

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Marija B. Blažić

**Proteinski inženjering i razvoj visoko efikasnih metoda za pretraživanje
biblioteke gena celobioza-dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* za
povećanje enzimske aktivnosti**

doktorska disertacija

Beograd, jun 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Marija B. Blažić

**Protein engineering and development of high-throughput screening methods
for *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose-dehydrogenase gene library
toward higher enzyme activity**

Doctoral Dissertation

Belgrade, June 2019.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTOR:

dr Radivoje Prodanović

vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Marija Gavrović-Jankulović

redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet

dr Ksenija Radotić Hadži-Manić

naučni savetnik

Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Katedre za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju (IHTM-a), Univerziteta u Beogradu.

Zahvalna sam mentoru, dr Radivoju Prodanoviću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na korisnim savetima i pomoći pri izradi i pisanju ovog rada i na podršci tokom svih godina saradnje.

Zahvaljujem se dr Mariji Gavrović-Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na vremenu koje je posvetila čitanju ove disertacije, kao i na korisnim savetima naročito u prvim godinama rada ove disertacije i savetima oko njenog završetka.

Zahvaljujem se dr Kseniji Radotić Hadži-Manić, naučnom savetniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja, članu komisije na savetima i sugestijama koje su pomogle u oblikovanju ovog rada.

Zahvaljujem se dr Raluki Ostafe sa Instituta za Molekularnu Biotehnologiju, Ahen, Nemačka, koja je bila domaćin i pomoćnik u delu izrade ove disertacije.

Svim kolegama iz laboratorije 412 sam izuzetno zahvalna, jer su ukazivali pomoć kad god je bila zatražena. Takođe se zahvaljujem kolegama iz laboratorija 429 i 434 na druženju i vremenu koje smo zajedno proveli tokom svih ovih godina.

Koleginici dr Gordani Kovačević neizmerno sam zahvalna na dragocenoj pomoći tokom pisanja teze.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima na dugogodišnjoj podršci, a naročito mami koja je uvek bila lektor i najbolja podrška dok je bila živa, najboljoj sestri i zetu na razumevanju koji su imali i podršci koju su pružali.

Zahvaljujem se i prijateljima koji su bili uz mene tokom izrade ove doktorske disertacije.

Proteinski inženjering i razvoj visoko efikasnih metoda za pretraživanje biblioteke gena celobioza-dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* u cilju povećanja enzimске aktivnosti

SAŽETAK

Celobioza-dehidrogenaza (CDH) je ekstracelularni enzim proizveden od strane mnogih gljiva bele truleži, uključujući i dobro proučen *P. chrysosporium*. Enzim oksiduje širok spektar elektron akceptora kao što su krajevi celobioze i celo-oligosaharida, produkata celulozne biorazgradnje, do njihovih odgovarajućih 1,5-laktona, koji se potom spontano hidrolizuju do karboksilnih kiselina u vodenim rastvorima. Smatra se da zajedno sa celulazama i lignin peroksidazama CDH igra važnu ulogu u biološkoj razgradnji nerastvorne celuloze od strane gljiva bele truleži. CDH takođe može da osim na solubilne elektron akceptore prenese elektrone i na elektrodu i da se iskoristi za pravljenje amperometrijskih biosenzora za merenje koncentracije celobioze i naročito detekciju laktoze u hrani. Da bi se poboljšala upotrebljivost CDH za razgradnju celuloze, proizvodnju celobionske i laktobionske kiseline kao i za merenje koncentracije disaharida neophodno je povećati njenu aktivnost i eventualno stabilnost. Da bi to postigli mi smo koristili metode proteinskog inženjeringa i visoko efikasne pretrage biokatalizatora. Proteinski inženjering podrazumeva promenu nukleotidne sekvence gena koji kodira određeni protein u cilju promene njegove aktivnosti i stabilnosti.

Kloniranje gena celobioza-dehidrogenaze iz *P. chrysosporium* u *Saccharomyces cerevisiae* InvSC1 je omogućilo korišćenje dirigovane evolucije na našem sistemu. Nasumičnom mutagenezom su dobijeni i nađeni mutanti sa povišenom aktivnošću. Strukturne analize su pokazale da mutacije utiču na aktivnost bilo da se nalaze u blizini aktivnog mesta, bilo preko udaljenih interakcija. Najbolji mutant je pokazao 2,2 puta povećanu k_{cat} za laktozu i celobiozu kao supstrate. Dobijeni mutanti su bili i termostabilniji od divljeg tipa

enzima i proizvode veću količinu vodonik peroksida što ih čini dobrim kandidatima za primenu u biosenzorima i biokatalizi.

Divlji soj i jedan mutant glukoza-oksidade su korišćeni za testiranje upotrebljivosti sistema ekspresije oksidoreduktaznih enzima u vidu himere sa Aga2 proteinom na površini ćelija kvasca *S. cerevisiae* EBY100 za dirigovanu evoluciju enzima. Ekspresioni sistem u vidu himere glukoza-oksidade sa Aga2 proteinom na površini ćelija kvasca je uspešno testiran, i dokazano je da mutanti sa većom aktivnošću u nativnom obliku, takođe pokazuju veću aktivnost i u konstrukt sa Aga2, što ukazuje da se dobijeni konstrukt može koristiti za dirigovanu evoluciju oksidoreduktaza i razvoj visoko efikasnih metoda pretraživanja, jer je aktivnost himere proporcionalna aktivnosti nativnog enzima (GOx).

Razvojena je i optimizovana nova visoko efikasna metoda pretrage biblioteka gena celobioza-dehidrogenaze zasnovana na prikazivanju enzima na površini ćelija kvasca i fluorescentnog enzimskog eseja. Novi fluorescentni esej je razvijen i optimizovan koristeći resazurin kao supstrat, na ekscitaciji/emisiji 540/590nm za merenje aktivnosti CDH. Dobijen je linearni odgovor fluorescentnog signala na povećanje koncentracije CDH. Esej je optimizovan u MTP i pretražena je biblioteka gena trostrukog mutanta CDH prethodno ukloniranog u pCTCON2 i prikazanog na površini ćelija kvasca u vidu himere sa Aga2. Dobijena su tri mutanta CDH (H5, H9 i D2) sa povećanom aktivnošću na površini ćelija kvasca u odnosu na polazni trostruki mutant.

Dobijeni mutanti CDH (H5, H9 i D2) su u nehimernom obliku proizvedeni u *P. pastoris* gde su pokazali veću aktivnost za laktozu i celobiozu u odnosu na prethodno opisane varijante CDH. Visoka katalitička konstanta za laktozu od $43,5 \text{ s}^{-1}$, H5 mutant čini veoma obećavajućim biokatalizatorom za proizvodnju laktobionske kiseline, dok visoka konstanta specifičnosti za laktozu od $132 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, H9 mutant čini odličnim biokatalizatorom za upotrebu u biosenzorima. Razvijeni ekspresioni sistem sa novim mutantima CDH povećane aktivnosti i stabilnosti koji su opisani u ovom radu mogu biti od

značaja za proizvodnju laktobionske kiseline i razvoj biosenzora sa većom osetljivošću za laktozu i celobiozu.

Ključne reči: celobioza-dehidrogenaza, dirigovana evolucija, resazurin, fluorescentni esej, prikazivanje na površini ćelija kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj:

Protein engineering and development of high-throughput screening methods for *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose-dehydrogenase gene library toward higher enzyme activity

ABSTRACT

Celobioza dehydrogenase (CDH) is an extracellular enzyme produced by many white-rot fungi, including a well-studied *Phanerochaete chrysosporium*. The enzyme oxidizes a wide range of electron acceptors such as reducing ends of cellobiose, cello-oligosaccharides, and cellulose biodegradation products, to their corresponding 1,5-lactones, which are then in an aqueous solutions spontaneously hydrolysed to carboxylic acids. It is believed that together with cellulases and lignin peroxidases, CDH plays an important role in biodegradation of insoluble cellulose by the white-rot mushroom. CDH can transfer electrons to the soluble electron acceptors and also directly to the electrodes and therefore can be used in amperometric biosensors for measuring concentrations of cellobiose and for detection of lactose in food. In order to improve the usability of CDH for cellulose degradation, production of celobionic and lactobionic acid, as well as measurement of the concentration of disaccharides, it is necessary to increase CDH activity and eventually stability. To achieve this, we used methods of protein engineering and high throughput screening of biocatalysts. Protein engineering implies the change in a nucleotide sequence of the gene encoding the protein in order to change its activity and stability.

Cloning of cellobiose-dehydrogenase gene from *P. chrysosporium* into *Saccharomyces cerevisiae* InvSC1 has enabled the use of a directed evolution on our system. Mutants with increased activity were obtained by random mutagenesis and screening. Structural analyzes showed that mutations can affect the activity whether they are close to the active site or from distant interactions. The best mutant showed a 2.2-fold increase in k_{cat} for lactose and cellobiose as substrates. Mutants were also more thermostable than the wild

type CDH and were producing a higher amount of hydrogen peroxide, making them good candidates for biosensors and biocatalysts.

Wild type and one mutant of glucose oxidase (GOx) were used to test the expression system for oxidoreductase enzymes in the form of a chimeras with Aga2 protein on the surface of yeast *S. cerevisiae* EBY100 cells for directed enzyme evolution. Expression system was successfully tested, showing that mutants with higher activity in a native form have also higher activity when expressed as constructs with Aga2, indicating that the obtained chimeras can be used for directed evolution of oxidoreductases and developing high throughput screening methods, since chimera's activity was proportional to the activity of the native enzyme (GOx).

A new high throughput screening method for cellobiose dehydrogenase gene libraries, based on yeast surface display and fluorescent enzymatic assay was developed. New fluorescent assay was developed and optimized using resazurin as a substrate, at excitation/emission 540/590nm for measuring CDH activity. A linear correlation between fluorescent signal and CDH activity was obtained. The assay was optimized in microtiter plates (MTPs) and triple mutant CDH (previously cloned into pCTCON2) gene library, expressed on the surface of yeast cells as chimera with Aga2, was screened. Three mutants of CDH (H5, H9 and D2) with increased activity on the surface of yeast cells compared to the parent triple mutant were found.

Obtained mutants of CDH (H5, H9, and D2) were produced in a soluble native form in *P. pastoris* showing higher activity for lactose and cellobiose compared to the previously described CDH enzyme variants. A high catalytic constant for lactose of 43.5 s^{-1} for the H5 mutant makes it a very promising biocatalyst for the production of lactobionic acid, while a high specificity constant for lactose of $132 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, makes H9 an excellent biocatalyst for use in biosensors. The developed expression systems for new CDH mutants with increased activity and stability described in this work can be of importance for

the production of lactobionic acid and the development of biosensors with a higher sensitivity to lactose and cellobiose.

Key words: cellobiose dehydrogenase, directed evolution, resazurin, fluorescent assay, yeast surface display, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*.

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

UDK number:

LISTA SKRAĆENICA

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonska kiselina)

CAA - eng. *casamino acids*

CBB - eng. *Comasie Brilliant Blue*

CDH - Celobioza-dehidrogenaza

DCIP - Dichloro-indo-phenol

DEAE - dietilaminoetil

DMSO - dimetilsulfoksid

DTT - ditioneitol

epPCR - eng. *error-prone polymerase chain reaction*

FACS - protočni citometar, eng. *fluorescent activated cell sorter*

FAD - Flavin adenin dinukleotid

FCC - eng. *frozen competent cells*

GAL - galaktoza

GFP - eng. *green fluorescent protein*

Glc - glukoza

GOx - glukoza-oksidaza

GPI - glukozil fosfatidil inozitol

HPLC - tečna hromatografija visokih performansi

HRP - peroksidaza iz rena

IVC - *In vitro* kompartmentalizacija

LB - Luria - Bertani

MAP - eng. *mutagenesis assistant program*

MTP - mikrotitar ploče

PAGE - poliakrilamidna gel elektroforeza

PCR - eng. *polymerase chain reaction*

RACHIT - eng. *random chimeragenesis on transient templates*

SDS - natrijum-dodecil-sulfat

TEMED - 1,2-Bis(dimetilamino)etan

TM - trostruki mutant

TRIS - *tris*(hidroksimetil)aminometan

WT - divlji tip, eng. *wild type*

YNB - eng. *yeast nitrogen base*

YPD - eng. *yeast peptone dextrose*

YSD - eng. *yeast surface display*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO.....	4
2.1. Celuloza	4
2.1.1. Struktura celuloze.....	4
2.1.2. Primena celulozne biorazgradnje.....	5
2.2. Razgradnja drveta od strane gljiva	6
2.2.1. Gljive bele truleži.....	7
2.3. Celobioza-dehidrogenaza (CDH).....	9
2.3.1. Proizvodnja CDH u Basidiomycete	9
2.3.2. Fizičke i hemijske osobine CDH.....	10
2.3.3. Struktura celobioza-dehidrogenaze.....	11
2.3.4. Katalitički mehanizam	14
2.3.5. Biološka uloga celobioza-dehidrogenaze.....	19
2.3.6. Primena celobioza-dehidrogenaze.....	21
2.4. Dirigovana evolucija	22
2.4.1. Selekcija organizma domaćina.....	23
2.4.2. Ekspresija na površini ćelija kvasca	27
2.4.3. Stvaranje raznolikosti DNK	30
2.4.4. Visoko efikasne metode za pretraživanje.....	35
3. CILJEVI.....	40
4. MATERIJAL I METODE.....	41
4.1. Materijal	41
4.1.1. Izvor gena za celobioza-dehidrogenazu	41

4.1.2. Vektori i sojevi.....	41
4.2. Mikrobiološke metode	41
4.2.1. Podloge za rast bakterija.....	42
4.2.2. Podloge za rast kvasaca	43
4.2.3. Pripremanje kompetentnih ćelija	47
4.3. Molekularno-biološke metode.....	48
4.3.1. Kloniranje celobioza-dehidrogenaza gena u pYES2 vektor	49
4.3.2. Pravljenje biblioteke celobioza-dehidrogenaze u pYES2 vektoru	51
4.3.3. Kloniranje celobioza-dehidrogenaznog gena u pCTCON2 vektor.....	52
4.3.4. Pravljenje biblioteke celobioza-dehidrogenaze u pCTCON2 vektoru	54
4.3.5. Kloniranje celobioza-dehidrogenaznog gena u pPICZ α A vektor.....	54
4.3.6. Transformacija kompetentnih E.coli ćelija	56
4.3.7. Izolovanje plazmida	56
4.3.8. Analiza plazmida izolovanih iz bakterija	58
4.4. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze u vanćelijski prostor.....	58
4.4.1. Transformacija S. cerevisiae InvSc1	58
4.4.2. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze u S. cerevisiae InvSc1 u mikrotitar ploči	59
4.4.3. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze u S. cerevisiae InvSc1 u većoj zapremini.....	59
4.4.4. Prečišćavanje celobioza-dehidrogenaze iz ekstracelularne tečnosti	60

4.5. Ekspresija enzima na površini ćelija kvasca	61
4.5.1. Transformacija <i>S. cerevisiae</i> EBY100.....	61
4.5.2. Testiranje sistema ekspresije oksidoreduktaznih enzima sa glukoza-oksidadom	61
4.5.3. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze u <i>S. cerevisiae</i> EBY100 u mikrotitar ploči	62
4.6. Razvoj fluorescentnog eseja	63
4.6.1. Osnova fluorescentnog eseja.....	63
4.6.2. Optimizacija resazurinskog eseja sa CBDH ekspimiranog na površini ćelija kvasca	65
4.6.3. Optimizacija fluorescentnog resazurinskog eseja u MTP.....	65
4.6.4. Skeniranje biblioteke	66
4.6.5. Kinetička karakterizacija CBDH mutanata na površini ćelija kvasca	66
4.7. Ekspresija i prečišćavanje celobioza-dehidrogenaze.....	66
4.7.1. Transformacija <i>P. pastoris</i> KM71H	66
4.7.2. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze.....	67
4.7.3. Prečišćavanje celobioza-dehidrogenaze	67
4.8. Karakterizacija celobioza-dehidrogenaze	68
4.8.1. Određivanje aktivnosti celobioza-dehidrogenaze	68
4.8.2. Određivanje kinetičkih parametara celobioza-dehidrogenaze	69
4.8.3. Određivanje termalne stabilnosti celobioza-dehidrogenaze...	69
4.8.4. Određivanje šećerne specifičnosti celobioza-dehidrogenaze..	70
4.8.5. pH optimum.....	70
4.8.6. Temperaturni optimum	70

4.8.7. Proizvodnja peroksida	71
4.8.8. Strukturne analize	71
4.9. Analitičke metode.....	72
4.9.1. Određivanje kolonija kvasaca koje eksprimiraju celobioza-dehidrogenazu	72
4.9.2. Određivanje koncentracije proteina Bredfordovom metodom	72
4.9.3. Određivanje koncentracije proteina spektroskopskom metodom	72
4.9.4. Određivanje koncentracije proteina po Lowry-ju.....	73
4.9.5. Agarozna DNK elektroforeza	74
4.9.6. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	74
4.9.7. Nativna elektroforeza	76
4.9.8. Protokol za bojenje elektroforetskih gelova srebrom	77
4.9.9. Zimogram	78
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	79
5.1. Kloniranje i ekspresija celobioza-dehidrogenaze iz <i>Phanerochaete chrysosporium</i> u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Invsc1	79
5.1.1. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantne celobioza-dehidrogenaze.....	79
5.1.2. Pravljenje biblioteke mutanata, pretraživanje i prečišćavanje odabranih mutanata	80
5.1.3. Karakterizacija rekombinantnih proteina	86
5.2. Ekspresija na površini ćelija kvasca	94
5.2.1. Izolovanje i karakterizacija himere Aga2 proteina i glukoza-oksidadze eksprimirane na površini ćelija kvasca	94
5.2.2. Razvoj fluorescentnog eseja	101

5.2.3. Optimizacija resazurinskog fluorescentnog eseja sa CDH ekspimiranog na površini ćelija kvasca	105
5.3. Ekspresija i prečišćavanje odabranih mutanata CDH u kvascu <i>P. pastoris</i> i karakterizacija	114
5.3.1. Kloniranje odabranih mutanata CDH u <i>Pichia pastoris</i>	114
5.3.2. Ekspresija i prečišćavanje mutanata	114
5.3.3. Karakterizacija mutanata.....	120
6. ZAKLJUČAK.....	124
7. PRILOG	126
7.1. Prilog prajmeri	126
7.2. Prilog 2	127
7.3. Prilog 3: NetNGlyc 1.0 Server – rezultati predviđanja.....	129
7.4. Prilog 4: NetOGlyc 3.1 Server – rezultati predviđanja.....	130
8. LITERATURA	135

1. UVOD

Smatra se da je celuloza najzastupljenije organsko jedinjenje koje se uglavnom dobija iz biomase. Celuloza je prvobitno pronađena u lignoceluloznom materijalu šuma [1], i sa industrijske tačke gledišta je najčešći biopolimer koji se vekovima koristio kao sirovina iz drveća i drugih biljaka za različitu primenu. Svetska proizvodnja ovog biopolimera se procenjuje na između 10^{10} – 10^{12} tona svake godine [2] i samo oko 10^6 – 10^9 tona se prerađuje kao papir, tekstil, i materijali za hemijsku industriju [3]. On je jeftin, biorazgradiv i obnovljiv polimer koji je fibrozna, žilav i nerastvoran u vodi i koji omogućava održavanje strukture ćelijskog zida biljaka i algi.

Najproučavaniji mehanizam razgradnje ligno-celuloze od strane *Phanerochaete chrysosporium* je povezan sa sistemom koji sadrži peroksidaze i enzime koji proizvode peroksid, kao i druge enzime kao što su lakaze, celobioza-dehidrogenaze i trans-membranske metil-transferaze [4].

Mikrobi su korišćeni od strane drevnih civilizacija sa prvom objavljenom komercijalnom primenom kvasca kao proizvođača alkoholnih pića iz ječma od strane Vavilonjana i Sumera još pre 6000 godina [5]. Mikrobni enzimi su stekli globalno priznanje zbog svoje rasprostranjene uloge u različitim sektorima industrije, poljoprivrednoj, prehrambenoj, hemijskoj i farmaceutskoj [6].

Preko 500 industrijskih proizvoda se formiraju od strane enzima [7]. Mikrobi su služili i još uvek služe kao jedni od najvećih i najkorisnijih izvora mnogih enzima [8]. Ovi industrijski procesi koriste enzime ili cele mikrobne ćelije kao katalizatore. Intenzivna istraživanja i razvoj tehnologije bioprocasa i korišćenje rekombinante tehnologije je značajno poboljšalo prinos fermentacije, povećalo stabilnost i promenilo specifičnost ili selektivnost enzima [9]. Svetsko tržište za industrijske enzime bi trebalo da dostigne 5,6 milijardi američkih dolara u 2018. godini, i predviđa se da će dostići tržište od 6,39 milijardi dolara do 2023. godine [10].

UVOD

Celobioza-dehidrogenaza (CDH) je ekstracelularni enzim proizveden od strane mnogih gljiva bele truleži, uključujući i dobro proučen *P. chrysosporium*. Enzim oksiduje širok spektar elektron donora kao što su krajevi celobioze i celooligosaharida, produkata celulozne biorazgradnje, do njihovih odgovarajućih 1,5-laktona, koji se potom spontano hidrolizuju do karboksilnih kiselina u vodenim rastvorima [11]. Smatra se da zajedno sa celulazama i lignin peroksidazama CDH igra važnu ulogu u biološkoj razgradnji nerastvorne celuloze od strane gljiva bele truleži [12]. CDH takođe može da prenese elektrone osim na solubilne elektron akceptore i direktno na elektrodu i da se iskoristi za pravljenje amperometrijskih biosenzora za merenje koncentracije celobioze i naročito detekciju laktoze u hrani [13]. Da bi se poboljšala upotrebljivost CDH za razgradnju celuloze, proizvodnju celobionske i laktobionske kiseline kao i za merenje koncentracije disaharida neophodno je povećati njenu aktivnost i eventualno stabilnost. Da bi to postigli mi smo koristili metode proteinskog inženjeringa i visoko efikasne pretrage biokatalizatora.

Proteinski inženjering podrazumeva promenu nukleotidne sekvence gena koji kodira određeni protein u cilju povećanja njegove aktivnosti i stabilnosti. Ova metoda sadrži dva pristupa: dirigovanu evoluciju i racionalni dizajn [14]. Metoda dirigovane evolucije ne zahteva prethodno poznavanje proteinske strukture i podrazumeva iterativne korake stvaranja biblioteke gena metodom slučajnih mutacija i pretrage (skrininga) kreirane biblioteke gena za varijante enzima koji imaju povećanu aktivnost i stabilnost [15].

U ovom pristupu proteinskog inženjeringa najsporiji korak predstavlja sama metoda pretrage tj. skrininga biblioteke gena ka varijantama enzima sa poboljšanim karakteristikama. Stoga je razvoj visoko efikasnih metoda pretrage ("*High-throughput screening systems*") biblioteke gena od krucijalnog značaja za uspeh metoda proteinskog inženjeringa u razvoju varijanata enzima sa poboljšanim karakteristikama [16]. Ove metode moraju biti zasnovane na osetljivim metodama detekcije kao što je fluorescencija i moraju se izvoditi u

UVOD

malim reakcionim zapreminama (mikrotitar pločama, emulzijama) da bi se obezbedila mogućnost merenja velikog broja uzoraka u malom vremenu.

I pored velikih mogućnosti, primena ovakvih metoda pretraživanja za razvoj biotehnoški važnih varijanata enzima je ograničena zbog brojnih problema kao što su nedostatak odgovarajućih fluorescentnih enzimskih eseja i odgovarajućih ekspresionih sistema na površini ćelija koji bi održali fizičku vezu genotipa i fenotipa. Zato je razvoj novih fluorescentnih enzimskih eseja i njihova adaptacija za pretragu biblioteke gena u mikrotitar pločama ili emulzijama od velike važnosti za uspešnost eksperimenata u proteinskom inženjeringu [17]. Zbog svega toga su i dalje veoma aktuelna istraživanja u ovoj oblasti koja imaju za cilj poboljšanje selektivnosti i osetljivosti metode pretrage biblioteke gena ka najaktivnijim varijantama enzima u populaciji kako bi se povećala uspešnost pronalaženja mutanta enzima sa povećanom aktivnošću.

