivene varijante evaluirati na podlogama s kromogenim supstratima.

5. ZAKLJUČCI

Temeljem ovog eksperimentalnog rada možemo zaključiti:

1. Primjenom sklapanja fragmenata DNA metodom po Gibsonu u kombinaciji s lančanom reakcijom visokotočnom polimerazom Q5 uspješno su konstruirani plazmidi pRSII423-ccw12lcc1-3ha_G,H,I,J,K i L koji kodiraju za inačice rekombinantne lakaze CtLcc1-3xHA-Ccw12.
2. Selektivne hranjive podloge s kromogenim supstratima za lakaze ABTS i DMP mogu se koristiti za semikvantitativno određivanje aktivnosti lakaza.
3. Ishodišna inačica rekombinantne lakaze CtLcc1-3xHA-Ccw12, za koju kodira plazmid pRSII423-ccw12lcc1-3ha_O, aktivnija je od šest novokonstruiranih inačica lakaza.

6. POPIS LITERATURE

Ali M., Sreekrishnan T.R. (2001) Aquatic Toxicity From Pulp and Paper Mill Effluents: A Review. *Adv Environ Res* **5**, 175-196. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(00\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(00)00055-1)

Antošová Z, Sychrová H. (2016) Yeast hosts for the production of recombinant laccases: a review. *Mol Biotechnol* **58**, 93-116. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9910-1>

Brijwani K., Huss A., Vadlani P. (2010) Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Enzyme research* 2010, 149748. <https://doi.org/10.4061/2010/149748>

Bulter T., Alcalde M., Sieber V., Meinhold P., Schlachtbauer C. i Arnold F. H. (2003) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 987–995. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.987-995.2003>

Camarero S., Pardo I., Cañas A.I., Molina P., Record E., Martínez A.T. I sur. (2012) Engineering platforms for directed evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol.* **78**, 1370-1384. <https://doi.org/10.1128/AEM.07530-11>

Cassland, P. i Jönsson L. J. (1999) Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied microbiology and biotechnology* **52**, 393-400. <https://doi.org/10.1007/s002530051537>

Colao M.C., Lupino S., Garzillo A.M., Buonocore V. i Ruzzi M. (2006) Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microb Cell Fact* **5**, 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-31>

Couto S. R., Herrera J. L. T. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* **24**, 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>

Desai S.S. i Nityanand, C. (2011) Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology* **3**, 98-124. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.98.124>

Dwivedi U.N., Singh P., Pandey V.P. i Kumar A. (2011) Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis* **68**, 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>

Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S. i Sannia G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 369–385. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>

Gochev V. K. i Krastanov A.I. (2007) Fungal laccases. *Bulg. J. Agric. Sci.* **13**, 75-83.

Khatami S. H., Vakili O., Movahedpour A., Ghesmati Z., Ghasemi H. i Taheri-Anganeh M. (2022) Laccase: Various types and applications. *Biotechnology and applied biochemistry* **69**, 2658–2672. <https://doi.org/10.1002/bab.2313>

Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H. i sur. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

Golz-Berner K., Walzel B., Zastrow L. i Doucet O. (2004) Cosmetics and dermatological preparation containing copper-binding proteins for skin lightening. *Int Pat Appl WO2004017931*.

Kato-Murai M. i Ueda M. (2008) Novel application of yeast molecular display system to analysis of protein functions. *J. Biol. Macromol.* **8**, 3-10.

Kittl R., Mueangtoom K., Gonaus C., Khazaneh S.T., Sygmund C., Haltrich D. i sur. (2011) A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.* **157**, 304-314. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.11.021>

Loi M., Glazunova O., Fedorova T., Logrieco A. F. i Mulè G. (2021) Fungal Laccases: The Forefront of Enzymes for Sustainability. *Journal of fungi* **7**, 1048. <https://doi.org/10.3390/jof7121048>

Lu J. Z., Guo Q., Cui M. L., Yang L., Du S. S., Ruan H. I sur. (2012) Construction of a yeast cell-surface display system and expression of *Trametes* sp laccase. *Advanced Material Research* **347-353**, 3635–3640.

Majeau J. A., Brar S. K. i Tyagi R. D. (2010) Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* **101**, 2331–2350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.087>

Pardo I., Vicente A.I., Mate D.M., Alcalde M. i Camarero S. (2012) Development of chimeric laccases by directed evolution. *Biotechnol Bioeng.* **109**, 2978-2986. <https://doi.org/10.1002/bit.24588>

Riva S. (2006) Laccases: Blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* **24**, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006>

Reiss R., Ihssen J., Richter M., Eichhorn E., Schilling B. i Thöny-Meyer L. (2013) Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PloS one* **8**, e65633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065633>

Sharma P., Goel R. i Capalash N. (2007) Bacterial laccases, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 823-832. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9305-3>

Shraddha Shekher, R., Sehgal S., Kamthania M. i Kumar A. (2011) Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme research* 2011, 217861. <https://doi.org/10.4061/2011/217861>

Thurston C. F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-Sgm* **140**, 19–26. <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>

Viswanath B., Rajesh B., Janardhan A., Kumar A. P. I Narasimha, G. (2014) Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res.* 2014, 163242. <https://doi.org/10.1155/2014/163242>

Yaver D. S., Overjero M. D., Xu F., Nelson B. A., Brown K.M., Halkier T. I sur (1999) Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase *lcc1*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4943–4948. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4943-4948.1999>

Zumarraga M., Camarero S., Shleev S., Martinez-Arias A., Ballesteros A., Plou F. J. i Alcalde M. (2008) Altering the laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra. *Proteins* **71**, 250–260. <https://doi.org/10.1002/prot.21699>

Izjava o izvornosti

Ja Paola Franković izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Paola Franković
Vlastoručni potpis