2. TEORIJSKI DEO

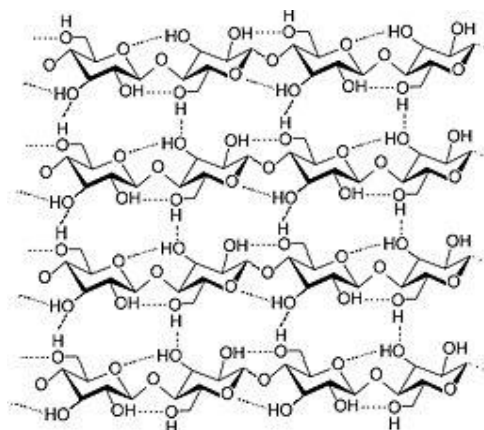
2.1. Celuloza

Celuloza se smatra najčešćim organiskim polimerom, predstavlja oko $1,5 \times 10^{12}$ tona ukupne godišnje proizvodnje biomase i čini skoro neiscrpan izvor sirovog materijala za povećanu potražnju ekoloških i biokompatibilnih proizvoda [18]. Celuloza je prvobitno pronađena u lignoceluloznom materijalu šuma, gde se drvo smatra kao najvažniji izvor, dok se može naći i u ostacima biljaka, vodenih biljaka i trave [1]. On je jeftin, biorazgradiv i obnovljiv polimer koji je fibrozna, žilav i nerastvoran u vodi i koji omogućava održavanje strukture ćelijskog zida biljaka i algi [18].

2.1.1. Struktura celuloze

Celuloza je linearni homopolimer sa molekulskom formulom $(C_6H_{10}O_5)_n$ i izgrađen je od D - glukopiranoznih jedinica. Glukozne jedinice se kombinuju zajedno preko β - (1-4) - glikozidne veze i formiraju dimere poznate kao celobioza koji je osnovna jedinica celuloze [18].

Zanimljivo je primetiti da hidrosilne grupe celuloznog lanca na oba kraja pokazuju različito ponašanje, C - 1 kraj celuloze pokazuje redukujuća svojstva, dok C - 4 hidrosilna grupa istog lanca je neredukujuća [18]. Celuloza sadrži veliki broj polarnih kiseoničnih i vodoničnih atoma koji su uključeni u izgradnju intermolekularnih i intramolekularnih vodoničnih veza između istog i susednog celuloznog lanca i omogućavaju čvrstoću celuloznih lanaca (Slika 1.).



Slika 1. Trodimenzionalna struktura celuloze. Mreža vodoničnih veza celuloze (Slika preuzeta sa sajta <https://nptel.ac.in/courses/104103018/module1/lec3/3.html>).

Jednomolekulski lanci celuloze se međusobno povezuju preko vodoničnih veza i formiraju celulozne mikrofibrile i poseduju kristalne, parakristalne i amorfne regione. Ovi mikrofibrili prisutni u sekundarnom ćelijskom zidu svih biljaka obično su ugrađeni u matriks izgrađen od hemiceluloze i lignina [19, 20].

2.1.2. Primena celulozne biorazgradnje

Interes za celuloznu biorazgradnju je pokrenut kao posledica naftne krize 1970. godina. Enzimi celulaze mogu da prevedu celulozne biomase kao što je poljoprivredni i šumski otpad do glukoze. Fermentacija glukoze do goriva baziranih na alkoholu mogu da omoguće delimičnu zamenu za fosilna goriva. [21].

Mnoge primene celulaza uključuju i ograničenu hidrolizu celuloze. Dodatak celulaza životinjskoj hrani povećava razgradnju i primenu celuloze. Delimična hidroliza ćelijskog zida biljaka oslobađa skrob i proteine maskirane

od strane ćelijskog zida u žitaricama i povećava primenu metabolišuće energije i proteina [22, 23].

Celulaze su uspešno korišćene u obradi tekstila. Mogu se dodati prašku za veš i tako uklanjaju mikrofibrile koji se delimično odvoje od glavnog pamučnog vlakna posle nekoliko rundi pranja. Tako se vraća mekoća i bistrina boje pamučnog materijala i pomaže uklanjanje prljavštine [24].

Papirna industrija je pod pritiskom potrošača i okoline da koristi otpadni papir u svojim proizvodima. Međutim pre nego što se može reciklirati otpadni papir, mora se ukloniti mastilo, za šta se mogu koristiti celulaze [25].

2.2. Razgradnja drveta od strane gljiva

Gljive koje mogu da razgrade drvo su dugo vremena bile ključni problem za održivost struktura od drveta, dok su sa druge strane služile kao delotvoran činilac za ekologiju time što su razgrađivali otpadni materijal u okolini. Tipično se izraz "truljenje" odnosi na razgradnju drveta od strane gljiva koje vodi do gubitka snage drveta.

Drvo je izuzetno težak supstrat za razgradnju u pogledu njegovih fizičkih i hemijskih osobina. Jedan od glavnih razloga je taj da drvo sadrži veoma nizak nivo azota koji je potreban da se proizvedu enzimi koji razgrađuju glavne strukturne polimere drveta - celulozu (oko 40-50% suve težine drveta), hemicelulozu (25-40%) i lignin (20-35%). Ligninski deo takođe predstavlja prepreku za razgradnju drveta jer je lignin kompleksni aromatični polimer koji pokriva ćelijski zid, time ograničava pristup enzima lakše razgrađivoj celulozi i hemicelulozi. Drvo dodatno sadrži i potencijalna jedinjenja koja su toksična za gljive a koja su deponovana u srži drveta [26].

I pored ovih prepreka, tkivo drveta se razgrađuje od strane gljiva koje se mogu podeliti na tri kategorije u zavisnosti od njihovog tipa napada na ćelijski zid drveta: gljive meke truleži, gljive smeđe truleži i gljive bele truleži [27].

U gljive meke truleži spadaju vrste *Ascomycete* i *Imperfecti*. Gljive meke truleži obično napadaju spoljašnju površinu drveta u relativno vlažnoj okolini. Kao i gljive smeđe truleži oni razgrađuju celulozu i hemicelulozu ali ne mogu da razgrade lignin [28].

Gljive smeđe truleži mogu brzo da razgrade celulozu i hemicelulozu ali zadržavaju modifikovane ligninske ostatke [29]. Do sada su većinom gljive smeđe truleži izolovane iz četinara (meko drvo) i predstavljaju oko 7 % od svih izolovanih *Basidiomycete* koje su izolovane iz trulog drveća [30].

Smeđa trulež može izazvati ubrzan gubitak u snazi sastava konstrukcije drveta i kad se ugljeni hidrati uklone samo ostaje lignin i tad raspalo drvo postaje mrvljivo, suho i krute konzistencije i okarakterisano sa crveno-smeđom bojom [31].

2.2.1. Gljive bele truleži

Gljive koje uzrokuju razgradnju bele truleži izlučuju enzime koji razgrađuju lignin, hemicelulozu i celulozu. Posle razgradnje i uklanjanja lignina drvo postaje blede. Dva glavna obrasca raspadanja bele truleži su uočena mikroskopskim i ultra strukturnim istraživanjima [32]. Simultana bela trulež (korozijska trulež) je prikazana kombinovanom razgradnjom ugljenih hidrata i lignina u ranoj i kasnoj fazi truljenja. Primeri gljiva koje izazivaju simultanu belu trulež uključuju *Fomes fomentarius*, *Coriolus versicolor* i *Trametes versicolor* [33, 34]. Nasuprot njima selektivna (po redu) bela trulež je pokazana ranom razgradnjom lignina i hemiceluloze praćena sa razgradnjom celuloze. *Phlebia radiata* i *Ceriporiopsis subvermispora* su verovatno najbolje izučene gljive koje

izazivaju selektivnu belu trulež [35, 36]. Izbor simultane ili selektivne vrste raspada bele truleži može zavisi od drveta koji se razgrađuje, faze razgradnje drveta i posebnog soja gljiva korišćenih u istraživanju. Na primer neki sojevi *Phanerochaete chrysosporium* (npr. BKM-F-1767) izazivaju selektivno truljenje uzorka listopadnog drveta, dok mnogi drugi sojevi izazivaju simultanu razgradnju drveta [37].

2.2.1.1. *Phanerochaete chrysosporium*

Gljive bele truleži, naročito *Phanerochaete chrysosporium*, su karakteristične po svojoj izuzetnoj sposobnosti da razgrade zaštitni polimer drveta - lignin, do ugljendioksida. Ove gljive izlučuju peroksidaze koje koriste redoks medijatore da razgrade lignin preko mehanizma slobodnih radikala. Zbog nespecifične prirode razgradnje lignina koje koriste gljive bele truleži, one takođe mogu da razgrade nekoliko trajnih zagađivača životne sredine [12].

Najproučavaniji mehanizam razgradnje ove gljive je povezan sa sistemom razgradnje lignina. Ovaj sistem sadrži peroksidaze, manganaze, veratril alkohol i enzime koji proizvode peroksid. Ova gljiva može da razgradi hemikalije i drugim putem. Drugi enzimi koji mogu da pomognu u remedijaciji su lakaze, celobioza-dehidrogenaze i trans-membranske metil-transferaze [4].

Niz enzima uključenih u razgradnju tkiva biljaka koje sadrže lignocelulozu su većinom hidrolaze i oksidoreduktaze. Sinhronizovano delovanje ovih enzima značajno utiče na reciklažu biljne biomase u prirodi. Endocelulaza [1,4-β-D-glukan-4-glukanohidrolaza, E.C. 3. 2. 1. 4] hidrolizuje celulozu u male rastvorne šećere (mono-, di- i trisaharide). Egzocelobiohidrolaza [1,4-β-D-glukan-4-celobiohidrolaza, E.C. 3. 2. 1. 91] oslobađa celobioznu jedinicu samo sa kraja lanca netaknute kristalne celuloze. Po pravilu i endo- i egzocelulaze se pojavljuju u celulolitičkim organizmima kao mešavina izozima koje pokazuju sinergizam u njihovoj aktivnosti [38, 39]. Tako se preko

delovanja nekoliko enzima celobioza proizvodi kao važan metabolički intermedijer. Celobioza se zauzvrat hidrolizuje od strane β -glukozidaza [β -D-glukozid-O-glukohidrolaza, E.C. 3. 2. 1. 21] stvarajući dva molekula glukoze. Kao dodatak, celobioza-dehidrogenaza [celobioza:(akceptor) 1-oksidoireduktaza, E.C. 1. 1. 99. 18] oksiduje u gljivama celobiozu do celobionske kiseline dok istovremeno još uvek neidentifikovan elektron akceptor je redukovan *in vivo* [40].

2.3. Celobioza-dehidrogenaza (CDH)

2.3.1. Proizvodnja CDH u Basidiomycete

Celobioza-dehidrogenaza je prvi put izolovana iz bazidiomiceta *Phanerochaete chrysosporium* i *Trametes versicolor* [41, 42] i identifikovana kao oksidoireduktaza, redukujući hinone u prisustvu celobioze ali ne i glukoze. Tipično se CDH izlučuje u vanćelijski prostor tokom eksponencijane faze rasta kad je celuloza glavni izvor ugljenika za rast. Većina istraženih proizvođača CDH su gljive bele truleži kod kojih je uobičajeno da se CDH izlučuje. Najbolje istražen primer je proizvodnja CDH od strane *P. chrysosporium* gde pod celulolitičkim uslovima ova oksidoireduktaza predstavlja oko 0.5 % vanćelijskih proteina [43].

Dva tipa flavoproteina, oba sposobna da oksiduju celobiozu su bili zasebno proučavani nekoliko godina iz brojnih organizama koji proizvode CDH. Oni su klasifikovani kao 1) flavohemoprotein celobioza-dehidrogenaza (CDH, E.C. 1. 1. 99. 18; prethodno nazvana celobioza-oksidaza) i 2) flavoprotein celobioza:hinon oksidoireduktaza (CBQ, odnosno odvojeni dehidrogenazni domen E.C. 1. 1. 5. 1., ovaj E.C. broj je izbrisan 2002.). Tek je 1993. predloženo da se ime celobioza-oksidaza zameni za prikladniji naziv celobioza-dehidrogenaza zbog toga što katalitički daje prednost drugim elektron primaocima umesto

molekulskom kiseoniku [44]. Takođe je pokazano da je celobioza:hinon oksidoreduktaza iz *P. chryso sporium* proizvod raspada celobioza-dehidrogenaze i da oba enzima pokazuju slične obrasce posle proteolitičke razgradnje i unakrsne reaktivnosti sa specifičnim antitelima [45]. Istraživači su pokazali da proteaze iz celulolitičkih kultura *P. chryso sporium* mogu da oslobode dehidrogenazni domen iz netaknute celobioza-dehidrogenaze. Oni su predložili da dve kisele proteaze mogu selektivno da iseku CDH na odvojene domene ali samo kad je CDH vezana za celulozu [46]. Konačno je 2002. pokazano koristeći tehnike blotovanja [43] da se samo jedan prepis *cdh* gena pojavljuje u *P. chryso sporium* sa karakterističnom veličinom celog gena.

2.3.2. Fizičke i hemijske osobine CDH

Celobioza-dehidrogenaza je kompleksan protein koji sadrži dve prostetične grupe: hem grupu i flavin adenin dinukleotid – FAD. U svim poznatim celobioza-dehidrogenazama hem prostetična grupa je protoporfirin (protohem IX; hem *b*) sa jednim hemom po CDH molekulu [47]. Slično tome i spektrofotometrijski je pokazano da se FAD pojavljuje kao jedan dinukleotid po CDH molekulu. CDH izolovan iz *P. chryso sporium* može takođe da sadrži 6-hidroksi-FAD [48]. Istraživači su predložili da reaktivne kiseonične vrste, kao što su hidroksil radikali formirani tokom reakcije sa molekulskim kiseonikom mogu biti odgovorni za derivatizaciju flavina [49].

CDH je monomerni glikoprotein sa molekularnom masom od oko 90 kDa i kiselim pI [50]. Jedina poznata kristalna struktura za CDH je ona za pojedinačne domene *P. chryso sporium* CDH (Slika 2.) [51]. Ove zasebne strukture ne omogućavaju bilo koje pouzdane informacije o biološki bitnim stanjima oligomerizacije za CDH enzim cele dužine iz *P. chryso sporium*.

Kao i drugi eukariotski proteini koji se izlučuju, celobioza-dehidrogenaze su podvrgnute posttranslacionim modifikacijama koje značajno

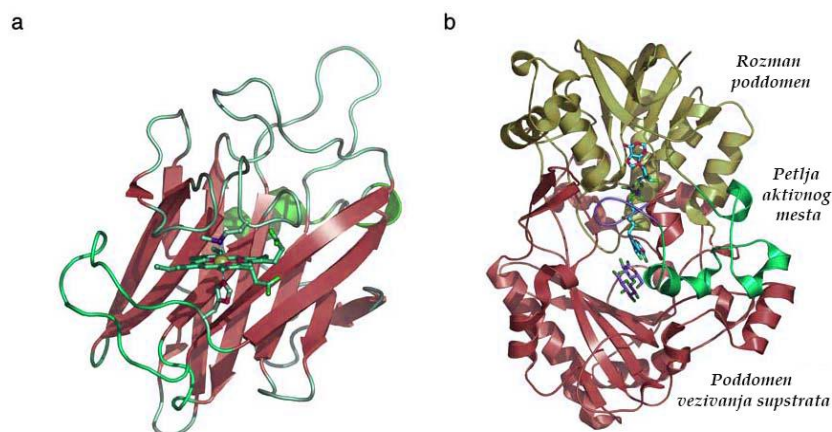
utiču na osobine zrelog proteina, uključujući stvaranje disulfidnih mostova, O- i N-povezanu glikozilaciju i obradu signalne sekvence. Glikozilacija je uobičajena posttranslaciona modifikacija za ekstracelularne proteine gljiva. CDH je glikoprotein sa stepenom glikozilacije od oko 12 % [51]. Pošto gljive dodaju O-vezane oligosaharide na serin i treonin hidroksilne grupe izlučenih proteina, CDH bi trebalo da budu O-glikozilovane pretežno u linker regionu koji ima veći sadržaj ovih aminokiselina. O-vezana glikozilacija uglavnom uključuje manozne ostatke [51].

CDH iz *P. chrysosporium* pokazuje vreme polu života od 25 minuta na 60°C i brzo se inaktivira na 70°C [40].

2.3.3. Struktura celobioza-dehidrogenaze

2.3.3.1. Struktura citohrom domena CDH

Fleksibilnost CDH molekula je efektivno ometala analizu kristalne strukture celokupnog molekula hemoflavo-enzima. Zbog toga su kristalne strukture flavoproteinskog i citohrom domena CDH objašnjene odvojeno [52, 53] (Slika 2.). Citohromni domen CDH se sastoji od oko 190 amino kiselina i sklapa se u elipsoidni anti-paralelni β sendvič [52]. Sklop se odlikuje petostrukom i šestostrukom β pločom, koji se zovu unutrašnja i spoljašnja ploča. Pored β ploče postoji i kratka struktura α -heliksa na C kraju. Hem grupa je vezana u džepu na jednoj strani β pločice blizu površine molekula. Konkava unutrašnje β ploče formira okvir džepa i tri petlje što štrče iz ove ploče zaglave protoporfirinski IX prsten, dva odozgo (ostatci 62-68 i 148-161) i jedan odozdo (ostatci 85-95). Pakovanje džepa je gusto sa većinom hidrofobnih ostataka i ostavlja malo ili nimalo prostora da uđu dodatni molekuli.



Slika 2. Prikaz strukture dva odvojena domena CDH iz *P. chrysosporium*. **a)** Molekularno uvijanje CDH citohrom *b* domena (PDB broj za pristup 1D7C). Hem grupa i ostatci koji vezuju hem His163 i Met65 su prikazani kao štapićasti objekti. **b)** Slika uvijenog CDH flavodehidrogenaznog domena. Sastoji se iz dva poddomena: Rozmanovog poddomena (smeđe) sa uvijenim FAD/NAD(P) vezujućim domenom, supstrat vezujućim domenom (crveno) sličan uvijanju $\alpha+\beta$ sendviča FAD vezanih reduktaza (PDB broj za pristup 1NAA). Sekundarna struktura je prikazana: β ploče kao strele, α heliksi kao spirale [40].

Gvožđe u hemu je heksa koordinisano sa Met65 i His163 kao osovinskim ligandima [54]. CDH predstavlja prvi enzim koji sadrži hem *b* sa Met/His hem ligacijom.

2.3.3.2. Struktura flavin dehidrogenaznog domena

Flavinski domen se sastoji od 540 ostataka aminokiselina koji se uvijaju slično glukoza-oksidazi iz *Asperigillus niger* [40]. Polipeptidni lanac se savija u dva strukturno različita pod-domena, jedan koji vezuje FAD kofaktor nekovalentno (*F* pod-domen) i jedan koji vezuje supstrat celobiozu (*S* pod-domen). U flavocitohromu, N-terminalni citohromski domen se završava na 190

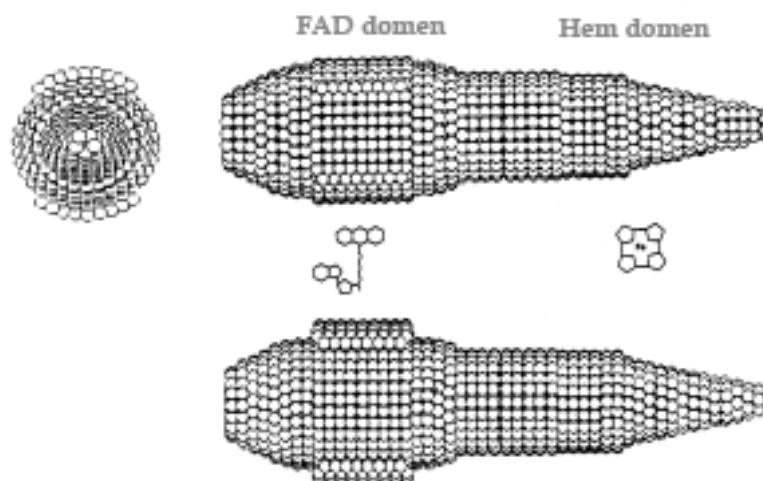
TEORIJSKI DEO

ostatku i praćen je međudomenskim povezujućim domenom (191 ostatak do 215).

F pod-domen CDH se sastoji iz ostataka 216 do 249, 404 do 511 i 693 do 755. Struktura je tipa α/β i sadrži šestostruke, većinom paralelne, β -naborane ploče umetnute između β zavijutka (trostruka antiparalelna β ploča) i tri α heliksa. Vezivanje adenzinskog dela kofaktora uključuje karakteristični $\beta\alpha\beta$ mononukleotidni-vezujući motiv, ili Rozmanov sklop, koji se često susreće u NAD i FAD zavisnim enzimima [55]. *F* pod-domen takođe sadrži tri dodatna α heliksa koji su zajedno spakovani da formiraju podstrukturu na jednoj strani ovog pod-domena. *F* pod-domen formira krov preko flavin vezujućeg džepa.

S pod-domen sadrži ostatke od 250 do 403 i 512 do 692 i glavna strukturalna odlika je centralna uvijena, sedmostruka β ploča sa tri heliksa sa jedne strane ploče i aktivnog mesta sa druge. Ova β ploča pruža "pod" aktivnom mestu. Četvorostrana, pomalo nepravilna, antiparalelna β ploča formira jednu stranu flavin vezujućeg džepa blizu riboflavinskom delu FAD kofaktora i takođe služi kao veza između *F* i *S* pod-domena. Na početku *S* pod-domena ostatci 250 do 299 formiraju petlju i poklopac strukturu koja obeleži ulaz u aktivno mesto (petlja, ostatci 250-288) i spoljašnji zid FAD vezujućeg džepa (poklopac, ostatci 289-299) [40].

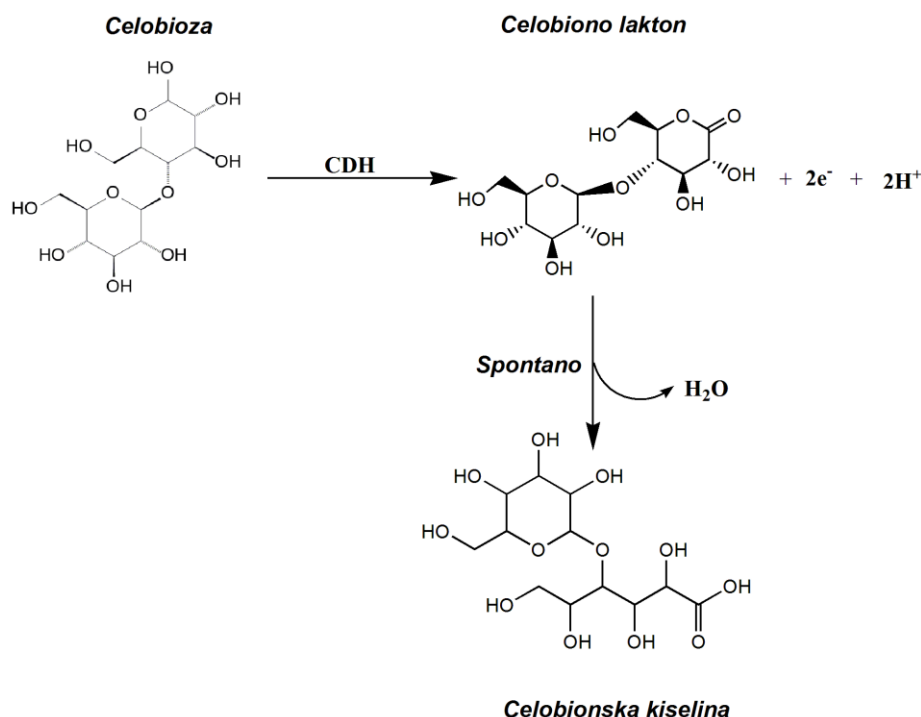
Oblik CDH kao i hem i FAD fragmenata je istražena preko rasipanja X-zraka malog ugla [56]. Snimanje je otkrilo strukturu oblika cigarete, slična strukturi celulaza sa jasno приметnim domenima koji vezuju hem i FAD (Slika 3.).



Slika 3. Oblik CDH je određen preko rasipanja X-zraka malog ugla. Oblik CDH iz *P. chrysosporium*-a je određen SAXS na netaknutom enzimu i hem i FAD fragmentu [56]. Dve prostetičke grupe su prikazane u odgovarajućoj skali [49].

2.3.4. Katalitički mehanizam

Celobioza-dehidrogenaza pokazuje osobine tipičnih dehidrogenaza sa oksidativnom i reduktivnom polureakcijom koje se mogu proučavati zasebno. Oksidativna polureakcija predstavlja oksidaciju na C1 poziciji saharida, hemiacetal na ovoj poziciji se prevodi do laktone koji se spontano hidrolizuje do karboksilne kiseline (celobionske kiseline) (Slika 4.).



Slika 4. Oksidativna polureakcija CDH. CDH izvodi dvo elektronsku oksidaciju C1 atoma celobioze do laktona. Elektroni su pokupljeni od strane FAD-a. Lakton se spontano hidrolizuje i prsten se otvara do karboksilne kiseline (Slika nacrtana u ChemDraw).

Dva elektrona koja pokupi enzim su posle prebačeni na dvo-elektronski akceptor (primalac) ili na dva jedno-elektronska primaoca [57, 58].

CDH oksiduje celbiozu i više celodekstrine, kao i laktozu, manobiozu i galaktozilmanozu, iako za njih pokazuje visoke K_M vrednosti [44, 57]. Ovi "pravi" supstrati su svi di ili oligosaharidi sa β-1,4 vezama i glukoznom ili manoznom ostatku na redukujućem kraju.

Istraživači su predložili dva vezujuća mesta u aktivnom mestu CDH: jedno koje vezuje redukujući glukozil deo celobioze gde se oksidacija dešava (K mesto za katalitički) i drugo mesto koje se odnosi na vezujuće mesto (V mesto) glukozidne jedinice na ne-redukujućem kraju [59]. Kristalna struktura CDH flavoproteinskog domena sa vezanim analogom supstrata, celobionolaktama je

objasnila neophodne strukturne determinante za vezivanje supstrata u dva pod-položaja, *V* i *K* aktivnog mesta CDH [60]. Ove determinante uključuju tačne pozicije anomernog C1 atoma pod-mesta *V* i *K*, takođe C2 i C3 hidroksilnih grupa u glukozilnoj jedinici pod-mesta *K*. Ključni aminokiselinski ostatci za vodonično vezivanje u pod-mestu *K* su His689, Asn732 i Asn688 koji su potpuno očuvani u svim varijantama celobioza-dehidrogenaze. Dodatno dva strateški postavljena molekula vode koordinisana od strane Tyr609 pružaju dodatne interakcije vodoničnih veza sa O3 i O6 u ovom pod-mestu. Značaj His689 i Asn732 za katalizu su istraživači kinetički dokazali za CDH mutante iz *P. chrysosporium* [61].

U pod-mestu *V*, orijentacije C2, C3 i C6 hidroksilnih grupa su bitne. Ostatci koji učestvuju u vodoničnom vezivanju su Glu278, Arg586 i Asn688 od kojih su Arg586 i Asn688 potpuno očuvani u CDH [59].

2.3.4.1. Mehanizam reduktivne polu-reakcije

Kinetički podaci su pokazali da su β -1,4 vezani disaharidi celobioza, laktoza i manobioza dobri ili prihvatljivi supstrati za CDH, dok je α -1,4 vezan disaharid maltoza kao i monosaharidi manoza, galaktoza i aloza slabi ili nikakvi supstrati. Više K_M vrednosti za manobiozu i galaktomanozid upoređen sa celobiozom i laktozom odgovara strukturnim podacima, pokazujući značaj C2 hidroksil grupe u pod-mestu *K* i *V* za vezivanje supstrata [59]. Činjenica da su monosaharidi slabi ili nikakvi supstrati za CDH je povezana sa prisustvom različitih režima ne-produktivnog vezivanja u dva vezujuća mesta.

U slučaju CDH iz *P. chrysosporium* tiocelobioza koja ima tioglukozidnu umesto glukozidne veze je oksidovana sa k_{cat} vrednošću koja je 1.5 puta veća u poređenju sa celobiozom. Ovo je postignuto uprkos desetostrukom povećanju u K_M vrednosti [59]. Disaharid β -ksilobioza nema obe egzociklične C6-O6 grupe. Prema kinetičkim podacima ovaj šećer nije supstrat za CDH iz *P.*

chryso sporium čime se indirektno sugeriše da je C6 hidroksil grupa zaista značajna za vezivanje supstrata ili promene stanja vezivanja [59]. Prema visoko definisanim strukturnim detaljima vezivanja disaharida u celobionolaktamski kompleks, ksilobioza može biti supstrat, ne preterano dobar, za CDH pošto se čini da su C6 hidroksilne grupe u pod-mestu *V* i *K* čine da su uključeni ali ne i ključni u vezivanju, gde se C6 hidroksil u mestu *K* interaguje sa molekulom vode, a u podmestu *V* C6 hidroksil reaguje sa Asn688 [60]. Šećeri koji se pokazuju kao slabi supstrati krše jedan ili nekoliko gore pomenutih strukturnih kriterijuma od čega proističe nizak supstratni afinitet i/ili specifičnost ili im fali stabilizacija prelaznog stanja.

2.3.4.2. Među domenski prenos elektrona

Prisustvo dva redoks centra u CDH je podstaklo dosta razmišljanja o ulozi hem domena. Na svakom datom pH, FAD je više reduktivan od hema. Prema tome tokom reduktivne polu reakcije postoji protok elektrona iz katalitičkog centra ka hem domenu. Takav protok je uočen kod CDH samo na vrednostima ispod pH 6 [62].

Dva različita modela su predložena za katalitičku ulogu hem domena [49, 58]. Model elektron-lanca tvrdi da su elektroni, jedan po jedan prebačeni sa FAD na hem *b* pre nego što se desi redukcija spoljašnjeg jedno-elektronskog akceptora. Elektron-ponirući model predlaže da je uloga hem *b* da skladišti elektrone da bi osigurao specifične uslove reakcije na FAD-u za redukciju elektron akceptora. Oba modela mogu biti važni za različite elektron akceptore. Prioritetan model za prenos elektrona sa CDH na citohrom *c* je model elektron-lanca. Drugi jedno ili dvo-elektronski akceptori mogu biti redukovani direktno na FAD centru kome više odgovara elektron-ponirući model. Potrebno je još istraživanja da bi se došlo do konačnog rešenja.

Redukcija citohroma *c* je sprovedena od strane hem domena praćena elektron prenosom sa flavina na hem i da je u ovom postupku, relativno spori međumolekularni prenos elektrona ograničavajuće brzine naročito na višim pH vrednostima od pH 5. Međumolekularni prenos elektrona je vrlo zavisano od pH. Tako da na optimalnom pH (što je pH 3,0 - 4,0 za CDH) nivo međumolekularnog prenosa elektrona dostiže maksimum što sugerise da je prenos elektrona sa flavinskog domena na jedno-elektronski akceptor preko hem domena biološki bitan proces [63-65].

2.3.4.3. Mehanizam oksidativne polureakcije

Oksidativna polureakcija nastavlja sa prenosom elektrona na bilo dvoelektronski akceptor ili na dva ekvivalenta jednoelektronskog akceptora [66]. Prirodni akceptori elektrona za CDH ili flavinski deo nisu još istraženi, tako da ostavljaju dosta prostora za nagađanja. Prijavljen je širok opseg elektron akceptora koje redukuju ili celi enzim ili flavinski fragment. Redukovan CDH je reoksidovan od strane elektron akceptora kao što su 2,6-dihloro-indofenol (DCIP), 1,2 ili 1,4-benzohinon i njihovi derivati, ABTS kation radikal (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), kompleksirajući metalni joni kao što su Fe(III), Cu(II) i Mn(III) ili kiseonik [41]. Takođe je prijavljena redukcija trijodida [67]. Redukcija ovih elektron akceptora se obično dešava na flavinu [68] pošto CDH može da efikasno prenese elektrone na hem na pH vrednostima ispod pH 5,5 [69] očigledno je da i jednoelektronski akceptori mogu redukovati hem. Poznato je da se dvo-elektronski akceptori redukuju direktno na flavinskom domenu, ali dolazi do mimoilaženja mišljenja kod redukcije jednoelektronskih akceptora. Citohrom *c* može da jedino uzajamno deluje sa hem domenom CDH i tako prenese elektrone sa hem *b* na hem *c*. Ova specijalna osobina može da se koristi u enzimskom eseju da bi se prepoznao flavinski fragment od celog enzima.

Celi enzim i flavinski domen se slično redukuju od strane celuloze, celoligosaharida i laktoze i oksidovani od strane hinona i organskih radikalskih vrsta, ali se razlikuju po njihovoj sposobnosti da redukuju komplekse metalnih jona. Flavinski domen odvojen od hema redukuje sa manjom efikasnošću Fe(III)-fenantrolin, Cu(II)-2,9-batokuproinsulfonat ili Mn(III) malonat komplekse na pH 4,5 nego netaknuti flavocitohrom [41].

2.3.5. *Biološka uloga celobioza-dehidrogenaze*

Fiziološke funkcije CDH nisu još uvek razjašnjene. Smatra se da može imati nekoliko funkcija, od kojih su do sada samo data nagađanja. Postoje dve kopije gena koje kodiraju za CDH u genomu *P. chrysosporium* i oni mogu imati drugačije promotore i prepisani su kao odgovor na različite okolne ili nutritivne faktore. Proteoliza CDH menja enzimsku aktivnost. Proteoliza je kontrolisana, dajući kao rezultat eliminaciju nekih aktivnosti bez uticaja na druge [11].

CDH povećava, iako relativno slabo, aktivnost sirove smese celulaza [70]. Ako se pulpna vlakna tretiraju sa CDH, čvorovi (npr. kratki segmenti koji predstavljaju 'slabu tačku' vlakna) postaju nabubreni što ukazuje na neku vrstu napada na ćelije drveta [71]. Pokazano je da CDH razgrađuje i celulozu, ksilan i lignin u prisustvu vodonik peroksida i heliranih jona Fe.

CDH oksiduje celobiozu do celobionolaktone da bi smanjila celulaznu inhibiciju celobiozom [72]. Celulaze iz *P. chrysosporium* su inhibirane celobiozom. Međutim celobionolakton, produkt oksidacije celobioze od strane CDH-a ne inhibira celulazu. Zapažanja da niska koncentracija CDH povećava efikasnost celulozne degradacije kad se doda kulturama može takođe da podupre hipotezu da je efekat CDH da smanji inhibiciju celulaze proizvodom [70]. Visoka koncentracija CDH ima inhibični efekat na celuloznu degradaciju, verovatno zbog toga što CDH katalizovani hidroksi radikali inaktiviraju celulaze ili se CDH takmiče sa celulazama za vezujuće mesto na celulozi.

TEORIJSKI DEO

CDH podupire aktivnost mangan peroksidaze (MnP) [73]. MnP je fungalni enzim koji razgrađuje lignin oksidujući kompleks Mn(II) do reaktivne vrste Mn(III) koja radi jedno-elektronsku oksidaciju lignina. CDH može podupreti MnP na tri različita načina: 1. Rastvara redukcijom istaloženi Mn(IV)O₂ (često kod trulog drveća), 2. Proizvodi celobionsku kiselinu (celobionolakton proizveden od strane CDH se spontano hidrolizuje) što bi trebalo da kompleksira reaktivne vrste Mn(III), 3. Redukuje hinone.

CDH povećava efekat celulaza na razgradnju celuloze [70]. Hidroksi radikal proizveden od strane enzima može raskinuti celulozu time što joj remeti mikrokristalnu rešetku. Celuloza se lako enzimski hidrolizuje i produkcija hidroksil radikala u blizini CDH može voditi ka značajnom oštećenju enzima. Efekat CDH na depolimerizaciju celuloze je verovatno zbog smanjenja inhibicije celulaza njenim proizvodom.

CDH razgrađuje i modifikuje celulozu, hemicelulozu i lignin generišući hidroksil radikale u Fentonovoj reakciji [74]. Enzim može, oksidujući celobiozu, redukovati Fe(III) do Fe(II), ili Cu(II) do Cu(I) i reakcija između radikalskih vrsta i vodonik peroksida generiše hidroksil radikale. Ovi visoko reaktivni radikali mogu modifikovati i depolimerizovati celulozu, hemicelulozu i lignin.

CDH sprečava repolimerizaciju celuloze. Redukujući krajevi celuloze mogu da se ponovo polimerizuju sa susednim neredukujućim krajevima celuloznog lanca [72]. CDH može da katalizuje redukciju elektronskih akceptora koristeći mikrokristalnu celulozu kao elektron donor i tako CDH verovatno može da oksiduje redukujuće krajeve kristalne celuloze i time spreči repolimerizaciju [74].

2.3.6. Primena celobioza-dehidrogenaze

Nekoliko zanimljivih primena je predloženo uzimajući u obzir jedinstvene katalitičke osobine celobioza-dehidrogenaze. Predlozi se odnose na dva glavna područja: analitička upotreba u biosenzorima i enzimskim esejima za otkrivanje i kvantifikaciju supstrata i analognih molekula i biotehnološka primena u obradi pulpe i papira, bioremedijaciji/biodegradaciji i biokatalizi.

Enzim se koristi u nekoliko analitičkih eseja i senzora zbog svoje uske specifičnosti prema elektron donorima i njegove visoke osetljivosti prema mnoštvu elektron akceptora.

Biosenzor za detekciju disaharida je pripremljen preko imobilizacije CDH na rotirajućoj disk elektrodi, koja je mogla da detektuje celobiozu i celooligosaharide do 6 stepena polimerizacije, laktozu i maltozu [75]. Montiran u protočnu ćeliju sa glukoza-oksidadnom elektrodom, istraživači su CDH elektrodu koristili za kvantifikaciju posle kolonske hromatografije za glukozu, celobiozu i rastvorne celodekstrine [76]. Detekcija orto i para-difenolnih jedinjenja je ostvareno sa CDH direktno apsorbovanom na grafitnoj elektrodi. Senzor je efikasno razlikovao između difenola i monofenola i bio je dovoljno osetljiv da otkrije njihove niske koncentracije [77]. Amperometrijski biosenzor baziran na CDH je ispitivan za svoju korisnost za sistem brzog proveravanja i otkrivanje fenolnih jedinjenja u otpadnim vodama [78]. Druga grupa naučnika je koristila elektrodu da detektuje oksidaciju celobioze. Oksido-redukcioni potencijal elektrode je korišćen u kombinaciji sa CDH-fericijanid redoks sistemom za kvantifikaciju [79].

Kolorimetrijski esej za celobiozu, sa DCIP-om umesto fericijanidom je korišćen za kontrolisanje celobiohidrolaze. Enzimi u prečišćenim frakcijama su kontrolisani koristeći karboksimetil celulozu i formiranje celobioze je praćeno sa CDH. Skoro linearan odgovor je dobijen u dometu od 5 – 400 μM celobioze, čak

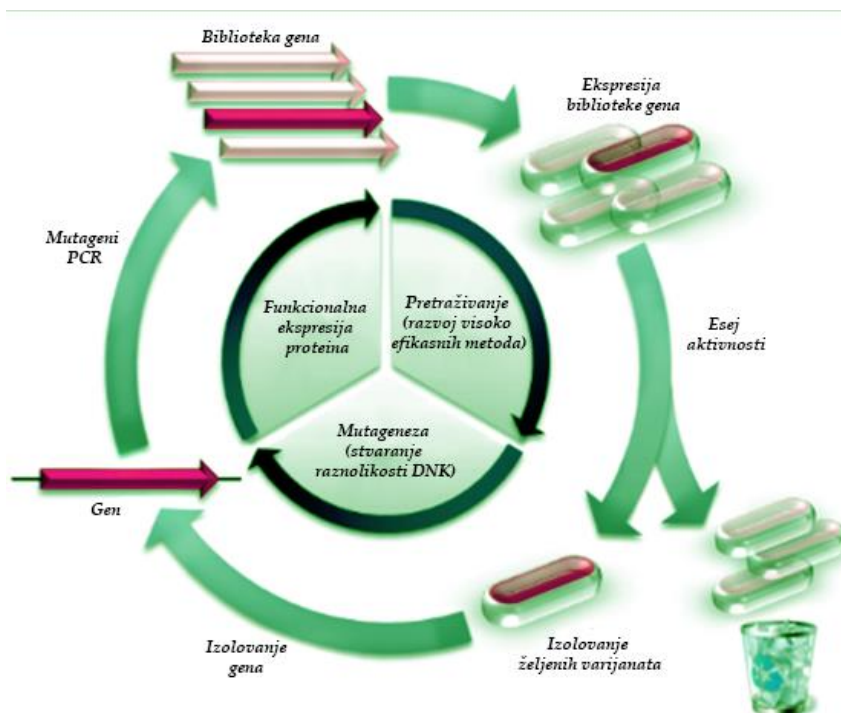
i u prisustvu visoke koncentracije glukoze [80]. CDH je takođe uspešno korišćena za kvantifikaciju laktoze u mleku [81].

Visoka cena CDH nije u velikoj meri omogućila korišćenje CDH u industrijskim procesima. Heterologna ekspresija CDH u *Pichia pastoris* može da promeni situaciju jer se može često koristiti u industrijskoj primeni ovog enzima.

2.4. Dirigovana evolucija

Dirigovana evolucija je moćan metod za poboljšanje-usavršavanje proteina i drugih bioloških molekula i sistema i uključuje učestali proces primene selektivnog pritiska na biblioteku varijanata da bi se identifikovali mutanti sa zahtevanim osobinama. Dirigovana evolucija, od svog razvoja u 1990-tim, je postala korisno oruđe korišćeno u proteinskom inženjeringu [82], metaboličkom inženjeringu [83], inženjeringu biosintetičkih puteva [7] i sintetičkoj biologiji [84].

Dirigovana evolucija je proteklih godina uspešno korišćena da se poboljša aktivnost proteina [85], njihova stabilnost [86], supstratna specifičnost [87], enantioselektivnost [88], ekspresija u rastvornom obliku [89] i sklonost ka vezivanju supstrata [90].



Slika 5 Šematski prikaz koraka dirigovane evolucije. Glavni koraci su: funkcionalna ekspresija ciljanog proteina, stvaranje raznolikosti DNK i razvoj pouzdanog visoko-efikasnog eseja (modifikovana slika [91]).

Dirigovana evolucija se oslanja na jednostavan princip mikroevolucije i selekcije i obuhvata tri suštinska koraka: funkcionalna ekspresija ciljanog proteina, stvaranje raznolikosti DNK i razvoj pouzdanog visoko-efikasnog eseja za pretraživanje unapređenih proteinskih varijanti (Slika 5.).

2.4.1. Selekcija organizma domaćina

Izbor odgovarajućeg organizma domaćina je kritičan korak za ostvarivanje funkcionalne ekspresije ciljanog gena, međutim biranje najboljeg ekspresionog sistema je često izazovan proces i zahteva pažljivo razmatranje mnogih faktora čiji su mogući uticaji teški za predvideti [92]. Ekspresija heterolognog gena u stranom domaćinu je često limitirana od strane razlika u

TEORIJSKI DEO

ekspresionim sistemima od autohtonog organizma. Ove razlike u ekspresiji mogu izazvati brojni faktori, kao što su korišćenje različitog kodona, nedostajanje šaperona i posttranslacionih modifikacija kao što su glikozilacija ili disulfidni mostovi [93].

I ako se u teoriji bilo koji organizam može koristiti kao domaćin za dirigovanu evoluciju u stvarnosti se koristi samo nekoliko njih. Najpopularniji organizmi domaćini za dirigovanu evoluciju su *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae* zbog njihove visoke transformacione efikasnosti, brze stope rasta, dobro uspostavljenih oruđa za rukovanje i sposobnosti da održe stabilne plazmide. *E. coli* se koristila u oko ~86% objavljenih istraživanja o dirigovanoj evoluciji dok se *S. cerevisiae* koristila u oko ~9% [94]. Drugi organizmi domaćini, kao što su *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Pichia pastoris*, ćelije sisara (3T3, CHO) i ćelije insekata takođe mogu imati ograničenu primenu.

2.4.1.1. Bakterije

Escherichia coli

Gram negativna bakterija *E. coli* je proteklih godina postala glavni domaćin za većinu istraživanja za dirigovanu evoluciju zbog svoje relativne jednostavnosti, dobro shvaćene genetike, dostupnim vektorima za kloniranje, kolekcijom sojeva za mutante i brze stope rasta [92]. *E. coli* takođe ima visoku transformacionu efikasnost ($>10^9$ transformantnih jedinica prema μg plazmidne DNK) što je važan faktor u pripremanju velike biblioteke mutanata [95]. Značajan napredak je učinjen tokom prethodnih godina u pogledu dirigovane evolucije različitih enzima u *E. coli* [82].

Iako je bakterija *E. coli*, najkorišćeniji soj domaćin u dirigovanoj evoluciji, ipak su oni limitirani na prokariotske proteine. Bakterijski domaćini su manje prikladni kad se radi sa eukariotskim genima, jer često dovodi do nepravilnog

uvijanja proteina, deglikozilovanog, ne-funkcionalnog ili izmenjenog proteina i gomilanja proteina u inkluzionim telima [96, 97].

2.4.1.2. Kvasci

Pichia pastoris

Postalo je popularno korišćenje metilotrofnog kvasca *Pichia pastoris* kao domaćina za heterolognu proizvodnju različitih eukariotskih proteina. *P. pastoris* može da se relativno lako genetički varira i može da raste do visoke gustine ćelija u ćelijskoj kulturi [98]. Njegova sličnost sa *S. cerevisiae* ga čini pogodnim domaćinom za dirigovanu evoluciju. *P. pastoris* je eukariot i zbog toga ima sposobnost da proizvede rastvorljiv, ispravno uvijen rekombinantni protein, ili unutar ili van-ćelijski sa odgovarajućim posttranslacionim modifikacijama kao što su glikozilacija, formiranje disulfidnih veza i proteolitička obrada [99]. Prikladna tehnologija bazirana na PCR-u (eng. *polymerase chain reaction* - reakcija polimeraznog lanca) je razvijena za proučavanje dirigovane evolucije koja omogućava stvaranje efikasne biblioteke i pouzdane ekspresije kroz integraciju gena u *P. pastoris* [100].

I ako *P. pastoris* može da izluči veliku količinu proteina i poseduje mehanizme za posttranslacione modifikacije, većina vektora koji su dostupni za heterolognu ekspresiju su integrativni, mada postoji nekoliko izuzetaka [101], oni zajedno sa niskom efikasnošću integracije ograničavaju njihovu primenu u visoko-efikasnom proveravanju i laboratorijskoj evoluciji. Nedavni napori koji su tražili da integriraju linearne ekspresione kasete da bi eksprimirali biblioteke mutanata hidrosilnitril liaza, dali su osnovu za efikasno i pouzdano korišćenje sistema *Pichia pastoris* za dirigovanu evoluciju [100]. Ipak mala stopa transformacije je još uvek velika prepreka za upotrebu ovog pristupa.

Saccharomyces cerevisiae

Srećom *S. cerevisiae* pruža rešenje za gore opisane probleme pošto pokazuje visoku efikasnost transformacije (od 1×10^6 do 1×10^8 transformanata/ μg DNK u zavisnosti od soja kvasca), može da izvrši posttranslacione modifikacije (npr. glikozilaciju, obradu N i C-terminalnih krajeva) i poseduje potpuno razvijenu mašineriju za izlučivanje koje usmerava na izlučivanje proteina u medijum kulture (preskaćući dugotrajne korake lize generalno potrebne kad se radi sa *E. coli* i izbegavanje bilo kog mešanja smeša kompleksnih lizata u proveravajućim esejima [102, 103]).

S. cerevisiae može da hiperglikoziluje heterologne proteine (u nekom slučaju čak i preko 50% molekularne mase enzima) dodajući manozne ostatke u Goldžijevom aparatu, što je sporedna posledica teškoća uočenih tokom izlučivanja u vanćelijsku sredinu. Iako je ovaj efekat uopšteno delotvoran za stabilnost proteina jer štiti enzim od proteolitičke razgradnje, ipak to stvara dosta izoformi koje otežavaju prečišćavanje enzima i njihovu biohemijsku karakterizaciju.

Najpopularniji domaćin za evoluciju eukariotskih proteina i enzima je *S. cerevisiae* [92]. *S. cerevisiae* omogućava bibliotekama mutanata da se ekspimiraju u citosolu [104], izlučuju van ćelije [105], ili prikazuju na površini ćelije [15]. Poseduje efikasnu aparaturu za rekombinaciju DNK koja dopušta da se koristi širok obim genetske manipulacije, tako se i homologna rekombinacija i mehanizam popravke pukotina kod kvasaca može koristiti da se brzo izgradi i ekspimirira biblioteka varijanata [106].

Rutinski se *S. cerevisiae* koristi kao domaćin u dirigovanoj evoluciji i sledeći radovi su pokazali njegovu efikasnost. Enzim peroksidaza iz rena (HRP) je modifikovana u *S. cerevisiae* za povećanje aktivnosti [107]. Posle tri runde dirigovane evolucije sa nasumičnom mutagenezom i pretraživanjem, dobijeno je povećanje od 40 puta u totalnoj HRP aktivnosti. Ksilozna izomeraza je

evoluirana u *S. cerevisiae* preko tri runde mutageneze i pretraživanje zasnovano na rastu za poboljšanje ksiloznog metabolizma i fermentacije [108]. Soj koji eksprimira projektovani enzim poboljšavajući njegovu stopu aerobnog rasta 61-put i povećava i proizvodnju etanola i potrošnju ksiloze 8-puta. Za razliku od enzima divljeg-tipa, mutantni enzim je takođe omogućio proizvodnju etanola pod uslovima limitiranog kiseonika.

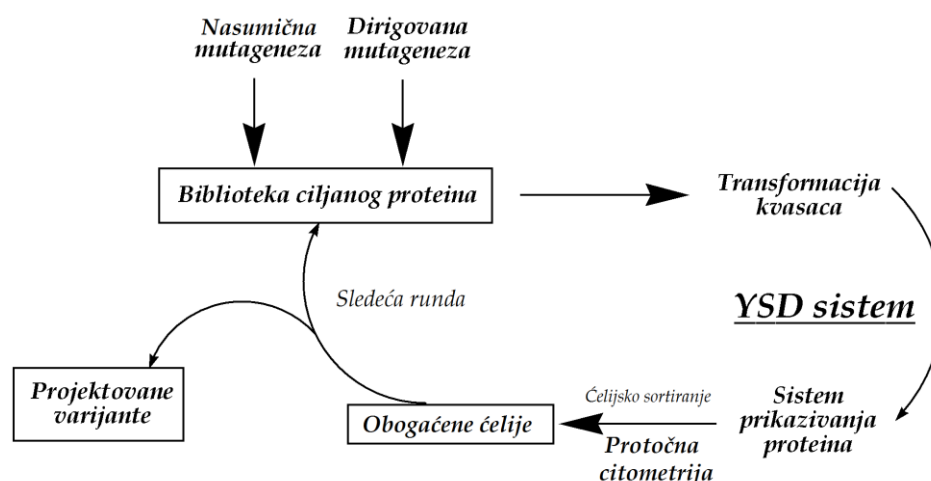
2.4.2. Ekspresija na površini ćelija kvasca

Površina ćelije je funkcionalna barijera između unutrašnjosti i spoljašnjosti ćelije. Površina ćelije se može iskoristiti u biotehnologiji, koristeći poznati mehanizam transporta heterolognih proteina na površinu ćelije. Naučnici su 1990-tih otkrili da se kratki peptidi mogu prikazati na površini viriona spajanjem za usidravajući protein filamentoznog faga bez uticanja na njegovu sposobnost da zarazi bakterije [109]. Od tad su različite platforme za prikazivanje na površini uspostavljene i brzo razvijane [110, 111].

Sistem prikazivanja na površini ćelije ima glavnu prednost da ciljani proteini prikazani na površini ćelije omogućavaju da manipulacija enzimskih reakcija bude lakša i izvodljivija. Da bi se povezao genotip i fenotip proteina u visoko efikasnim eksperimentima razvijene su različite metode prikazivanja, uključujući prikazivanje (ekspresija) na površini faga [112], prikazivanje na površini bakterija [113], prikazivanje na površini ribozoma [114], prikazivanje na površini ćelija kvasca [115] i prikazivanje na površini ćelija sisara [116].

Princip prikazivanja na površini faga je prikazivanje heterolognih peptida ili proteina kroz njihovo spajanje sa proteinima omotača filamentoznog faga, i koristi se u izolovanju liganada, antigena i antitela [117, 118]. Zbog male zapremine faga, veličina i raznolikost ciljanih peptida ili proteina je veoma ograničena. Kod bakterijskog sistema za prikazivanje na površini (*E. coli* OmpA sistem [119]), heterologni proteini su pravilno umetnuti u region petlje proteina

koji se nalazi na spoljašnjoj membrani ćelije, stvarajući proteinski kompleks koji je onda zajedno prikazan na površini bakterijske ćelije. Međutim umetanje stranog proteina sa proteinom spoljašnje membrane ćelije često poremeti njegovu funkcionalnu strukturu, uzrokujući nisku efikasnost prikazivanja na površini. Ovo zajedno sa činjenicom da se mnogi eukariotski proteini nisu dobro uvili ili pogrešno uvili u bakteriji ili fagu su doveli do razvoja sistema za prikazivanje na površini eukariotskih ćelija. Pod ovim uslovima je prikazivanje na površini ćelija kvasca razvijeno i on koristi protein usidren na ćelijskom zidu kvasca kao površinski nosilac [120].



Slika 6. Šematski prikaz platforme YSD za inženjering proteina (Modifikovana slika [121]).

Ekspresija na površini ćelija kvasca u odnosi na fagnu, bakterijsku i ribozomnu ekspresiju ima dve izuzetne prednosti. Prva prednost je prisustvo mašinerije za proizvodnju eukariotskih proteina koja je neophodna za posttranslacione modifikacije i kontrolu kvaliteta eksprimiranog proteina. Druga, heterologni proteini u prikazivanju na površini ćelija kvasca (eng. *Yeast surface display*-YSD) se mogu alternativno spojiti ili na N-deo ili C-deo na površini usidravajućeg proteina bez prekida njegove strukture, i tako održava strukturu na površini i usidravajući protein je u velikoj meri nepromenjen bez

smanjivanja efikasnosti prikazivanja na površini kvasca. Štaviše za razliku od ekspresije na površini faga ili ribozoma, odabir prikazivanja na kvascu obično uključuje korak sortiranja protočnom citometrijom, olakšavajući kvantitativnu analizu tokom odabira (Slika 6.) [121]. Dodatno uključujući ekspresionu oznaku moguće je normalizovati proteinsku ekspresiju čineći metod još osetljivijim [15]. Za razliku od drugih sistema glavni nedostatak YSD-a je što ćelije kvasca pokazuju sporiju stopu rasta i manju efikasnost transformacije sa stranim plazmidom. Nedavni razvoj tehnologije je povećao efikasnost transformacije kvasaca do 10^8 čineći izvodljivo stvaranje biblioteka mutanata sa dovoljnom informacijom u laboratorijskim uslovima [120, 122].

2.4.2.1. Mehanizam prikazivanja na površini ćelije

U većini YSD sistema obično korišćeni proteini za prikazivanje heterolognih proteina su glikozil-fosfatidil-inozitol (GPI) usidreni proteini, zajedno sa aglutininom (α -aglutinin i a-aglutinin), flokulin Flo1p i drugi [123, 124]. Kroz kvašćev endoplazmatični retikulum i Goldžijev put za izlučivanje, proteini usidreni sa GPI su prevedeni do površine ćelije kvasca, formirajući β -1,6-glukanske mostove sa manoproteinskim slojem na ćelijskom zidu [109, 125].

Različit od ovih proteina površine ćelije koji funkcionišu kao površinsko sidro i nosač heterolognih proteina, sistem Aga1-Aga2 YSD je izgrađen od odvojenog površinskog sidra i proteinskog nosača. Aga1 i Aga2 proteini pripadaju proteinima a-aglutinina. Za razliku od α -aglutininskih proteina koji se sastoje od jedne Aga1 jedinice koja deluje kao sidro i kao nosač, kod a-aglutinina Aga1 deluje kao površinsko sidro a Aga2 kao nosač heterolognih proteina. U Aga1-Aga2 YSD sistemu, heterologni protein od interesa je eksprimiran kao spoj sa Aga2 aglutininskim proteinom, koji se vezuje preko dve disulfidne veze sa Aga1, koji je usidren u ćelijski zid [115]. Heterologni proteini se mogu spojiti na bilo koji kraj Aga2 omogućavajući alternativne

opcije da se održe originalne biološke osobine ciljanog proteina. Dodatno, dizajnirani soj *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 je korišćen za Aga1-Aga2 YSD sistem, u kom je heterologni gen Aga1 pod kontrolom galaktoza indukovanog (GAL) promotora ubačen u hromozom kvasca. Pošto je Aga2 kompleks gena za spajanje u egzogenom plazmidu koji je takođe pod kontrolom galaktoza indukovanog GAL promotora, ekspresija Aga1 i Aga2 spojnog kompleksa se može snažno indukovati simultano za najveću efikasnost prikazivanja na površini ćelija, sa prosekom od više od 3×10^4 heterolognih molekula proteina prikazanih na jednoj ćeliji kvasca [115].

2.4.3. Stvaranje raznolikosti DNK

Metode stvaranja raznolikosti DNK se grupišu u tri kategorije: 1) fokusirana mutagenaza; 2) nasumična mutagenaza i 3) DNK rekombinacija.

2.4.3.1. Fokusirana mutagenaza

Fokusirana mutagenaza se uglavnom koristi u polu-racionalnim eksperimentima proteinskog dizajna [126] da bi se poboljšala svojstva kao što je aktivnost [127], selektivnost [128], i ređe temperaturnu stabilnost [129]. Postoji preduslov za ovu metodu, a to je kristalna struktura ili homologni model da bi se identifikovali "korisni" ostaci koji su potom nasumično mutirani [130]. Studije fokusirane mutagenaze koriste zasićujuću mutagenazu na jednoj poziciji i ređe simultano na dve ili tri pozicije [131].

Princip umnožavanja celog plazmida sa mutagenim prajmerima [132] je trenutno najrasprostranjeniji metod za mesto-specifičnu i mesto-zasićujuću mutagenazu. Napredak u metodama fokusirane mutagenaze ima cilj da postigne mutagenazu dirigovanu na mnogo mesta i da smanji napor pretraživanja kao rezultat pametnog izbora degenerisanih kodona. Izazov

višestrukog zasićenja je rešen metodama kao što su poliakrilamid gel elektroforeza-posredovano preklapanje produženih PCR [133], pripajanje sintetičkih oligonukleotida preko ponovnog sklapanja gena [134], više od deset mesta simultano mutirano preko višestruke mesto-zasićujuće mutageneze u jednom krugu [135].

2.4.3.2. *Nasumična mutageneza*

Metode nasumične mutageneze se obično primenjuju na osobine koje nisu racionalno razumljive (npr. stabilnost u prisustvu organskih rastvarača, jonskih tečnosti ili deterdženata). Metode nasumične mutageneze su grupisane u tri kategorije mutageneze: 1) bazirane na PCR-u; 2) hemijska mutageneza i 3) metode cele ćelije [136, 137]. Sveobuhvatan napredak je postignut kroz poboljšanje već postojećih ideja koje imaju cilj da povećaju kvalitet biblioteka mutanata (raznolikosti) i da se uproste postupci mutageneze [16].

Reper sistem sa četiri indikatora je razvijen i zasnovan na programu pomoćnika mutageneze (eng. *Mutagenesis assistant program* – MAP) [138]. MAP omogućava određivanje parametara ključnih osobina metoda nasumične mutageneze poredeći obrazac izmene aminokiselina na proteinskom nivou. MAP stoga pruža kvantitativnu meru za kvalitet biblioteke nasumičnih mutanata u odnosu na raznolikost, frekvencu stop kodona i pojavu prolina/glicina. Napredak 3D MAP [130] čak omogućava verovatnoću zamene aminokiselina po poziciji aminokiselina za 19 metoda mutageneze. MAP analiza može da se koristi da vodi strategiju mutacione evolucije praveći izbor metoda nasumične mutageneze sa komplementarnom sklonošću.

Standardna metoda nasumične mutageneze je još uvek metoda PCR - a sklonog greškama (eng. *error-prone PCR* – epPCR) zbog svoje jednostavnosti [139]. Metode epPCR-a su ograničene u svojoj raznolikosti kao rezultat tri izazova: mutaciona sklonost upotrebljene polimeraze, nedostatak kasnije

TEORIJSKI DEO

mutageneze u kodonu (tri do pet mutacija po genu po rundi mutacija; statistički razlog) i organizacija genetskog koda (jedan do šest kodona po kodiranoj aminokiselini) [140].

Hemijska sinteza DNK nam omogućava da sintetišemo cele gene. Sinteza gena nudi potencijalnu slobodu nad genetičkom raznovrsnošću uključujući kontrolu nad frekvencom mutacija, spektrom mutacija i naknada za suvišnost kodona. Mogućnost potpuno automatizovane rutinske sinteze, fragmenata jednolančane DNK je omogućila brojne primene u molekularnoj biologiji i biotehnologiji. Glavna primena kreiranja sintetičkih gena je u povećanju nivoa ekspresije proteina [141] u heterolognim domaćinima optimizujući korišćenje kodona [142], povećanjem stabilnosti informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) i translacionu efikasnost [143].

Ćelije održavaju tokom replikacije DNK visoku tačnost prepisa sa niskim nivoom greške, kao supstitucija/ 10^{10} bp/generaciji/ćeliji. Tačnost se može smanjiti mutacijama u genima potrebnim za replikaciju ili popravku DNK (mutacioni sojevi).

Vektor koji sadrži gen od interesa se ubacuje u mutacioni soj koji je oskudan u glavnim putevima popravke DNK. Tokom ćelijskog rasta, mutacije se gomilaju u genomskoj DNK mutacionog soja, vektoru i genu od interesa. Mutirani vektori se potom izoluju i ponovo koriste za transformaciju standardnih ekspresionih domaćina sa malom frekvencom mutacija i posle su provereni za pogodne mutante. Popularni komercijalizovani mutacioni soj je *E. coli* XL1-Red, koji je mutiran u tri puta popravke DNK: *mutS* (neusklađena popravka sklona greškama), *mutD* (oskudan u 3'-5' egzonukleazne aktivnosti DNK polimeraze III) i *mutT* (sprečava uklanjanje 8-okso dGTP u neusklađenim parovima uključujući A:G, stvarajući uglavnom AT-CG transferzale) [144]. Kao rezultat stopa mutacije je porasla za ~5000 puta u odnosu na originalni, nepromenjeni soj *E. coli* (jedna mutacija/ 10^{10} bp/generaciji/ćeliji) [145].

Nasumična mutageneza omogućava poboljšanje osobina (npr aktivnosti, pH profil) preko jedne ili dve zamene aminokiselina na površini enzima koje se ne bi racionalno izabrale za fokusiranu mutagenezu. Međutim sa postojećim metodama za visoko efikasnu proveru nije moguće proći kroz celokupnu prirodnu raznovrsnost u bibliotekama nasumične mutageneze.

2.4.3.3. *Rekombinacione metode*

Ponovno sortiranje mutacija da bi se pristupilo delotvornim kombinacijama mutacija je ključni sastavni deo biološke mikroevolucije. Ovaj prirodni proces se može imitirati sa širom metodom homologe rekombinacije. Originalni metod mešanja DNK je metod gde se gen iseče enzimom DN-aza i posle se dopusti da se fragmenti nasumično spoje jedan sa drugim u PCR reakciji bez dodanih prajmera [146]. Povezani metod koristi sečenje od strane DN-aza ali sa drugačijim metodom ponovnog sklapanja nazvan nasumično stvaranje hitera na prelaznim šablonima (eng. *Random chimeragenesis on transient templates* - RACHITT) [147].

In vitro rekombinacija DNK sekvenci za dirigovanu evoluciju proteina je uvedena u formi mešanja DNK [146]. Razvoj novih rekombinacionih metoda kao što su proces raspoređene ekstenzije [148], RACHIT [147] i drugi su omogućili njihovu upotrebu u dirigovanoj evoluciji.

Glavna razlika između metoda DNK rekombinacije i metoda nasumične mutageneze leži u izazvanoj raznolikosti [149]. Metode DNK rekombinacije u suštini stvaraju himerne proteine rekombinacijom sekundarnih strukturnih elemenata različitih proteina koji su bili izabrani pre za tu funkciju od strane prirode. Klasične metode DNK rekombinacije izbegavaju stop kodone i nasumično uvođenje novih i potencijalno strukturno-destabilizujućih aminokiselina [146], stoga su biblioteke mutanata obično visoko funkcionalne i zahtevaju niske sposobnosti pretraživanja [147]. Generisana raznovrsnost u

TEORIJSKI DEO

eksperimentima rekombinacije gena je niža u odnosu na epPCR, dok je broj supstituisanih/zamenjenih aminokiselina po mutantu veća i smislenija [146].

2.4.4. Visoko efikasne metode za pretraživanje

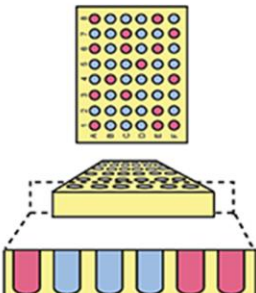
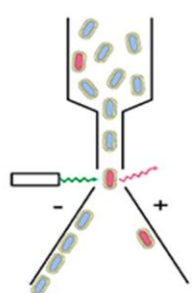
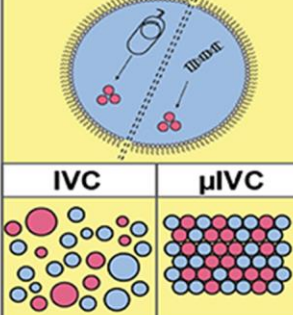
Osnovni korak ograničenja u većini eksperimenata dirigovane evolucije je identifikacija željenih mutanata [150]. Pretraživanje i odabir su dve glavne metode analize biblioteka. Pretraživanje se odnosi na procenu svakog proteina na željenu osobinu, dok se odabirom automatski eliminišu nefunkcionalne varijante [151]. Visoko efikasne metode za pretraživanje i odabir omogućavaju brzu identifikaciju željenih osobina od raznovrsnih kandidata. Međutim spajanje analiza fenotipa sa odgovarajućom metodom je najzahtevniji deo razvoja ovih metoda za inženjering enzima.

Procena pojedinačnih varijanata proteina je zahtevani korak u pretraživanju, i u velikoj meri smanjuje šansu da se izgubi željeni mutant. Metode pretraživanja se mogu podeliti u odnosu na sistem korišćen za pretraživanje [151].

2.4.4.1. Mikrotitar ploče

Mikrotitar ploča smenjuje epruvetu, menjajući epruvete u više bunara (Slika 7.). Najviše korišćena ploča je formata od 96-bunara, iako postoje komercijalne i od 9600-bunara. Tradicionalni eseji enzimske aktivnosti se mogu izvoditi u mikrotitar pločama dodajući komponente reakcije i bilo sirove ćelijske ekstrakte ili ručno prečišćene proteine. Efikasnost metode se može uveliko poboljšati pomoću robotskih sistema [152]. Kolorimetrijski ili fluorimetrijski eseji su najprikladniji među brojnim enzimskim esejima baziranim na mikrotitar pločama [17]. Nestanak supstrata ili formiranje proizvoda se kod nekih enzimskih reakcija može lako identifikovati makroskopskim posmatranjem ili merenjem UV-vis apsorbanace ili fluorescencije koristeći čitač ploča. Nije ni čudo što ovi eseji nisu opšte prihvatljivi, pošto ovi eseji izuzetno zavise od hemije i dostupnosti odgovarajućih prirodnih supstrata.

Mikrotitar ploče su takođe smatrane kao dobro razvijena alternativa erlenmajerima koja omogućava pretraživanje mutanata sa raznolikim profilima ćelijskog rasta, uzimanja supstrata i stvaranja proizvoda [153].

	Mikrotitar ploča	FACS	Emulzija	
				
Efikasnost	Visoka (<math><10^5</math> po danu)	Ultra visoka (>math>10^5</math> po danu)	Ultra visoka (>math>10^5</math> po danu)	
Veza genotip/fenotip	Granica bunara	Ćelijska membrana	Granica kapljice	
Tip eseja	Raznovrstan	Samo ćelije	Raznovrstan	
Kompatibilnost sa jednom ćelijom	Ne	Da	Da	
Cena po reakciji	Visoka	Niska	Niska	

Slika 7. Načelo strategija (ultra) visoko efikasnih metoda pretraživanja za poboljšavanje/otkriće enzima. Različiti metodi (mikrotitar ploče, ćelijsko sortiranje aktivirano fluorescencijom (eng. Fluorescence-activated cell sorting (FACS)) i emulzija) su prikazani sa granicom (bunar, ćelijska membrana ili ulje) ograničavajući fenotip sa genotipom označeno žutim. Emulzije mogu biti u dva tipa: *in vitro* kompartmentalizacija (IVC) rukuju sa emulzijama različitih dimenzija i IVC pomognuta mikrofluidikom (μ IVC) sa emulzijama jedne dimenzije [154].

2.4.4.2. FACS

Fluorescentno aktivirano ćelijsko sortiranje (FACS, eng. *Fluorescent activated cell sorting*) pruža metodu sortiranja ćelija u dve ili više posuda brzinom od oko 30 000 ćelija/s, i bazirana je na fluorescentnom signalu individualnih ćelija [155] (Slika 7.). Glavne primene pristupa FACS pretraživanja za enzimsku aktivnost su: prikazivanje na površini, *in vitro*

kompartimentalizacija (IVC) i eseji sa zelenim fluorescentnim proteinom (eng. *Green fluorescent protein* - GFP) [156]. GFP i drugi fluorescentni proteini su idealni predmeti za analizu ćelijske fluorescencije. Povezivanjem ciljane enzimske aktivnosti sa ekspresionim nivoom GFP, uspešno je primenjen FACS na pretraživanje mutanata Cre rekombinaze sa specifičnošću rekombinacije na izmenjenom mestu [157].

Za zadržavanje proizvoda koristi se fluorescentni supstrat koji može da se prebaci u i van ćelije i da reagije sa enzimom od interesa. Ovi supstrati se mogu konačno isprati i ne moraju da ostanu unutar ćelije. U suprotnom će fluorescentni proizvod ostati u ćeliji zbog svoje veličine, polarnosti ili hemijskih osobina. FACS omogućava pretraživanje željenog fenotipa, iskoristivši razlike u fizičkim osobinama između supstrata i proizvoda, kroz zadržavanja proizvoda unutar ćelija [156].

2.4.4.3. Prikazivanje na površini ćelije

Među raznovrsnim tehnologijama prikazivanja željenih molekula, prikazivanje na površini ćelije je najbolje prilagođen za visoko efikasno pretraživanje. Kao što je prethodno opisano u tekstu, enzimi kodirani iz DNK unutar ćelije se mogu eksprimirati i prikazati na spoljašnjoj površini ćelije, gde direktno reaguju sa supstratima [158]. Tehnologija prikazivanja na površini ćelije je postala značajna u primeni metodama pretrage FACS-a. Novi sistem integracije prikazivanja na površini ćelija kvasca, enzimski posredovana biokonjugacija i FACS, je prijavljen kao opšta strategija za evoluciju enzima koji stvaraju veze. Enzim prikazan na površini ćelija kvasca katalizuje kačenje difuznog supstrata na površinu ćelije preko formiranja veza. Tako vezani supstrat je podvrgnut fluorescentnoj ekscitaciji i FACS pretraživanju. Ovaj metod je postigao obogaćivanje aktivnih klonova od 6000-puta, posle jedne runde pretraživanja [159].

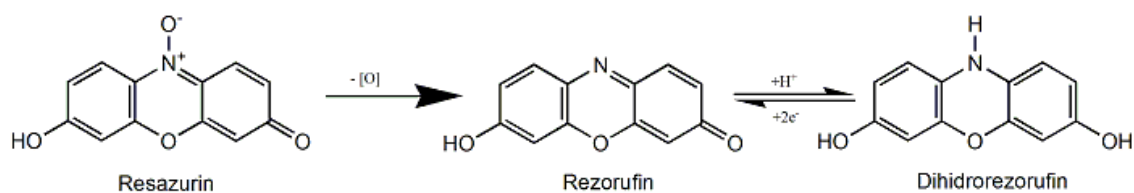
2.4.4.4. *In vitro* kompartmentalizacija - IVC

Kao jedan tip kompartmentalizacije, IVC koristi veštačke pregratke (npr., voda-u-ulju (W/O) kapi emulzije ili voda-u-ulju-u-vodi (W/O/W) kapljice duple emulzije) da izoluju individualne DNK molekule, formirajući nezavisne reaktore za sintezu proteina bez ćelija i enzimske reakcije [160]. Uređaj za mikrofluidne kapi kompartmentalizuje reaktante u pikolitarske zapremine sa kraćim vremenom, visokom osetljivošću i višom efikasnošću nego standardni eseji [161]. IVC ima nekoliko prednosti u odnosu na metode visoke efikasnosti bazirane *in vivo*: prvo zaobilazi regulacionu mrežu *in vivo* sistema, otklanjajući mogućnost da se evoluirani fenotip pojavi iz mutacija nevezanih za ciljani gen, drugo pošto je izbegnuta transformacija, veličina biblioteke nije ograničena efikasnošću transformacije ćelije domaćina.

Većina enzima nisu kompatibilni sa IVC zbog različitih uslova između transkripcije-translacije i pretraživanja [162], IVC je ipak odličan metod pretraživanja enzimske aktivnosti spajanjem sa FACS-om ili homogenim česticama polimera dijametra 0,5 - 500 μm (mikrozrnca) [163]. IVC je korišćen da se pretraži aktivnost [FeFe] hidrogenaze koja je jako inhibirana kiseonikom. Hidrogenaza koja je označena (vezana za antitela na površini mikroznca) je izložena kiseoniku. Aktivna [FeFe] hidrogenaza troši vodonik i redukuje C12-resazurin do fluorescentnog C12-rezorufina koji se adsorbuje na površinu mikroznca i izolovan od strane FACS-a [164].

Resazurin

Resazurin je netoksična boja rastvorna u vodi koja je redukovana reakcijama elektron transfera povezanih sa disanjem, proizvodeći rezorufin, proizvod koji je rastvoran u vodi koji je lako izmeriti spektrofluorimetrom ili spektrofotometrom [165]. Posle redukcije resazurin menja boju od plave do roze a potom do bezbojne [166] (Slika 8.).



Slika 8. Pretvaranje resazurina do rezorufina i posle do dihidrezozorufina. Na λ_{ex} 540nm i λ_{em} 590nm resazurin je plav i slabo fluorescentan, rezorufin je roze i jako fluorescentan dok je dihidrezozorufin je bezbojan i nefluorescentan [167].

Prvi korak ove redukcije je usled gubitka atoma kiseonika koji je labavo vezan za azot u fenoksazinskom prstenu. Ova promena do roze rezorufina nije reverzibilna od strane atmosferskog kiseonika i u velikoj meri je nezavisna od redukcionog potencijala i sadržaja kiseonika. Druga faza redukcije je do bezbojnog stanja što je reverzibilno od strane atmosferskog kiseonika [168].

Ova boja se koristi da se ispita održivost mikroorganizama (ne destruktivno) [169], za kvantifikaciju biofilma [170], i testiranje dezinfekcionog sredstva kliničkih uređaja na anti-biofilm [171]. Resazurin je izuzetno stabilan u medijumu bez ćelija, ali se brzo redukuje u prisustvu živih ćelija. Nekoliko reduktaza, kao što su diaforaze i NADPH dehidrogenaza, koriste resazurin kao elektron akceptor i redukuju ga do rezorufina [165].

3. CILJEVI

Cilj ovog rada je kloniranje gena celobioza-dehidrogenaze iz *P. chrysosporium* u različite vektore i ekspimiranje u različitim ekspresionim sistemima, dobijanje mutanata celobioza-dehidrogenaze sa poboljšanim karakteristikama za korišćenje u biogorivnim ćelijama i biosenzorima, kao i razvoj i optimizacija novih visoko efikasnih metoda pretrage biblioteka gena celobioza-dehidrogenaze zasnovanim na prikazivanju na površini ćelija kvasca. U okviru ove teze formulisano i ispitivano je:

- ❖ Kloniranje i ekspresija CDH iz *P. chrysosporium* u kvascu *S. cerevisiae* InvSc1 i karakterizacija rekombinantnog proteina, pravljenje biblioteke gena *cdh*, pretraga mutanata i njihova karakterizacija.
- ❖ Testiranje upotrebljivosti sistema ekspresije oksidoreduktaznih enzima u vidu himere sa Aga2 proteinom na površini ćelija kvasca *S. cerevisiae* EBY100 za dirigovanu evoluciju enzima na primeru divljeg soja i jednog mutanta glukoza-oksidade.
- ❖ Kloniranje i ekspresija mutanata CDH na površini ćelija kvasca *S. cerevisiae* EBY100 u vidu himere sa Aga2 proteinom i karakterizacija dobijenog himernog proteina. Pravljenje biblioteka gena CDH metodom slučajnih mutacija i ekspresija na površini ćelija kvasca.
- ❖ Razvoj i optimizacija novog fluorescentnog enzimskog eseja za CDH za visoko efikasno pretraživanje biblioteke gena CDH ekspimirane na površini ćelija kvasca *S. cerevisiae* EBY100 zasnovane na fluorescentnom enzimskom eseju. Pretraživanje biblioteka gena celobioza-dehidrogenaze ekspimirane ekstracelularno i na površini ćelija kvasca ka povećanoj aktivnosti.
- ❖ Kloniranje, ekspresija i prečišćavanje odabranih mutanata nehimernog oblika CDH u kvascu *Pichia pastoris* i detaljna karakterizacija kinetičkih parametara aktivnosti i stabilnosti.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Izvor gena za celobioza-dehidrogenazu

Sintetički gen za celobioza-dehidrogenazu iz soja *Phanerochaete chrysosporium* je dobijen od kompanije GenScript USA na osnovu nukleotidne sekvence za zreo protein CBDH u nukleotidnoj banci podataka NCBI pod brojem U46081.1.

4.1.2. Vektori i sojevi

Echerichia coli DH5 α soj je korišćen kao domaćin za kloniranje gena i održavanje plazmida. Za ekspresiju gena glukoza-oksidade i celobioza-dehidrogenaze na površini ćelija kvasca korišćen je soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 i vektor pCTCON2 (dobijeni od profesora Dejn Vitrapa sa MIT). Za ekstracelularnu ekspresiju celobioza-dehidrogenaze korišćen je soj kvasca *Pichia pastoris* KM71H i vektor pPICZ α A naručeni od kompanije Invitrogen, Kalifornija.

4.2. Mikrobiološke metode

U svim mikrobiološkim radovima poštovana su pravila rada u mikrobiološkoj hemiji, a za pripremanje podloga upotrebljavane su supstance čistoće *pro analysi*. Podloge su pripremane rastvaranjem određene količine sastojaka u demineralizovanoj vodi i sterilisane u autoklavu na 121°C 20 minuta.

MATERIJAL I METODE

4.2.1. Podloge za rast bakterija

4.2.1.1. Luria-Bertani tečna podloga za rast bakterija (LB)

U 1000 mL destilovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 10 g NaCl i 10 g triptona, pH se podešava na 7,4.

4.2.1.2. Luria-Bertani tečna podloga za rast bakterija rezistentnih na zeocin (LB-zeocin)

U 1000 mL destilovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl i 10 g triptona, pH se podešava na 7,4. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi u sterilnoj zoni se dodaje 250 μ L sterilnog rastvora zeocina koncentracije 100 mg/mL tako da finalna koncentracija u rastvoru bude 25 μ g/mL.

4.2.1.3. Luria-Bertani čvrsta podloga za rast bakterija rezistentnih na zeocin (LA-zeocin)

U 1000 mL destilovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 10 g triptona i 20 g agara, pH se podešava na 7,4. Nakon sterilizacije, podlozi ohlađenoj na 40-50°C u sterilnoj zoni se dodaje 250 μ L sterilnog rastvora zeocina koncentracije 100 mg/mL tako da finalna koncentracija u rastvoru bude 25 μ g/mL.

4.2.1.4. Luria-Bertani tečna podloga za rast bakterija rezistentnih na ampicilin (LB-ampicilin)

U 1000 mL destilovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl i 10 g triptona, pH se podešava na 7,4. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi u

MATERIJAL I METODE

sterilnoj zoni se dodaje 1 mL sterilnog rastvora ampicilina koncentracije 100 mg/mL tako da finalna koncentracija u rastvoru bude 100 µg/mL.

4.2.1.5. Luria-Bertani čvrsta podloga za rast bakterija rezistentnih na ampicilin (LA-ampicilin)

U 1000 mL destilovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 10 g triptona i 20 g agara, pH se podešava na 7,4. Nakon sterilizacije, podlozi ohlađenoj na 40-50°C u sterilnoj zoni se dodaje 1 mL sterilnog rastvora ampicilina koncentracije 100 mg/mL tako da finalna koncentracija u rastvoru bude 100 µg/mL.

4.2.1.6. Super optimalna tečna podloga za rast bakterija (SOC)

U 960 mL destilovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 0,5 g NaCl i 20 g triptona. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 10 mL 1M MgCl₂, 10 mL 1M MgSO₄ i 20 mL 20% (w/v) glukoze koji su prethodno sterilisani.

4.2.2. Podloge za rast kvasaca

4.2.2.1. Tečna podloga za rast kvasaca (YPD)

U 900 mL destilovane vode rastvoreno je 10 g ekstrakta kvasca i 20 g triptona. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 100 mL 20% (w/v) prethodno sterilisane glukoze.

4.2.2.2. Čvrsta podloga za rast kvasaca (YPD agar)

U 900 mL destilovane vode rastvoreno je 10 g ekstrakta kvasca, 20 g triptona i 20 g agara. Nakon sterilizacije, podlozi ohlađenoj na 40-50°C dodato je 100 mL 20% (w/v) prethodno sterilisane glukoze.

4.2.2.3. Čvrsta podloga za rast kvasaca rezistentnih na zeocin (YPD+zeocin agar)

U 900 mL destilovane vode rastvoreno je 10 g ekstrakta kvasca, 20 g triptona i 20 g agara, pH se podešava na 7,4. Nakon sterilizacije, podlozi ohlađenoj na 40-50°C dodato je 100 mL 20% (w/v) glukoze koja je prethodno sterilisana i 1 mL sterilnog rastvora zeocina koncentracije 100 mg/mL tako da finalna koncentracija u rastvoru bude 100 µg/mL.

4.2.2.4. Bogata tečna podloga za rast kvasaca (2xYPAD)

U 800 mL destilovane vode rastvoreno je 20 g ekstrakta kvasca, 40 g triptona i 0,08 g adeninsulfata. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 200 mL 20% (w/v) prethodno sterilisane glukoze.

4.2.2.5. Tečna selektivna podloga za rast kvasca *S. cerevisiae* InvSc1 i EBY100 (YNB-CAA+Glc)

U 900 mL destilovane vode rastvoreno je 5,1 g amonijum sulfata, 1,6 g azotne baze kvasca bez amonijum sulfata i aminokiselina (YNB) i 5 g kazamino kiselina (CAA). Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 100 mL 20% (w/v) prethodno sterilisane glukoze, adenin-sulfat (20mg/µL) filter sterilisan kao i za InvSc1 soj triptofan (20mg/µL) filter sterilisan.

4.2.2.6. Čvrsta selektivna podloga za rast kvasca *S. cerevisiae* InvSc1 i EBY100 (YNB-CAA+Glc agar)

U 900 mL destilovane vode rastvoreno je 5,1 g amonijum sulfata, 1,6 g azotne baze kvasca bez amonijum sulfata i aminokiselina (YNB), 5 g kazamino kiselina (CAA) i 20 g agara. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 100 mL 20% (w/v) prethodno sterilisane glukoze, adenin-sulfat (20mg/ μ L) filter sterilisan kao i za InvSc1 soj triptofan (20mg/ μ L) filter sterilisan.

4.2.2.7. Tečna selektivna podloga za indukciju ekspresije u kvascu *S. cerevisiae* InvSc1 i EBY100 (YNB-CAA+Gal)

U 900 mL destilovane vode rastvoreno je 5,1 g amonijum sulfata, 1,6 g azotne baze kvasca bez amonijum sulfata i aminokiselina (YNB) i 5 g kazamino kiselina (CAA). Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 100 mL 20% (w/v) prethodno sterilisane galaktoze, adenin-sulfat (20mg/ μ L) filter sterilisan kao i za InvSc1 soj triptofan (20mg/ μ L) filter sterilisan.

4.2.2.8. Čvrsta selektivna podloga za indukciju ekspresije u kvascu *S. cerevisiae* InvSc1 i EBY100 (YNB-CAA+Gal agar)

U 900 mL destilovane vode rastvoreno je 5,1 g amonijum sulfata, 1,6 g azotne baze kvasca bez amonijum sulfata i aminokiselina (YNB), 5 g kazamino kiselina (CAA) i 20 g agara. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 100 mL 20% (w/v) prethodno sterilisane galaktoze, adenin-sulfat (20mg/ μ L) filter sterilisan kao i za InvSc1 soj triptofan (20mg/ μ L) filter sterilisan.

4.2.2.9. Tečna podloga za rast transformisane *P. pastoris* KM71H (YPG)

U 900 mL destilovane vode rastvoreno je 10 g ekstrakta kvasca, 20 g peptona. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 100 mL 10% (v/v) prethodno sterilisanog glicerola.

4.2.2.10. Tečna podloga za indukciju ekspresije transformisane *P. pastoris* KM71H (YPM)

U 990 mL destilovane vode rastvoreno je 10 g ekstrakta kvasca, 20 g peptona. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 10 mL 50% (v/v) metanola prethodno sterilisanog kroz filter od 0,22 mikrona.

4.2.2.11. Tečna podloga za rast transformisane *P. pastoris* KM71H (BMGH)

U 900 mL destilovane vode rastvoreno je 13,6 g kalijum-dihidrogenfosfata, 3,4 g azotne baze kvasca bez amonijum sulfata i aminokiselina (YNB) i 10 g amonijum sulfata, pH se podešava na 6,0. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 100 mL 10% (v/v) glicerola prethodno sterilisanog i 2 mL 0,02% (w/v) biotina prethodno sterilisanog kroz filter od 0,22 mikrona.

4.2.2.12. Tečna podloga za indukciju ekspresije transformisane *P. pastoris* KM71H (BMMH)

U 990 mL destilovane vode rastvoreno je 13,6 g kalijum-dihidrogenfosfata, 3,4 g azotne baze kvasca bez amonijum sulfata i aminokiselina (YNB) i 10 g amonijum sulfata, pH se podešava na 6,0. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 10 mL 50% (v/v) metanola i 2 mL 0,02% (w/v) biotina prethodno sterilisanih kroz filter od 0,22 mikrona.

4.2.3. Pripremanje kompetentnih ćelija

4.2.3.1. Pripremanje hemijski kompetentnih ćelija *E. coli* DH5a

Sa LA agar ploče jedna kolonija *E. coli* je inokulirana u 10 mL LB tečne podloge i gajena u šejkeru (250 obrtaja/min) 8 h na 37°C. U 100 mL LB tečne podloge prebačeno je 1 mL kulture i ćelije su gajene u šejkeru (250 obrtaja/min) na 22°C preko noći i dok optička gustina na 600 nm nije dostigla vrednost 0,55. Kada su ćelije dostigle odgovarajuću optičku gustinu, prebačene su na led 10 minuta i potom centrifugirane 10 minuta na 3000 obrtaja/min na 4°C. Talog je resuspendovan u 40 mL sterilnog ledeno-hladnog Inoue pufera (55 mM mangan-hlorid, 15 mM kalcijum-hlorid, 250 mM kalijum-hlorid, 10 mM PIPES, pH 6,7). Ćelije su centrifugirane 10 minuta na 3000 obrtaja/min na 4°C, potom resuspendovane u 8 mL sterilnog ledeno-hladnog Inoue pufera. Dodato je 0,7 mL sterilnog DMSO i ćelije su ostavljene na ledu 10 minuta. Suspenzija ćelija je podeljena u alikvote po 100 µL i odmah zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80°C.

4.2.3.2. Pripremanje hemijski kompetentnih ćelija *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 i EBY100

Sa YPD agar ploče jedna kolonija *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 ili EBY100 je inokulirana u 2,5 mL 2xYPAD tečne podloge koja sadrži 12,5 µg/mL hloramfenikola i gajena u šejkeru (250 obrtaja/min) preko noći na 30°C. Prekonoćna kultura je prebačena u 50 mL 2xYPAD medijuma i izmerena optička gustina na 600 nm. Ćelije su gajene u šejkeru (250 obrtaja/min) na 30°C dok optička gustina nije dostigla vrednost 1 (oko 4h). Nakon što su ćelije dostigle odgovarajuću optičku gustinu, centrifugirane su 5 minuta na 3000 obrtaja/min. Ćelije su resuspendovane u 25 mL sterilne vode, i potom opet centrifugirane 5 minuta na 3000 obrtaja/min. Nakon toga ćelije su resuspendovane u 500 µL sterilne vode i centrifugirane 5 minuta na 6000

MATERIJAL I METODE

obrtaja/min. Finalno su ćelije resuspendovane u 500 μ L sterilnog FCC rastvora (5% glicerol, 10% DMSO), podeljene u alikvote po 50 μ L i zamrznute na -80°C .

4.2.3.3. Pripremanje elektro-kompetentnih ćelija *Pichia pastoris* KM71H

Sa YPD agar ploče jedna kolonija *Pichia pastoris* KM71H je inokulirana u 3 mL YPD tečne podloge koja sadrži 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hloramfenikola i gajena u šejkeru (250 obrtaja/min) preko noći na 30°C . Prebaciti 100 μ L prekonocne kulture u 50 mL YPD medijuma i opet gajiti preko noći na 30°C , 200 obrtaja/min dok optička gustina nije dostigla vrednost 1-1,5. Nakon što su ćelije dostigle odgovarajuću optičku gustinu, centrifugirane su 10 minuta na 3000 obrtaja/min. Ćelije su resuspendovane u 10 mL DTT/LiAc rastvora (100 mM litijum-acetat, 0,6 M sorbitol, 10 mM TRIS pH 7,5, 10 mM ditiotreitol (DTT, dodat nakon sterilizacije rastvora)), i inkubirane na sobnoj temperaturi 30 minuta uz blago mešanje. Ćelije su centrifugirane 5 minuta na 3000 obrtaja/min i potom resuspendovane u 1 mL ledenog 1 M sorbitola. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 3000 obrtaja/min ćelije su još dva puta isprane sa istom količinom ledenog sorbitola. Finalno su ćelije resuspendovane u 500 μ L ledenog 1 M sorbitola, dodato je 60 μ L 100% glicerola i podeljene u alikvote po 50 μ L i zamrznute na -80°C .

4.3. Molekularno-biološke metode

Reagensi korišćeni za kloniranje su naručeni od kompanije Thermo Fisher Scientific, SAD, osim ako nije drugačije naglašeno.

4.3.1. Kloniranje celobioza-dehidrogenaza gena u pYES2 vektor

4.3.1.1. Umnožavanje gena za celobioza-dehidrogenazu

Gen za celobioza-dehidrogenazu (CDH) umnožen je PCR reakcijom koristeći prajmere za kloniranje u pYES2 vektor iz priloga 1. Smeša za PCR reakciju sadrži sledeće komponente:

Komponenta	Zapremina	Finalna koncentracija
<i>MiliQ</i> voda	41,25 μ L	
10X pufer za <i>DreamTaq</i> polimerazu	5 μ L	1X
Smeša dezoksinukleotida-dNTP (10mM)	1 μ L	0,2 mM
<i>forward</i> prajmer (25 μ M)	1 μ L	0,5 μ M
<i>reverse</i> prajmer (25 μ M)	1 μ L	0,5 μ M
<i>DreamTaq</i> polimeraza (5 U/ μ L)	0,25 μ L	0,025 U/ μ L
Templat	0,5 μ L	0,5 ng/ μ L
<i>Ukupna zapremina</i>	50 μL	

Program za PCR reakciju:

Inicijalna denaturacija	94°C	4 min	
Denaturacija	94°C	1 min	← 30 ciklusa
<i>Annealing</i>	55°C	2,15 min	
Elongacija	72°C	1 min	
Terminalna elongacija	72°C	10 min	

MATERIJAL I METODE

PCR proizvodi su analizirani agaroznom DNK elektroforezom i prečišćeni *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* kitom (Macherey-Nagel, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

4.3.1.2. Dvostruka digestija restrikcijom enzimima

Prečišćeni PCR proizvod gena za celobioza-dehidrogenazu i pYES2 vektor podvrgnuti su dvostrukoj restrikciji sa *EcoRI* i *XbaI* restrikcijom enzimima. Smeša za dvostruku restrikciju sadrži sledeće komponente:

Komponenta	PCR proizvod	Vektor
10X Tango pufer	4 μ L	4 μ L
<i>EcoRI</i> restrikcioni enzim (10 U/μL)	2 μ L	2 μ L
<i>XbaI</i> restrikcioni enzim (10 U/μL)	1 μ L	1 μ L
Uzorak	10 μ L	10 μ L
MiliQ voda	3 μ L	3 μ L
Ukupna zapremina	20 μL	20 μL

Restrikcijona smeša je inkubirana 16 sati na 37°C. Nakon 16 sati reakcija je prekinuta inkubiranjem 20 minuta na 80°C. Digestovani PCR proizvod i vektor su analizirani agaroznom DNK elektroforezom i prečišćeni *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* kitom (Macherey-Nagel, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

4.3.1.3. Ligacija umnoženog gena i vektora

Digestovan PCR proizvod je ligan sa pYES2 vektorom pomoću T4 DNK ligaze. Ligaciona smeša sadrži sledeće komponente:

Komponenta	Zapremina
MiliQ voda	5,5 μ L
10X pufer za T4 DNK ligazu	2 μ L
Digestovan vektor	2 μ L
Digestovan PCR proizvod	10 μ L
T4 DNK ligaza (5 U/μL)	0,5 μ L
<i>Ukupna zapremina</i>	20 μL

Smeša je inkubirana 16 sati na 16°C. Nakon 16 sati reakcija je prekinuta inkubiranjem 5 minuta na 70°C. Sa 5 μ L ligacione smeše transformisane su kompetentne ćelije *E.coli*.

4.3.2. Pravljenje biblioteke celobioza-dehidrogenaze u pYES2 vektoru

Za pravljenje biblioteke celobioza-dehidrogenaze korišćeni su prajmeri iz priloga 1, koristeći mangan (Mn^{2+}) da se nasumično insertuju mutacije. PCR smeša sadrži iste komponente kao što je opisano u odeljku 3.3.1.1. sa dodatkom mangana u koncentraciji (0 – 0,1 mM) sa istim programom za PCR.

Nakon prečišćavanja, PCR proizvod je izložen dvostrukoj digestiji sa *EcoRI* i *XbaI* restrikcionim enzimima po protokolu opisanom u odeljku 3.3.1.2. Dvostruko digestovan PCR proizvod je ligiran sa dvostruko digestovanim pYES2 vektorom po protokolu opisanom u odeljku 3.3.1.3.

Pre transformacije bakterija PCR smeša je tretirana *DpnI* enzimom (New England Biolabs, Nemačka) 1,5 sat na 37°C i inaktivirana 15 minuta na 80°C. Nakon transformacije bakterija, svi transformanti biblioteke su spojeni i plazmidi izolovani zajedno. Sa izolovanim plazmidima su transformisane kompetentne *S.cerevisiae* InvSc1 ćelije koje su činile biblioteku.

4.3.3. Kloniranje celobioza-dehidrogenaznog gena u pCTCON2 vektor

4.3.3.1. Umnožavanje gena za celobioza-dehidrogenazu

Sintetički gen za divlji tip celobioza-dehidrogenaze umnožen je PCR reakcijom koristeći prajmere iz priloga 1, po protokolu iz odeljka 3.3.1.1 uz modifikaciju PCR programa gde je *annealing* temperatura bila 50°C i vreme elongacije 2, 45 minuta.

PCR proizvodi su analizirani agaroznom DNK elektroforezom i prečišćeni *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* kitom (Macherey-Nagel, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

4.3.3.2. Dvostruka digestija restrikcijom enzimima

Prečišćeni PCR proizvodi gena za celobioza-dehidrogenazu i pCTCON2 vektor podvrgnuti su dvostrukoj restrikciji sa *BamHI* i *NheI* restrikcijom enzimima. Smeša za dvostruku restrikciju sadrži sledeće komponente:

Komponenta	PCR proizvodi	Vektor
10X Tango pufer	2 µL	2 µL
<i>BamHI</i> restrikcioni enzim (10 U/µL)	1 µL	1 µL
<i>NheI</i> restrikcioni enzim (10 U/µL)	1 µL	1 µL
Uzorak	10 µL	10 µL
MiliQ voda	6 µL	6 µL
Ukupna zapremina	20 µL	20 µL

MATERIJAL I METODE

Restrikciona smeša je inkubirana 16 sati na 37°C. Nakon 16 sati reakcija je prekinuta inkubiranjem 20 minuta na 80°C. Digestovani PCR proizvodi i vektori su analizirani agaroznom DNK elektroforezom i prečišćeni *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* kitom (Macherey-Nagel, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

4.3.3.3. Ligacija umnoženog gena i vektora

Digestovan PCR proizvod je ligiran sa pCTCON2 vektorom pomoću T4 DNK ligaze. Ligaciona smeša sadrži sledeće komponente:

Komponenta	Zapremina
MiliQ voda	8 μ L
10X pufer za T4 DNK ligazu	2 μ L
Digestovan vektor (12 ng/μL)	5 μ L
Digestovan PCR proizvod (12 ng/μL)	5 μ L
T4 DNK ligaza (5 U/μL)	0,3 μ L
Ukupna zapremina	20 μL

Smeša je inkubirana 16 sati na 16°C. Nakon 16 sati reakcija je prekinuta inkubiranjem 5 minuta na 70°C. Sa 5 μ L ligacione smeše transformisane su kompetentne ćelije *E.coli*.

4.3.4. Pravljenje biblioteke celobioza-dehidrogenaze u pCTCON2 vektoru

Za pravljenje biblioteke celobioza-dehidrogenaze korišćeni su prajmeri iz priloga 1, koristeći mangan (Mn^{2+}) da se nasumično insertuju mutacije. PCR smeša sadrži iste komponente kao što je opisano u odeljku 3.3.2.1. sa dodatkom mangana u koncentraciji (0 – 0,1 mM) sa istim programom za PCR.

Nakon prečišćavanja, PCR proizvod je podvrgnut dvostrukoj digestiji sa *BamHI* i *NheI* restrikcionim enzimima po protokolu opisanom u odeljku 3.3.2.2. Dvostruko digestovan PCR proizvod je ligiran sa dvostruko digestovanim pYES2 vektorom po protokolu opisanom u odeljku 3.3.1.3.

Pre transformacije bakterija PCR smeša je tretirana *DpnI* enzimom (New England Biolabs, Nemačka) 1,5 sat na 37°C i inaktivirana 15 minuta na 80°C. Nakon transformacije bakterija, svi transformanti biblioteke su spojeni i plazmidi izolovani zajedno. Sa izolovanim plazmidom su transformisane kompetentne *S.cerevisiae* EBY100 ćelije koje su činile biblioteku.

4.3.5. Kloniranje celobioza-dehidrogenaznog gena u pPICZaA vektor

4.3.5.1. Umnožavanje gena za celobioza-dehidrogenazu

Sintetički gen za divlji tip celobioza-dehidrogenazu i mutanti (H5 sa mutacijama D20N, A64T, V529M, V22A, T99T, H9 sa mutacijama D20N, A64T, V529M, T84A, A261P, E674G, S715N, i D2 sa mutacijama D20N, A64T, V529M, Y173C) umnoženi su PCR reakcijom koristeći prajmere iz priloga 1, po protokolu iz odeljka 3.3.1.1 uz modifikaciju PCR programa gde je *annealing* temperatura bila 55°C i vreme elongacije 2,15 minuta.

PCR proizvodi su analizirani agaroznom DNK elektroforezom i prečišćeni *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* kitom (Macherey-Nagel, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

4.3.5.2. Dvostruka digestija restrikcijom enzimima

Prečišćeni PCR proizvodi gena za celobioza-dehidrogenazu (WT, tm) i pPICZ α A vektor podvrgnuti su dvostrukoj restrikciji sa *EcoRI* i *XbaI* restrikcijom enzimima. Smeša za dvostruku restrikciju sadrži sledeće komponente:

Komponenta	PCR proizvodi	Vektor
10X Tango pufer	2 μ L	2 μ L
<i>EcoI</i> restrikcioni enzim (10 U/μL)	2 μ L	2 μ L
<i>XbaI</i> restrikcioni enzim (10 U/μL)	1 μ L	1 μ L
Uzorak	10 μ L	10 μ L
MiliQ voda	5 μ L	5 μ L
Ukupna zapremina	20 μL	20 μL

Restrikcijom smeša je inkubirana 16 sati na 37°C. Nakon 16 sati reakcija je prekinuta inkubiranjem 20 minuta na 80°C. Digestovani PCR proizvodi i vektor su analizirani agaroznom DNK elektroforezom i prečišćeni *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* kitom (Macherey-Nagel, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

4.3.5.3. Ligacija umnoženog gena i vektora

Svaki digestovan PCR proizvod je ligiran sa pPICZ α A vektorom pomoću T4 DNK ligaze. Ligaciona smeša sadrži sledeće komponente:

MATERIJAL I METODE

Komponenta	Zapremina
MiliQ voda	7 μL
10X pufer za T4 DNK ligazu	2 μL
Digestovan vector	8 μL
Digestovan PCR proizvod	3 μL
T4 DNK ligaza (5 U/μL)	0,2 μL
Ukupna zapremina	20 μL

Smeša je inkubirana 16 sati na 16°C. Nakon 16 sati reakcija je prekinuta inkubiranjem 5 minuta na 70°C. Sa 5 μL ligacione smeše transformisane su kompetentne ćelije *E.coli*.

4.3.6. Transformacija kompetentnih *E.coli* ćelija

Kompetentne *E.coli* ćelije su nakon vađenja iz zamrzivača stavljene na led. U njih je dodata ligaciona smeša ili rastvor plazmida i ostavljene su na ledu 30 minuta. Nakon 30 minuta transformaciona smeša je izložena toplotnom šoku 45 sekundi na 42°C, i odmah nakon toga stavljena na led 2 minuta. U transformisane ćelije dodato je 1 mL SOC podloge i inkubirane su 1 h na 37°C. Posle inkubacije 100 μL transformisanih ćelija je zasejano na LA agar podlogu sa odgovarajućim antibiotikom. LA podloge su inkubirane preko noći na 37°C.

4.3.7. Izolovanje plazmida

4.3.7.1. Izolovanje plazmida iz bakterija

Kolonija sa LA čvrste podloge sa odgovarajućim antibiotikom je inokulisana u 5 mL LB tečne podloge sa odgovarajućim antibiotikom i gajena u šejkeru (250 obrtaja/min) na 37°C preko noći. Prekonoćna kultura je prebačena

MATERIJAL I METODE

u ependorf od 1,5 mL i centrifugirana 1 minut na 13000 obrtaja/min. Supernatant je odbačen a ćelije resuspendovane u 150 μ L hladnog rastvora GTE+ (25 mM TRIS, 10 mM EDTA, 50 mM glukoza, 100 μ g/mL ribonukleaze, pH 8,0). Potom je dodato 300 μ L svežeg P2 rastvora (200 mM NaOH, 1% SDS) i polako mešano dok se sadržaj nije izbistrio. Zatim je dodato 450 μ L hladnog kalijum-acetatnog rastvora (4 M CH₃COOK, pH 6,3) i polako promešano izvrtnjem ependorfa nekoliko puta. Suspenzija je centrifugirana 4 minuta na 13000 obrtaja/min. Supernatant je prebačen u novi ependorf i njemu je dodato 400 μ L izopropanola. Sadržaj je promešan nekoliko puta i centrifugiran 4 minuta na 13000 obrtaja/min. Supernatant je odbačen a talogu je dodat 1 mL ledeno hladnog 75% etanola. Rastvor je centrifugiran 2 minuta na 13000 obrtaja/min. Supernatant je odbačen a talog (plazmidna DNK) je osušen u vakuum uparivaču.

4.3.7.2. Izolovanje plazmida iz kvasaca

Kolonija sa YNB-CAA+Glc čvrste podloge je inokulisana u 3 mL YNB-CAA+Glc tečne podloge i gajena 2 dana u šejkeru (250 obrtaja/min) na 30°C. Ćelije su centrifugirane, isprane 3 puta sa 1 mL pufera za liziranje (10 mM EDTA, 0,5% β -merkaptioetanol) i na kraju suspendovane u 30 μ L istog pufera. Suspenziji ćelija je dodato 10 μ L litikaze 5 U/ μ L, i inkubirane su 1,5 sat na 37°C. Nakon toga je plazmid izolovan sa *NucleoSpin Plasmid* kitom (Macherey-Nagel, Nemačka) po uputstvu proizvođača za *low-copy* plazmide.

4.3.8. Analiza plazmida izolovanih iz bakterija

Veličina plazmida je proverena restrikcijom sa *EcoRI* restrikcionim enzimom i potom agaroznom DNK elektroforezom. Restrikciona smeša sadrži sledeće komponente:

Komponenta	Zapremina
<i>MiliQ</i> voda	5 μ L
Plazmid	4 μ L
10X pufer za <i>EcoRI</i>	1 μ L
<i>EcoRI</i> (10 IU/ μ L)	0,5 μ L
<i>Ukupna zapremina</i>	10 μL

Smeša je inkubirana 3 h na 37°C. Nakon 3 h reakcija je prekinuta inkubiranjem 20 minuta na 60°C. Digestovani plazmid je analiziran agaroznom DNK elektroforezom.

4.4. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze u vanćelijski prostor

4.4.1. Transformacija *S. cerevisiae* InvSc1

Kompetentne ćelije kvasca *S. cerevisiae* InvSc1 su odmrznute i centrifugirane 2 minuta na 13000 obrtaja/min. Nakon odbacivanja supernatanta ćelijama je dodato 260 μ L 50% rastvora PEG3350, 36 μ L 1M litijum-acetata, 50 μ L prokuvane jednolančane DNK (2 mg/mL), 14 μ L plazmidne DNK (pYES2 sa ili bez ukloniranog gena za celobioza-dehidrogenazu). Suspenzija ćelija je dobro promešana na vorteksu i inkubirana 1 sat na 42°C. Nakon inkubacije ćelijama je dodat 1 mL YNB-CAA+Glc tečnog medijuma sa dodatim adeninom i

MATERIJAL I METODE

triptofanom, i 200 μ L ćelija je zasejano na YNB-CAA+Glc agar ploču sa dodatim adeninom i triptofanom. Ćelije su inkubirane 2 dana na 30°C.

4.4.2. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze u S. cerevisiae InvSc1 u mikrotitar ploči

Sa YNB-CAA+Glc+adenin+triptofan agar ploče kolonije transformisanog kvasca *S. cerevisiae* InvSc1 su presejane u bunare mikrotitar ploče (F tipa) koji sadrže 150 μ L YNB-CAA+Glc+adenin+triptofan tečnog medijuma sa hloramfenikolom i gajene 2 dana na 30°C 700 obrtaja/min u eliza šejkeru PST-60HL (Biosan, Riga, Letonija). Iz saturacione kulture 5 μ L je prebačeno u bunare nove mikrotitar ploče koji sadrže 30 μ L YNB-CAA+Glc+adenin+triptofan tečnog medijuma, i ćelije su gajene pod istim uslovima još 24 sata. Ekspresija gena je indukovana dodavanjem 80 μ L YNB-CAA+Gal+adenin+triptofan tečnog medijuma, i gajenjem ćelija pod istim uslovima u narednih 16 sati. Nakon šesneastočasovne indukcije, merena je aktivnost celobioza-dehidrogenaze u supernatantu. Svaka mikrotitar ploča je imala zasejanih 5 kolonija kvasca koje eksprimiraju wtCDH zbog standardizacije merenja.

4.4.3. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze u S. cerevisiae InvSc1 u većoj zapremini

Sa YNB-CAA+Glc+adenin+triptofan agar ploče kolonije transformisanog kvasca *S. cerevisiae* InvSc1 su presejane u erlenmajere koji sadrže 25 mL YNB-CAA+Glc+adenin+triptofan tečnog medijuma sa hloramfenikolom i gajene 2 dana na 30°C 250 obrtaja/min u šejkeru. Prebačeno je 25 mL saturacione kulture u erlenmajere od 1 L koji sadrže 225 mL YNB-CAA+Glc+adenin+triptofan tečnog medijuma, i ćelije su gajene pod istim uslovima još 24 sata. Ekspresija gena je indukovana razblaživanjem ćelija do 0,4

OD_{600nm} sa YNB-CAA+Gal+adenin+triptofan tečnim medijumom, i gajenjem ćelija pod istim uslovima u narednih 16 sati. Nakon šesneastočasovne indukcije, merena je aktivnost celobioza-dehidrogenaze u supernatantu.

4.4.4. Prečišćavanje celobioza-dehidrogenaze iz ekstracelularne tečnosti

Nakon fermentacije, ćelije su centrifugirane 30 minuta na 3000 obrtaja/min. Supernatant je koncentrovan do 30 mL (30 puta koncentrovan) koristeći *Viva Flow 50* sistem sa ultrafiltracionom membranom od 50 kDa *cut-off* (Sartorius, Nemačka).

Koncentrovan uzorak je dijalizovan naspram 10 mM Na₂HPO₄ pufera pH 6, pre nanošenja na jonoizmenjivačku kolonu koja je ekvilibrisana istim puferom. Korišćena je HPLC kolona *HiTrap DEAE fast flow* od 5 mL (GE Healthcare, Nemačka) na AKTApurifier mašini (GE Healthcare, Nemačka). Celobioza-dehidrogenaza je eluirana linearnim gradijentom od 0 do 500 mM natrijum-hlorida u 10 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 6,0 sa 10 zapremina kolone u frakcijama od 1 mL pri protoku od 0,5 mL/min. Frakcije koje su pokazale celobioza-dehidrogenaznu aktivnost su spojene.

Da bi se u potpunosti prečistio protein rađena je hromatografija na koju su nanošene spojene frakcije sa prethodne hromatografije. Hromatografija je rađena kao što je prethodno opisano. U svakom koraku prečišćavanja određivani su aktivnost celobioza-dehidrogenaze i koncentracija proteina, a stepen prečišćenosti je analiziran SDS poliakrilamidnom elektroforezom.

4.5. Ekspresija enzima na površini ćelija kvasca

4.5.1. Transformacija *S. cerevisiae* EBY100

Kompetentne ćelije kvasca *S. cerevisiae* EBY100 su odmrznute i centrifugirane 2 minuta na 13000 obrtaja/min. Nakon odbacivanja supernatanta ćelijama je dodato 260 μ L 50% rastvora PEG3350, 36 μ L 1M litijum-acetata, 50 μ L prokuvane jednolančane DNK (2 mg/mL), 14 μ L plazmidne DNK (pCTCON2 sa ili bez ukloniranog gena za glukoza-oksidazu ili celobioza-dehidrogenazu). Suspenzija ćelija je dobro promešana na vorteksu i inkubirana 1 sat na 42°C. Nakon inkubacije ćelijama je dodat 1 mL YNB-CAA+Glc+adenin tečnog medijuma, i 200 μ L ćelija je zasejano na YNB-CAA+Glc+adenin agar ploču. Ćelije su inkubirane 2 dana na 30°C.

4.5.2. Testiranje sistema ekspresije oksidoreduktaznih enzima sa glukoza-oksidadom

4.5.2.1. Kloniranje glukoza-oksidadnog gena u pCTCON2 vektor

Sintetički gen za divlji tip glukoza-oksidade i B11 mutant (dobijen eksperimentima dirigovane evolucije) su dobijeni od profesora Fišera [172]. Geni su umnoženi PCR metodom koristeći prajmere pomenute u prilogu 1 i dvostruko digestovani sa enzimima *Bam*HI i *Nhe*I i uklonirani u pCTCON2 vektor koji je linearizovan sa istim enzimima. Uklonirani geni su umnoženi u bakteriji *E. coli* i iskorišćeni da transformišu EBY100 soj kvasca, opisano u prethodnom paragrafu.

4.5.2.2. Ekspresija glukoza-oksidade i skidanje enzima da ćelijskog zida

Fermentacija je odrađena u YNB-CAA tečnoj podlozi, prvo su ćelije porasle u glukoznoj podlozi i posle je indukovana ekspresija sa dodatkom

MATERIJAL I METODE

podloge YNB-CAA sa galaktozom. Posle šesnaestočasovne indukcije su ćelije odvojene centrifugiranjem (3000 g, 5 minuta) i resuspendovane u 10 mL 0,1 M natrijum acetatnog pufera (pH 5,5) u kom je dodat 1 mM 2-merkaptotanol. Suspenzija je inkubirana na 4°C u toku 4 sata sa merenjem relativne promene koncentracije proteina Bradfordovom metodom. Ćelije su odvojene nakon inkubacije centrifugiranjem na 3000 rpm u toku 10 minuta. Supernatant je dijalizovan naspram destilovane vode, pa posle naspram 10 mM natrijum fosfatnog pufera pH 6,0.

4.5.2.3. Prečišćavanje i karakterizacija glukoza-oksidade

Ovako dijalizovan uzorak je nanet na jonoizmenjivačku kolonu, HPLC HiTrap DEAE fast flow veličine 5 mL. Glukoza-oksidaza je eluirana linearnim gradijentom od 10 mM do 0,5 M natrijum fosfatnog pufera pH 6,0.

Potom su karakterisani enzimi, merenjem aktivnosti u rastvoru koji sadrži 333 µL 1 M glukoze, 50 µL 20 mM ABTS, 10 µL 100 IU/mL peroksidaze, 597 µL 0,1 M natrijum acetatnog pufera pH 5,5 i 10 µL uzorka merenjem apsorbanije na 405 nm. 1 IU jedinica GOx predstavlja onu količinu enzima koja za 1 minut proizvede 1 µmol vodonik peroksida. Vodonik peroksid se određuje preko koncentracije oksidovanog ABTS-a čiji je ekstinkcioni koeficijent na 405nm 36,8 cm²/µmol.

4.5.3. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze u S. cerevisiae EBY100 u mikrotitar ploči

Sa YNB-CAA+Glc+adenin agar ploče kolonije transformisanog kvasca *S.cerevisiae* EBY100 su presejane u bunare mikrotitar ploče (F tipa) koji sadrže 150 µL YNB-CAA+Glc+adenin tečnog medijuma sa hloramfenikolom i gajene 2 dana na 30°C 700 obrtaja/min u eliza sejkeru PST-60HL (Biosan, Riga, Letonija).

MATERIJAL I METODE

Iz saturacione kulture 5 μL je prebačeno u bunare nove mikrotitar ploče koji sadrže 30 μL YNB-CAA+Glc+adenin tečnog medijuma, i ćelije su gajene pod istim uslovima još 24 sata. Ekspresija gena je indukovana dodavanjem 80 μL YNB-CAA+Gal+adenin tečnog medijuma, i gajenjem ćelija na 25°C u narednih 24 - 36 sati. Nakon dvadesetčetvoročasovne indukcije, merena je aktivnost celobioza-dehidrogenaze u ćelijskoj suspenziji. Svaka mikrotitar ploča je imala zasejanih 5 kolonija kvasca koje eksprimiraju tmCDH (dobijen od doktorand Ana Marije Balaž) (koji je korišćen kao roditeljski gen za pravljenje biblioteke) zbog standardizacije merenja.

4.6. Razvoj fluorescentnog eseja

Fluorescentni esej je optimizovan u kiveti zapremine 1,4 mL (Hellma fluorescence cuvette), mereno na FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Kjoto, Japan) u finalnoj reakcionoj zapremini od 1 mL. Fluorescentni esej za ćelije je meren u crnim pločama, ravnog dna, sa 96 bunara (FLUOROTRAC 600, Greiner Bio One GmbH) na fluorimetru Tecan Infinity 200 pro (Mannedorf, Switzerland) u finalnoj zapremini od 200 μL .

4.6.1. Osnova fluorescentnog eseja

Resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-one-10-oksid natrijum so) 100 μL za kivetu i 20 μL za MTP-u (finalna koncentracija 0,1 mM), 100 μL za kivetu i 20 μL za MTP (finalne koncentracije 10 mM) laktoze u 790 μL za kivetu i 150 μL za MTP-u 0,1 M natrij fosfatnom puferu pH 5,5 su korišćeni za merenje u kiveti ili mikrotitar pločama ukoliko nije drugačije naznačeno. Talasna dužina ekscitacije (ex) (λ_{ex}) je 540 nm i talasna dužina emisije (em) (λ_{em}) na kojoj je esej meren jeste 590 nm. Esej je meren u toku 10 minuta.

4.6.1.1. Uticaj pH na fluorescentni esej

Različiti puferi pH vrednosti od pH 3 do pH 7 su napravljeni po protokolu McIlvaine gde se mešaju limunska kiselina i di-natrijum hidrogen fosfat, koji je poznat kao citrat-fosfatni pufer. Esej je meren u puferima pH vrednosti od pH 3 do pH 7, po protokolu opisanom u prethodnom odeljku.

4.6.1.2. Uticaj koncentracije boje

Boja resazurin, finalne koncentracije od 0,01 mM do 1 mM je korišćena u esejima da bi se dobila optimalna koncentracija koja će se koristiti u daljim eksperimentima. Koncentracija supstrata i pH pufera su napisani u prethodnom odeljku.

4.6.1.3. Uticaj koncentracije supstrata

Laktoza i celobioza su supstrati korišćeni za razvoj fluorescentnog esejima. Koncentracija laktoze je varirana od 0,1 mM do 30 mM. Koncentracija celobioze je varirana od 0,001 mM do 0,1 mM.

4.6.1.4. Uticaj koncentracije enzima

Različite koncentracije celobioza-dehidrogenaze su dodavani u smešu esejima od 0,1 IU/mL do 0,45 IU/mL i fluorescentni odgovor je praćen. Ostale komponente esejima su prethodno opisane.

4.6.2. Optimizacija resazurinskog eseja sa CBDH eksprimiranog na površini ćelija kvasca

Tokom kloniranja, u pCTCON2 vektoru je dobijen trostruki mutant sa mutacijama D20N, A64T i V592M koji je pokazao aktivnost na površini ćelija kvasca (tmCBDH).

4.6.2.1. Uticaj koncentracije supstrata

Laktoza i celobioza su supstrati korišćeni za razvoj fluorescentnog eseja. Koncentracija laktoze je varirana od 0,1 mM do 30 mM. Koncentracija celobioze je varirana od 0,001 mM do 0,1 mM. Ćelije su bile finalne koncentracije 0,1 OD_{600nm}.

4.6.2.2. Uticaj gustine ćelija kvasca

Optimizovani uslovi reakcije su testirani sa ćelijama kvasca *S.cerevisiae* EBY100 koje eksprimiraju tmCBDH ili prazan vektor, kao negativna kontrola. Različite količine ćelija su dodavane tako da u finalnoj koncentraciji u eseju bude 0,1, 0,2 i 0,4 OD_{600nm} (odnosno $1,28 \times 10^6$; $2,55 \times 10^6$ i $5,3 \times 10^6$ ćelija).

4.6.3. Optimizacija fluorescentnog resazurinskog eseja u MTP

Kao što je prethodno opisano ćelije kvasca EBY100 koje eksprimiraju trostruki mutant celobioza-dehidrogenaze su gajene u MTP pločama. Ćelije su korišćene za merenje fluorescencije sa 0,1 mM resazurinom, 30 mM laktozom u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu pH 5,5 tokom 30 minuta.

4.6.4. Skeniranje biblioteke

Biblioteka gena uklonirana u kvasac *S.cerevisiae* EBY100 je korišćena kao osnova za skeniranje mutanata. Esej je sadržao sve komponente prethodno opisane samo su ćelije iz bunara bili potencijalni mutanti.

4.6.5. Kinetička karakterizacija CBDH mutanata na površini ćelija kvasca

Izabrani mutanti su kinetički okarakterisani u imobilizovanoj formi na površini ćelija kvasca. Koncentracija laktoze je varirana od 0,1 mM do 30 mM. Koncentracija celobioze je varirana od 0,001 mM do 0,1 mM. Ostali sastojci eseja su već opisani.

4.7. Ekspresija i prečišćavanje celobioza-dehidrogenaze

4.7.1. Transformacija *P. pastoris* KM71H

Plazmidi koji sadrže gen za celobioza-dehidrogenazu su linerizovani pomoću *PmeI* (Thermo Fisher Scientific, SAD) restrikcionog enzima. Restrikciona smeša sadrži sledeće komponente:

Komponenta	Zapremina
MiliQ voda	7 μ L
Linearizovani plazmid	10 μ L
10X B puffer	2 μ L
<i>PmeI</i> (5 U/μL)	1 μ L
Ukupna zapremina	20 μL

Restrikciona smeša je inkubirana 16 h na 37°C. Nakon 16 h reakcija je prekinuta inkubiranjem 20 minuta na 80°C. Linearizovani plazmidi su

MATERIJAL I METODE

prečišćeni *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* kitom (Macherey-Nagel, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

Kompetentne ćelije *P. pastoris* KM71H su pomešane sa 10 μ L linearizovanog plazmida. Sadržaj je prebačen u prethodno ohlađenu elektroporacionu kivetu (BioRad, Kalifornija, SAD) i ostavljen na ledu 5 minuta. Ćelije su transformisane elektroporacijom u elektroporatoru (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) na 2500 V. Odmah nakon elektroporacije u ćelije je dodat 1 mL ledeno hladnog 1 M sorbitola. Ćelije su prvo inkubirane 1h na 30°C bez mućkanja, a potom je dodato 2 mL YPD medijuma i ćelije su gajene 3 sata na 30°C uz mućkanje od 250 obrtaja/min. Ćelije su centrifugirane 5 minuta na 3000 obrtaja/min, resuspendovane u 200 μ L YPD medijuma, zasejane na YPD ploču sa 100 μ g/mL zeocina i gajene 3 dana u inkubatoru na 30°C.

4.7.2. Ekspresija celobioza-dehidrogenaze

Sa YPD zeocinske agar ploče jedna kolonija transformisane *P. pastoris* KM71H je inokulisana u 20 mL BMGY medijuma i gajena 24 sata na 30°C, 200 obrtaja/min. Po 10 mL inicijalne kulture je prebačeno u 2 erlenmajera koji su sadržali 1000 mL BMGY medijuma i ćelije su gajene pod istim uslovima još 24 sata, OD_{600nm} bi trebao biti između 2-6. Ćelije su centrifugirane 15 minuta na 3000 obrtaja/min, i nakon toga resuspendovane u BMMY medijumu tako da se ćelije koncentruju pet puta i gajene pod istim uslovima narednih 7 dana. Svakog dana, 50% metanol je dodavan ćelijama tako da finalna koncentracija metanola bude 0,5%.

4.7.3. Prečišćavanje celobioza-dehidrogenaze

Nakon fermentacije, ćelije su centrifugirane 30 minuta na 3000 obrtaja/min. Supernatant je filtriran kroz 0,22 μ m PTFE filter (Karl Rot,

MATERIJAL I METODE

Nemačka) i filtrat je skoncentrovan do 10 mL koristeći *Viva Flow 50* sistem sa ultrafiltracionom membranom od 50 kDa *cut-off* (Sartorius, Nemačka).

Skoncentrovan uzorak je dijalizovan naspram 10 mM Na₂HPO₄ pufera pH 6, pre nanošenja na jonoizmenjivačku kolonu koja je ekvilibrisana istim puferom. Korišćena je HPLC kolona *HiTrap DEAE fast flow* od 5 mL (GE Healthcare, Nemačka) na AKTApurifier mašini (GE Healthcare, Nemačka). Celobioza-dehidrogenaza je eluirana linearnim gradijentom od 0 do 500 mM natrijum-hlorida u 10 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 6,0 sa 10 zapremina kolone u frakcijama od 1 mL pri protoku od 0,5 mL/min. Frakcije koje su pokazale celobioza-dehidrogenaznu aktivnost su spojene.

Spojene frakcije sa celobioza-dehidrogenaznom aktivnošću su dijalizovane naspram 10 mM Na₂HPO₄ puferom koji sadrži 0,1 M NaCl, pre nanošenja na gel hromatografsku kolonu koja je ekvilibrisana istim puferom. Korišćena je HPLC kolona *Toyopearl HF55 gel exclusion* od 80 mL (GE Healthcare, Nemačka) na AKTApurifier mašini (GE Healthcare, Nemačka). Enzim je eluiran istim puferom sa dve zapremine kolone u frakcijama od 1 mL pri protoku od 0,2 mL/min. Prečišćene frakcije sa pokazanom enzimskom aktivnošću su spojene i uskladištene na -20 °C.

U svakom koraku prečišćavanja određivani su aktivnost celobioza-dehidrogenaze i koncentracija proteina, a stepen prečišćenosti je analiziran SDS poliakrilamidnom elektroforezom.

4.8. Karakterizacija celobioza-dehidrogenaze

4.8.1. Određivanje aktivnosti celobioza-dehidrogenaze

U bunar mikrotitar pločice koja ima 180 µL rastvora koji sadrži 30 mM laktozu, 0,3 mM dihlorfenolindolfenol (DCIP) u 0,1 M natrijum acetatnom

puferu pH 4,5, doda se 20 μL uzorka merena je promena apsorbance u vremenu na 540 nm na eliza čitaču LKB 5060-006 (Beč, Austrija).

Za izračunavanje aktivnosti CDH jedino je korišćen linearni opseg nagiba. Jedna IU jedinica celobioza-dehidrogenazne aktivnosti predstavlja onu količinu enzima koja za 1 minut redukuje 1 μmol DCIP a pod gore pomenutim reakcionim uslovima. Količina proizvoda reakcije se određuje preko koncentracije redukovano DCIP-a čiji ekstinkcioni koeficijent na 540 nm iznosi $6,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [47].

4.8.2. Određivanje kinetičkih parametara celobioza-dehidrogenaze

Kinetički parametri celobioza-dehidrogenaze su određivani u finalno prečišćenom uzorku celobioza-dehidrogenaze, merenjem početne brzine reakcije na prethodno opisan način za koncentracije laktoze u rasponu od 0,4 do 20 mM, koristeći 100 mM natrijum-acetatni pufer pH 4,5. Dobijeni eksperimentalni podaci su fitovani u Mihaelis-Menten hiperbolu (OriginLab 8,0).

4.8.3. Određivanje termalne stabilnosti celobioza-dehidrogenaze

Termalna stabilnost celobioza-dehidrogenaze je određivana inkubiranjem rastvora enzima ($\sim 0,01 \text{ mg/mL}$) u 100 mM natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 na 60°C . Nakon određenih vremenskih intervala inkubacije, rastvor enzima je hlađen u ledu i rezidualna aktivnost celobioza-dehidrogenaze je merena na sobnoj temperaturi. Napravljen je grafik procenata rezidualne aktivnosti $A(t)$ u različitim vremenskim tačkama, i fitovan u eksponencijalnu jednačinu $A(t) = e^{-K_d t}$ da bi se odredila konstanta inaktivacije K_d . Polu-vreme termalne inaktivacije je izračunato pretpostavljajući da je vrednost $A(t)$ 0,5.

MATERIJAL I METODE

Merenje termalne stabilnosti je takođe rađeno i inkubiranjem rastvora enzima (~0,01 mg/mL) u 100 mM natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 na različitim temperaturama 10 minuta. Nakon inkubacije, rastvor enzima je hlađen u ledu i rezidualna aktivnost celobioza-dehidrogenaze je merena na sobnoj temperaturi.

4.8.4. Određivanje šećerne specifičnosti celobioza-dehidrogenaze

Merenje aktivnosti celobioza-dehidrogenaze sa drugim šećerima rađena je koristeći 100 mM natrijum-acetatni pufer pH 4,5. Kao supstrati korišćeni su celobioza, manoza i maltoza u različitim koncentracijama.

4.8.5. pH optimum

McIlvaine pufer [173] je korišćen za merenje pH optimuma. Aktivnosti prečišćenih enzima su merene na različitim pH vrednostima. Enzim je pokazao aktivnost u širokom opsegu pH vrednosti sa DCIP-om kao elektron primaocem. Korišćeni su različiti ekstinkcioni koeficijenti za različite pH vrednosti, zbog spektralnih karakteristika DCIP-a koji je pH zavisian: pH 2,0 - 4,5 ($6,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); pH 5,0 ($6,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); pH 5,5 ($8,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); pH 6,0 ($12,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); pH 6,5 ($15,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); pH 7,0 ($16,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); and pH 7,5 - 9,0 ($17,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [61].

4.8.6. Temperaturni optimum

Prečišćeni enzim je inkubiran na temperaturama od sobne do 90 °C u toku 15 minuta. Posle inkubacije alikvot je stavljen na led da se ohladi i posle su svi alikvoti mereni sa DCIP esejom.

4.8.7. *Proizvodnja peroksida*

Proizvodnja peroksida je merena sa modifikovanim ABTS esejom [174]. Reakciona smeša (50 μ L) sadrži 60 mM celobiozu u 100 mM natrijum acetatnom puferu pH 5,5 je pomešana sa 50 mL uzorka za proizvodnju peroksida. Reakcija je inkubirana na 30 °C u toku 4 h pre nego što se CDH inaktivira kuvanjem na 90 °C u toku 10 minuta. Ovo kuvanje ne utiče na koncentraciju peroksida. Dodatak 100 μ L smeše ABTS-a koja sadrži 2 mM ABTS i 5,7 IU/mL peroksida u 100 mM natrijum acetatnom puferu pH 5,5 počinje kolorimetrijsku reakciju. Povećanje apsorbance je praćeno na mikrotitar spektrofotometru na sobnoj temperaturi u toku 5 minuta. Stehiometrija ove reakcije je 2 jer se na 1 mol peroksida formiraju 2 mola zelenog ABTS katijon radikala. Enzimaska aktivnost je data u jedinicama (IU) koje odgovara proizvodnji 1 μ mola celobionske kiseline ili 1 μ mola peroksida po minuti reakcije.

4.8.8. *Strukturne analize*

Moguća N-glikozilaciona mesta su predviđena koristeći NetNGlc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), dok su O-glikozilaciona mesta predviđena koristeći NetOGlyc 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-3.1/>). Razdaljine mutiranih ostataka od aktivnog mesta i glikozilacionih mesta unutar svakog domena su izračunati koristeći UCSF Chimera softverom i objavljenim kristalnim strukturama u UniProt bazi podataka za hem (1D7C) [52] i flavin domena (1NAA) [60] CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* (Slika 16.). Za višestruko poravnanje 28 CDH sekvenci NCBI COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?CMD=Web>) server je korišćen (Prilog 2).

4.9. Analitičke metode

4.9.1. *Određivanje kolonija kvasaca koje eksprimiraju celobioza-dehidrogenazu*

Pojedinačne kolonije transformisanih kvasaca su presejane sa YNB-CAA+Glc agarozne ploče na YNB-CAA+Gal agaroznu ploču i gajene 24 sata na 27°C. Preko poraslih ćelija je preliven 1% agarozni medijum koji sadrži 30 mM laktozu, 0,3 mM DCIP, 0,1 M natrijum fosfatni pufer pH 4,5. Nakon 30 minuta, obezbojenje oko poraslih kolonija je naznaka aktivnosti celobioza-dehidrogenaze.

4.9.2. *Određivanje koncentracije proteina Bredfordovom metodom*

Bredfordov reagens se priprema tako što se 250 mg boje CBB G-250 prvo rastvori u 50 mL 95% etanola, zatim se doda 100 mL 96% fosforne kiseline i destilovana voda do 200 mL. Pre upotrebe boja se razblaži vodom 5 puta, i filtrira kroz filter papir dok se ne izgubi plava boja.

U 200 μ L Bredfordovog reagensa se doda 20 μ L uzorka (za mikro esej), odnosno 5 μ L uzorka (za makro esej) i nakon 5 minuta se meri apsorbanca na 620 nm na eliza čitaču LKB 5060-006 (LKB, Beč, Austrija). Za konstruisanje kalibracione prave koristi se rastvor BSA u rasponu od 0,1-1 mg/mL za makro metodu, odnosno 0,01-0,1 mg/mL za mikro metodu.

4.9.3. *Određivanje koncentracije proteina spektroskopskom metodom*

Koncentracija čistog proteina određivana je spektroskopskom metodom. ApSORBANCA je merena u standardnoj kvarcnoj kivetu na 280 nm, koristeći WPA Lightwave S2000 UV/VIS spektrofotometar. Koncentracija je izračunata

koristeći objavljen molarni ekstinkcioni koeficijent za CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* na 280nm koji iznosi $\epsilon_{280nm}=217 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [175].

4.9.4. Određivanje koncentracije proteina po Lowry-ju

Posle prečišćavanja, koncentracija rekombinantne GOx je merena po Lowry metodi. Princip Lowry-jeve metode određivanja koncentracije proteina leži u reaktivnosti azota iz peptidne veze sa jonima Cu [II] jona pod alkalnim uslovima. Prateća redukcija Folin-Ciocalteay fosfomolibdensko-fosfovolframove kiseline do heteropolimolibdensko plave, katalizovane Cu, od strane oksidacije aromatičnih kiselina. Lowry metod je osetljiv na promene pH, pa zbog toga pH rastvora treba biti održavana na 10-10,5 pH vrednosti.

Glavna mana Lowry metoda je uzak pH opseg u kom je moguće tačno merenje koncentracije proteina. Koriste se male zapremine uzorka koje imaju minimalan uticaj na pH reakcione smeše.

Reagens A: 20% NaCO_3 u 0,1 M NaOH

Reagens B: 0,5% $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ u 1% $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (natrijum citrat)

Reagens C: 50 mL A + 1 mL B

Reagens D: Folin-Ciocalteu-ov reagens, 2x (1+1) razblažen destilovanom vodom.

Postupak:

U bunar mikrotitar pločice odmeri se 20 μL uzorka, pomeša sa 100 μL reagensa C i ostavi na sobnoj temperaturi 10-15 minuta. Nakon toga, doda se 10 μL reagensa D i ostavi na sobnoj temperaturi 30 minuta. Razvijena boja je izmerena na 670 nm na LKB 5060-006 Micro plate reader-u. Osetljivost metode je 5-100 $\mu\text{g/mL}$.

4.9.5. Agarozna DNK elektroforeza

U kadu za elektroforezu izlivena je 0,8% agarozna u TBE puferu (89 mM TRIS, 89 mM borna kiselina, 20 mM EDTA, pH 8,0). U bunare gela nanošeno je 4 μ L uzorka DNK pomešanog sa 1 μ L komercijalne boje. Marker za DNK elektroforezu 1 kb Gene Ruler (Thermo Fisher Scientific, SAD) su nanošeni u količini od 2 μ L. Elektroforeza ide pod naponom od 80 V dok boja ne dođe do kraja gela. Nakon završene elektroforeze gel je potopljen 5 minuta u rastvor etidijum-bromida koncentracije 0,5 μ g/mL i snimljen pod UV lampom.

4.9.6. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Za analizu celobioza-dehidrogenaze korišćena je reduktivna poliakrilamidna gel elektroforeza. U radu je upotrebljavan 10% gel za razdvajanje i 4% za koncentrovanje. Gelovi sadrže sledeće komponente:

MATERIJAL I METODE

Rastvori	10% gel za razdvajanje	4% gel za koncentrovanje
Monomerni rastvor akrilamida (30% T, 2,7% C)	3,33 mL	0,50 mL
1,5 M TRIS pH 8,8	2,50 mL	/
0,5 M TRIS pH 6,8	/	0,94 mL
Voda	4,00 mL	2,25 mL
10% SDS	0,10 mL	38 μ L
TEMED	4 μ L	2 μ L
10% amonijum persulfat (APS)	50 μ L	25 μ L
<i>Ukupna zapremina</i>	10 mL	4 mL

Odmah nakon dodavanja APS-a u gel za razdvajanje, rastvor se sipa između dve staklene ploče (20 x 10 x 0,1 cm) i nadslojava rastvorom n-butanola zasićenog vodom. Nakon polimerizacije površina donjeg gela se ispira vodom i naliva se gel za koncentrovanje u koji se uranja česalj u cilju formiranja bunara za nanošenje uzoraka.

Uzorci za SDS elektroforezu su mešani sa puferom za pripremu uzoraka (60 mM TRIS pH 6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM β -merkaptotanol, 0,1% brom fenol plavo) u odnosu 1:4. Rezultujući rastvor je kuvan 5 minuta na 95°C i nakon hlađenja nanošen u bunare polimerizovanog gela za elektroforezu. Proteinski markeri za elektroforezu (Thermo Fisher Scientific, SAD) su nanošeni u količini od 5 μ L. Elektroforeza je radjena 2 h pri konstantnom naponu od 150 V u kadi sa puferom za elektroforezu (0,025 M TRIS pH 8,3, 0,192 M glicin, 0,1% SDS).

Elektroforeza je prekidana kada boja brom fenol plavo dođe do ivice gela. Gel je fiksiran i bojen rastvorom CBB (*comassie brilliant blue*) G-250 (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina) preko noći. Obezbojavanje gela je

MATERIJAL I METODE

rađeno u 7% rastvoru sirćetne kiseline do pojave obojenih proteinskih traka na gelu.

4.9.7. Nativna elektroforeza

Rastvori za nativnu elektroforezu su identični kao prethodno navedeni koji se koriste za SDS-PAGE elektroforezu, jedina razlika je što se umesto 10% SDS-a dodaje dH₂O u istoj zapremini. Za pripremu uzoraka se koristi pufer za pripremu uzoraka koji za razliku od gore pomenutog ne sadrži β-merkaptoetanol, već umesto njega se dodaje dH₂O u istoj zapremini.

Elektroforeza se radi isto kao kod SDS-PAGE elektroforeze. Nakon završetka elektroforeze gel se boji srebrom.

4.9.8. Protokol za bojenje elektroforetskih gelova srebrom

Rastvori	Vreme (min)
1. Ispiranje sa dH ₂ O	1
2. 50% metanol, 20% TCA, 2% CuCl ₂	15
3. 10% etanol, 5% sirćetna kiselina	10
4. 0.01% KMnO ₄	10
5. Ispiranje 2x sa dH ₂ O	1
6. 10% etanol, 5% sirćetna kiselina	10
7. 10% etanol	10
8. Ispiranje 2x sa dH ₂ O	1
9. dH ₂ O	10
10. 0,1% AgNO ₃	10
11. Ispiranje sa dH ₂ O	20 sec
12. 10% K ₂ CO ₃	1
13. 2% K ₂ CO ₃ , 0,01% formaldehid	Do pojave traka
14. 10% etanol, 5% sirćetna kiselina	20 sec
15. Ispiranje dH ₂ O	20 sec
16. Čuvanje u 0,02% K ₂ CO ₃	Neograničeno

Nakon završene elektroforeze gel se pažljivo prenese u čistu posudu za bojenje. Tehnika je izuzetno osetljiva te se gel tokom rada ne sme dodirivati rukama. Gel se tretira po uputstvima ispisanim u tabeli. Rastvori 10. i 13. prave

MATERIJAL I METODE

se neposredno pre upotrebe. Najbolji rezultati se dobijaju ukoliko se gel sve vreme bojenja meša na automatskoj mućkalici.

4.9.9. Zimogram

Zimogram je rađen identično kao nativna elektroforeza samo što se umesto bojenja gel ispira destilovanom vodom, a potom se potapa u rastvor za određivanje CDH.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

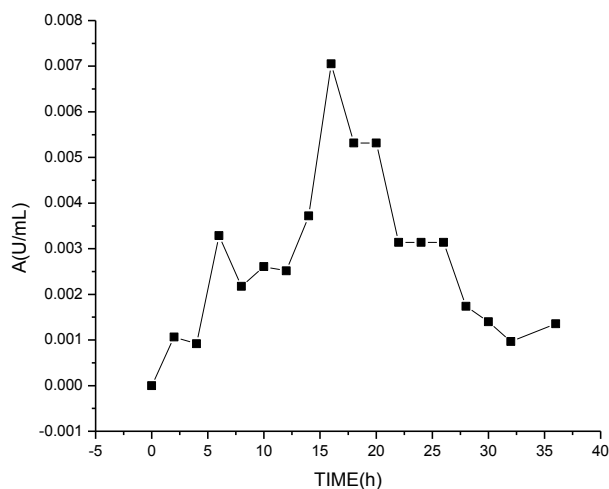
5.1. Kloniranje i ekspresija celobioza-dehidrogenaze iz *Phanerochaete chrysosporium* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* Invsc1

Za umnožavanje gena divljeg tipa celobioza-dehidrogenaze korišćeni su prajmeri koji sadrže *EcoRI* i *XbaI* restrikciona mesta. PCR proizvodi od 2,5 kb (kilo baznih parova) (proverenih agaroznom elektroforezom) su isećeni sa *EcoRI* i *XbaI* i ubaćeni u odgovarajuća mesta u pYES2 vektoru. Umeci su provereni PCR-om i sećenjem plazmidne DNK sa *EcoRI*.

Dužina gena dobijenog PCR proizvoda je bila iste dužine kao što je opisano u literaturi [176]. Dužina gena *cdh* iz *P. chrysosporium*-a je 2307 bp sa dužinom α -faktora za izlučivanje zrelog proteina od 267 bp dobijamo dužinu fuzionog proteina od 2574 bp.

5.1.1. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantne celobioza-dehidrogenaze

Rekombinantni enzim je kloniran u kvasac *S. cerevisiae* i proizvodnja divljeg-tipa CDH (eng. *wild type* - wt) je praćena merenjem aktivnosti da se odredi maksimum enzimske ekspresije. Najveća aktivnost je postignuta posle 16h od indukcije sa galaktoznim medijumom, u nastavku fermentacije sa sporim smanjenjem aktivnosti wtCDH (Slika 9.). Fermentacija je prekinuta posle 16h posle indukcije i korišćena za dalje eksperimente.

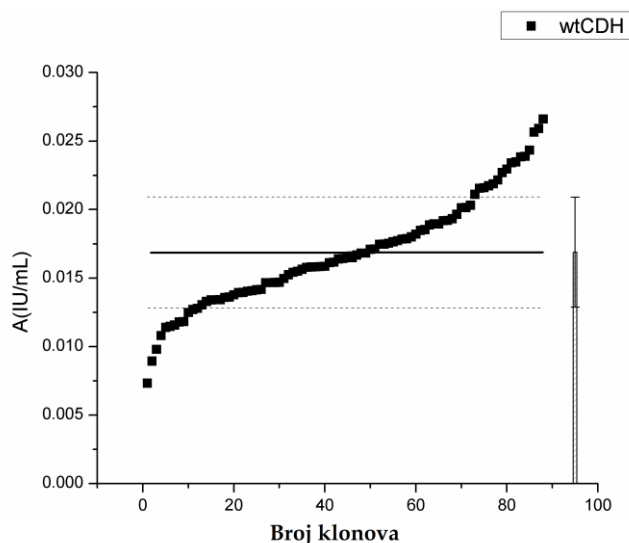


Slika 9. Aktivnost wtCDH tokom fermentacije u YNB-CAA glukoznom tečnom medijumu, indukovan sa YNB-CAA galaktoznog medijuma, pokazujući vrhunac aktivnosti na 16 h. Aktivnost uzoraka je merena sa 30 mM laktozom, 0,3 mM DCIP i 0,1M natrijum acetatnim puferom pH 4,5.

5.1.2. Pravljenje biblioteke mutanata, pretraživanje i prečišćavanje odabranih mutanata

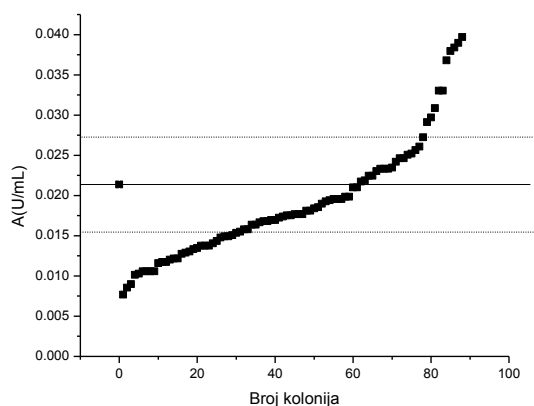
Biblioteke CDH mutanata su stvorene metodom PCR-a sklonog greškama (epPCR). PCR proizvodi su prečišćeni i klonirani u pYES2 vektor koristeći *EcoRI* i *BamHI* restrikcione enzime.

Fermentacija je rađena u mikrotitar pločama (MTP) u YNB CAA medijumu i aktivnost rekombinantnog enzima kloniranog u pYES2 vektor i wtCDH je merena posle 16-tog sata od galaktozne indukcije. Na Slici 10. crne tačke predstavljaju aktivnosti wtCDH iz fermentacija u MTP bunarima.



Slika 10. Prikaz ekspresionog nivoa celobioza-dehidrogenaze. Ćelije *S. cerevisiae* su transformisane sa wtCDH-pYES2 plazmidom. 96 pojedinačnih kolonija kvasaca transformisane sa wtCDH su odgajane pod uslovima indukcije. Centrifugirani supernatanti su korišćeni za DCIP-baziran esej. Standardna devijacija je 23%.

Biblioteka wtCDH klonirana je u pYES2 vektor, i transformisana u kompetentne ćelije bakterija, a potom u kompetentne Invsc1 ćelije kvasca sa plazmidima izolovanim iz *E. coli* epPCR biblioteke (sa 0,05 mM Mg^{2+}). Prosečno se dobijaju 1 do 2 mutacije po *cdh* genu i oko 60% klonova je imalo aktivnu varijantu CDH enzima u eseu agaroznih ploča. Fermentacija kolonija je rađena u mikrotitar pločama na 30°C. Slika 11. predstavlja aktivnosti mutanata CDH (mCDH) iz fermentacije u bunarima MTP. Isprekidane linije predstavljaju standardnu devijaciju wtCDH. 96 pojedinačnih kolonija svake transformacije su odgajane pod indukujućim uslovima. Centrifugirani supernatanti su korišćeni u DCIP-baziranom eseu.



Slika 11. Prikaz ekspresionog nivoa mCDH. Crne isprekidane linije predstavljaju standardnu devijaciju (izračunata u excel). Crna linija predstavlja wtCDH. Kompetentne ćelije *S. cerevisiae* su transformisane sa mCDH-pYES2 plazmidom. 96 pojedinačnih kolonija od svake transformacije su odgajane pod indukcionim uslovima. Centrifugirani supernatanti su korišćeni za DCIP baziran esej.

5.1.2.1. Pretraživanje mutanata za poboljšanu aktivnost

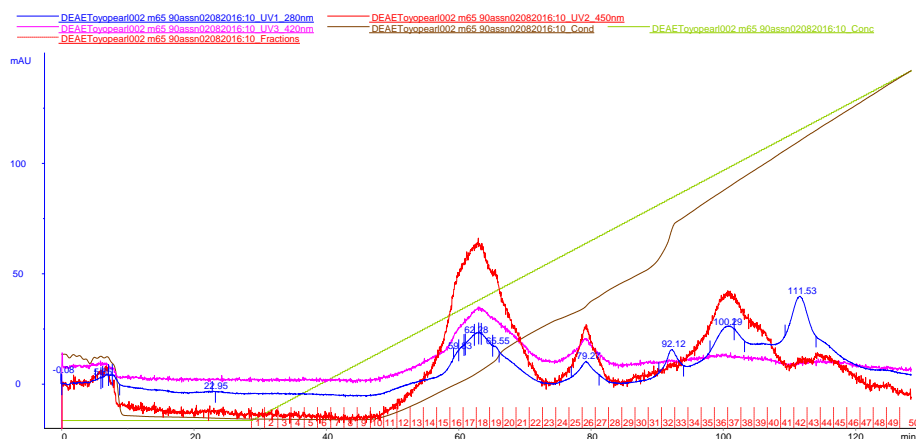
Oko 1000 kolonija koje ekspimiraju aktivne varijante CDH su otkrivene esejom na agaroznim pločama i pretraživanje je rađeno u MTP-u za poboljšanu aktivnost i stabilnost. Nekoliko mutanata je pokazalo poboljšanu aktivnost i oni su proizvedeni u većoj zapremini i kinetički su okarakterisani. Od njih smo odabrali tri da uporedimo sa divljim tipom enzima. Ti mutanti su S137N, M65S i M685V.

5.1.2.2. Prečišćavanje enzima

Fermentaciona tečnost bez ćelija, posle ekspresije u 1 L je korišćena za prečišćavanje proteina wtCDH. Ultrafiltracijom sa membranskim molekularnim sitom od 50 kDa fermentaciona tečnost je koncentrovana 100 puta. Ultrafiltrat

REZULTATI I DISKUSIJA

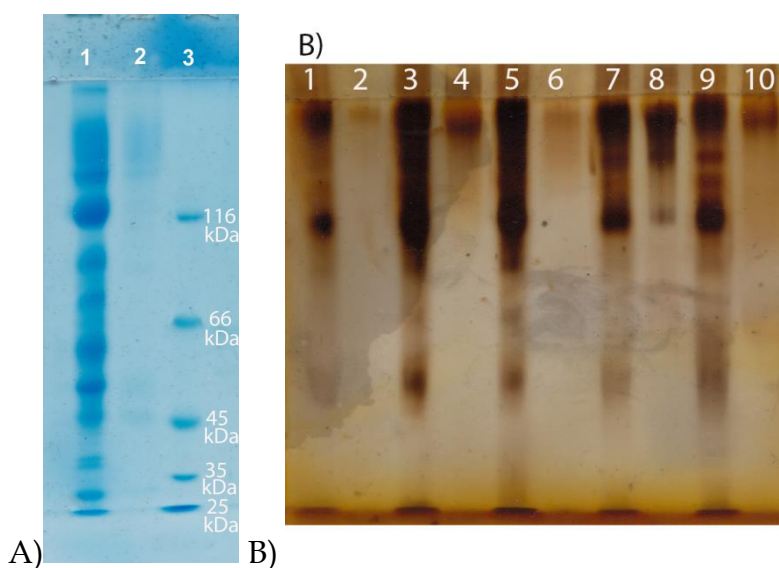
CDH je dijalizovan i nanet na jonoizmenjivačku DEAE – Sepharose kolonu. Protein je eluiran gradijentom soli od 0 – 0.5 M u 10 mM natrijum fosfatnom puferu pH 6,0. Frakcije sa aktivnošću CDH su spojene i ponovo nanete na hromatografiju DEAE Sepharose. Prečišćavanje wtCDH je pojednostavljeno upotrebom jono-izmenjivačke hromatografije. Prečišćeni enzimi su korišćeni za karakterizaciju. Na Slici 12. je prikazan primer jednog hromatograma.



Slika 12. Hromatografija pokazuje frakcije sa jonoizmenjivačke hromatografije (IEC). Uzorak je M65S-mutant proizveden u fermentaciji sa galaktoznom indukcijom, koncentrovan sa ultrafiltracionom ćelijom, dijalizovan naspram 10 mM natrijum fosfatnog pufera pH 6,0, nanesen na DEAE jonoizmenjivačku hromatografiju, ispran sa povećanjem koncentracije soli u 10 mM natrijum fosfatnom puferu pH 6,0 i frakcije 13-20 su pokazale enzimsku aktivnost.

Molekularna masa rekombinantnog wtCDH je određena sa SDS elektroforezom, koja otkriva široku traku između 120 i 150 kDa za enzim eksprimiran u *S. cerevisiae* (Slika 13.).

REZULTATI I DISKUSIJA



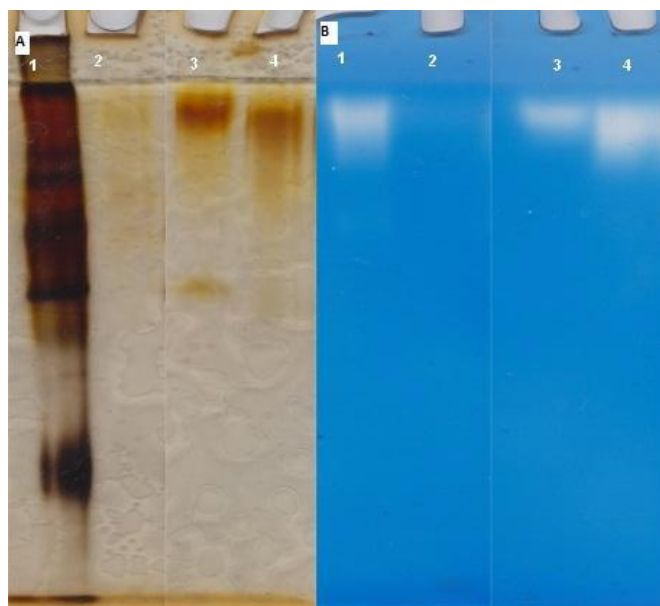
Slika 13. Poliakrilamidna gel elektroforeza: **A)** 8% gel; 1) sirovi uzorak wtCDH, 2) prečišćeni uzorak wtCDH, 3) molekularni markeri. Proteinske trake bojene CBB. **B):** 10% gel; 1) sirovi uzorak M65S, 2) prečišćeni uzorak M65S, 3) sirovi uzorak S137N, 4) prečišćeni uzorak S137N, 5) sirovi uzorak M685V, 6) prečišćeni uzorak M685V, 7,8,9) sirovi uzorci wtCDH, 10) prečišćeni uzorak wtCDH. Proteinske trake su obojene srebrom.

Molekulska masa wtCDH (120 - 140 kDa) je veća nego teorijski očekivana masa prirodnog CDH od 90 kDa [44], što je rezultat glikozilacije koja se dešava tokom izlučivanja iz *S. cerevisiae*. Široka traka se može uočiti na elektroforezi zbog ne-uniformne hiperglikozilacije koja je uobičajena za ekstracelularnu ekspresiju proteina u *S. cerevisiae*. Ova ne-uniformna hiperglikozilacija u *S. cerevisiae* sa širokim trakama na SDS elektroforezi je prethodno opisana za glukoza-oksidadzu iz *Aspergillus niger*, lakazu iz *Myceliophthora thermophila* [92] i invertazu [177]. Takođe je određena pI vrednost eksprimiranog enzima na 4,7 izoelektričnim fokusiranjem koja odgovara teoretski izračunatoj vrednosti od 4,61 iz sekvence aminokiselina.

Čistoća proteina je određena nativnom poliakrilamidnom gel elektroforezom i zimogramom. Bojenje gela srebrom posle native elektroforeze

REZULTATI I DISKUSIJA

je pokazalo da sirovi uzorak, a takođe i prečišćeni imaju traku na poliakrilamidnom gelu koja se poklapa sa pozicijom trake aktivnosti detektovane od strane zimograma koristeći DCIP i laktozu (Slika 14.).

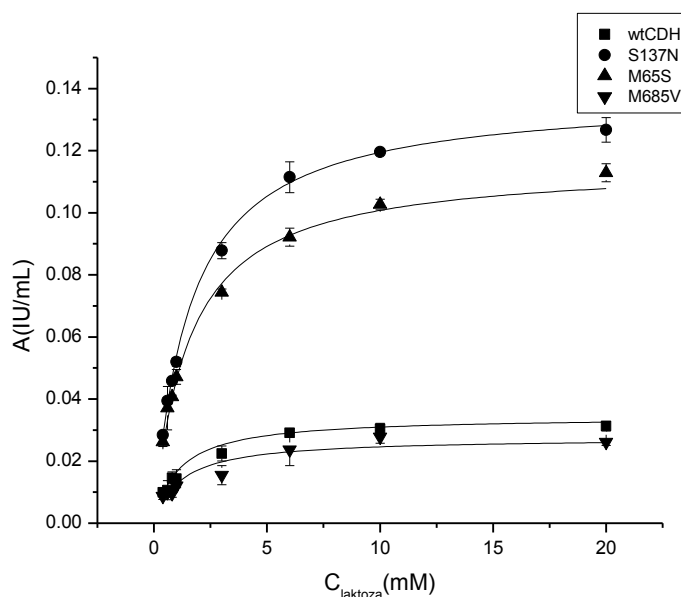


Slika 14. Nativna elektroforeza na 10% razdvajajućem gelu. Uzorci: 1) sirovi uzorak wtCDH, 2) wtCDH pre hromatografije, 3) wtCDH hromatografski prečišćen i 4) wtCDH prečišćen sa ponovnom hromatografijom. Sa leve strane A) pokazuje nativnu elektroforezu obojenu srebrom i B) zimogram sa 0,3 mM DCIP, 30 mM laktoza i 0,1 M natrijum fosfatnim puferom pH 4,5.

Ovo poklapanje i simetrični pik proteina tokom jonoizmenjivačke hromatografije koji odgovara piku aktivnosti CDH potvrđuje da je CDH protein čist. Širenje trake može pokazati da postoje moguće izoforme koje su prečišćene zajedno.

5.1.3. Karakterizacija rekombinantnih proteina

Aktivnost prečišćenih enzima divljeg tipa i tri mutanta je određena u različitim koncentracijama šećera, podaci su podešeni u Mihaelis - Mentenovu krivu i kinetički parametri preračunati koristeći Origin 8 program (Slika 15.).



Slika 15. Određivanje kinetičkih parametara za prečišćene varijante CDH eksprimirane u *S. cerevisiae* koristeći laktozu kao supstrat.

Aktivnost prečišćenog enzima je određena u različitim koncentracijama šećera, potom su podaci podešeni u Mihaelis - Mentenovu krivu i izračunati odgovarajući kinetički parametri [59] (Tabela 1.). Rekombinantni protein ima 14-puta nižu katalitičku aktivnost nego u njegovom prirodnom obliku i K_M vrednost wtCDH enzima je 1,65 puta veća od prirodnog enzima [61] za celobiozu kao supstrat. wtCDH je pokazao višu K_M vrednost nego ona koja je opisana u literaturi za celobioznu i laktoznu oksidaciju i DCIP redukciju. Niža katalitička aktivnost rekombinantnog proteina se može objasniti uticajem više molekularne mase i hiperglikozilacije.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 1. Kinetički parametri za prečišćeni wtCDH i mutante ka laktozi i celobiozi.

	wtCDH	S137N	M65S	M685V	wtCDH	S137N	M65S	M685V
	Laktoza				Celobioza			
K_M (mM)	1,08	1,56	1,49	1,17	0,03	0,03	0,05	0,02
k_{cat}¹ (s⁻¹)	2,59	5,76	4,06	1,37	1,05	2,30	2,06	1,19
k_{cat}/K_M (s⁻¹ mM⁻¹)	2,41	3,69	2,72	1,17	39,8	80	38,2	56,9

Mutanti S137N i M65S su pokazali povećani k_{cat} u odnosu na divlji tip enzima i za celobiozu i laktozu kao supstrate, dok je mutant M685V pokazao povećani k_{cat} i k_{cat}/K_M jedino za celobiozu što može značiti da je pokazao višu aktivnost tokom pretrage u MTP sa laktozom zbog više stope proizvodnje. Konstanta specifičnosti za sve mutante za oba supstrata je povećana u odnosu na rekombinantni divlji tip CDH.

Divlji tip enzima proizveden u *S. cerevisiae* ima niže k_{cat} vrednosti za celobioznu i laktoznu oksidaciju u odnosu na isti enzim proizveden u *P. chrysosporium* [61], zbog poznate činjenice da se dešava prekomerna glikozilacija u *S. cerevisiae* [178]. Koristeći NetNGlyc (Prilog 3.) i NetOGlyc servere (Prilog 4.) zasnovane na neuronskim mrežama za analiziranje sekvence proteina CDH, predviđeno je devet navodnih N i šesnaest O- glikozilacionih mesta i razdaljine od poznatih mutacija su izračunate koristeći USCF Chimera program (Tabela 2.). Analiza je pokazala da se većina O glikozilacionih mesta nalazi na regionu petlje koji povezuje hem i flavinski domen CDH. Identifikovane mutacije se ne nalaze u ovom regionu niti su blizu bilo kojih navodnih O-glikozilacionih mesta. Jedino je M685V blizu jednom navodnom N-

REZULTATI I DISKUSIJA

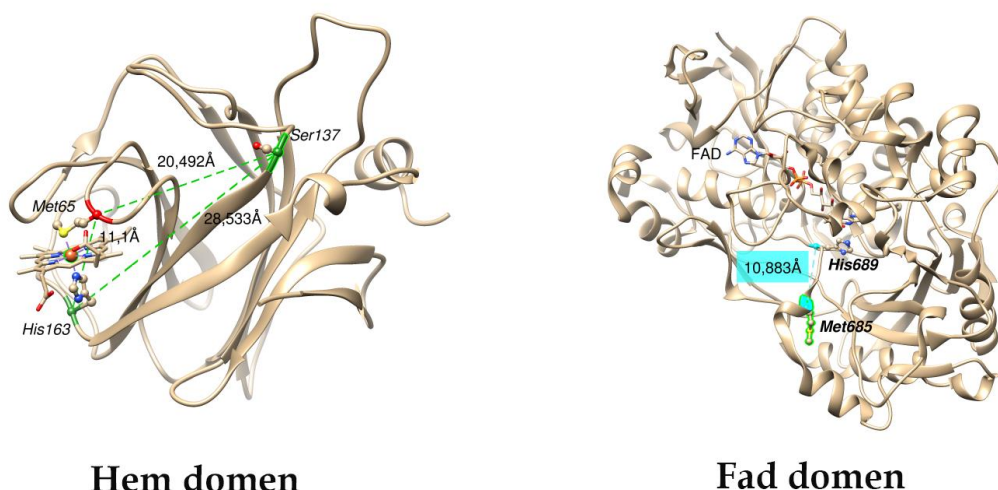
glikozilacionom mestu na N517 sa razdaljinom od 7,385 angstrema, međutim ta mutacija nije pokazala veliko poboljšanje aktivnosti u odnosu na ostala dva mutanta. Analiza sekvenci uključujući M65S i S137N mutacija pokazuje da se glikozilaciona šema nije promenila u odnosu na sekvencu divljeg tipa CDH. Ovi rezultati su pokazali da je CDH protein visoko ne-uniformno glikozilovan u kvascu na pronađenim navodnim glikozilacionim mestima i da naše mutacije nisu puno uticale na glikozilaciju. Uprkos visokom stepenu glikozilacije, zbog lakše genetičke manipulacije *S. cerevisiae* je poželjan domaćin za dirigovanu evoluciju. Takođe je dokazano da je odnos aktivnosti za različite mutante istog enzima ostaje isti kad se eksprimira u različitim domaćinima [179].

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 2 Razdaljina između mutacija i navodnih glikozilacionih mesta izračunatih u UCSF Chimera programu koristeći UniProt PDB podatke za hem i flavin domene CDH.

N Glikozilaciono mesto	Mutanti (Å)			O Glikozilaciono mesto	Mutanti (Å)		
	S137	M65	M685		S137	M65	M685
N111	34,629	28,313	23176	T7	20,742	28,506	33,770
N191	49,383	51,276	90,393	T193	43,546	47,123	87,213
N419	39,476	44,000	43,215	T194	40,172	44,915	84,670
N434	41,808	54,394	41,818	T195	37,059	41,735	82,629
N492	35,069	45,325	30,967	T197	32,186	38,935	80,532
N517	54,654	53,317	7,385	T200	27,141	37,528	78,440
N553	53,085	41,246	38,356	S201	27,832	40,020	79,213
N593	49,581	42,759	12,784	T202	26,000	39,577	76,679
N599	58,641	48,578	21,248	S203	24,891	40,161	75,793
				S204	24,125	39,809	73,530
				S205	27,556	43,518	75,973
				T207	31,574	48,964	78,584
				T208	32,685	50,689	77,766
				T211	38,748	57,598	78,663
				T215	44,330	63,760	79,864
				T338	57,855	57,114	30,228

Izračunavanjem razdaljine nađenih mutacija od aktivnog mesta u hem i flavin domenu CDH može se videti da M65S mutacija vezuje gvožđe u hem aktivnom mestu na razdaljini od samo 11,1 angstrema od drugog vezujućeg His163 u aktivnom mestu [40] (Slika 16.).



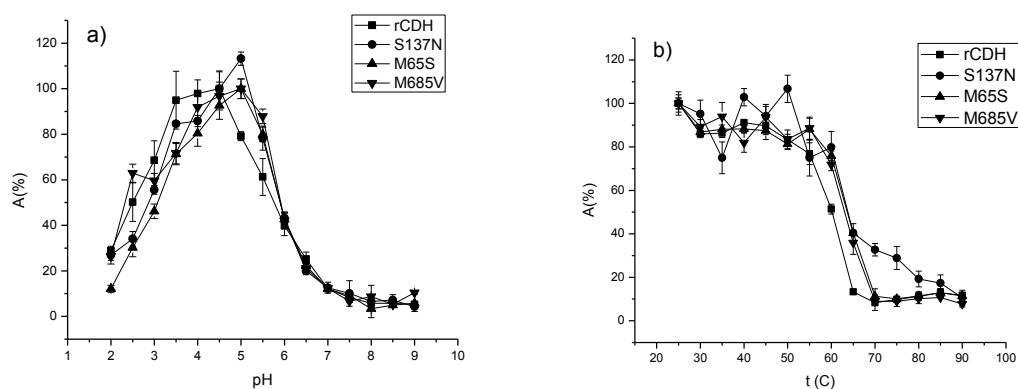
Slika 16 Struktura dva (odvojena) domena CDH iz *P. chrysosporium* sa prikazanim razdaljinama nađenih mutacija od aktivnog mesta.

M65S mutacija nije poremetila aktivnost CDH sa DCIP iako učestvuje u vezivanju kritičnog kofaktora kao što je hem i to se slaže sa rezultatima dobijenim eksprimirajući samo FAD domen CDH u *E. coli* koji je pokazao višu aktivnost nego nativni CDH koji sadrži oba domena [180]. Takođe u višestrukom poravnavanju sekvenci od 28 CDH sekvenci (Prilog 2) M65T supstitucija je pronađena u jednom homologu što takođe može objasniti zašto ovakva mutacija može da se toleriše.

Druga S137N mutacija se takođe nalazi u hem domenu na razdaljini od 20 angstrema od hem aktivnog mesta, dok se M685V mutacija nalazi u flavinskom domenu relativno blizu katalitičkom His689 ostatku na razdaljini od oko 11 angstrema. Iz ovih podataka možemo zaključiti da M65S i M685V mesto mogu uticati na aktivnost CDH zbog blizine aktivnog mesta dok uticaj S137N mutacija je verovatno postignut preko interakcija na velikoj udaljenosti i kao površinska mutacija može takođe doprineti stabilnosti enzima što je prethodno objavljeno za površinske mutacije [181]. Višestrukim poravnavanjem sekvenci (Prilog 2) pokazano je da su amino kiselinski ostaci na pozicijama S137 i M685 umereno očuvani i supstitucije se mogu naći u 30-50% homologa.

REZULTATI I DISKUSIJA

McIlvaine pufer je korišćen za merenje pH optimuma. Korišćeni su različiti ekstinkcioni koeficijenti za različite pH vrednosti, zbog spektralnih karakteristika DCIP-a koji je zavisan od pH reakcione smeše: pH 2,0-4,5 ($6,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); pH 5 ($6,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); pH 5,5 ($8,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); pH 6 ($12,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); pH 6,5 ($15,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); pH 7 ($16,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); and pH 7,5 - 9,0 ($17,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Aktivnosti prečišćenog wtCDH i mutanata je određena na različitim pH vrednostima. Vrhunac aktivnosti je primećen na pH 2,5 - 5,5 za wtCDH, za S137N je opseg bio od 3,5 - 6,0 pH jedinica i M65S je imao opseg od 3,0 - 5,5 pH jedinica (Slika 17.a)).



Slika 17. a) Efekat pH na aktivnost wtCDH i mutanata koristeći 0,3 mM DCIP kao elektron akceptor i 30 mM laktozu u McIlvain puferu pH 2,0 - 9,0. Vrednosti su pokazane kao srednja vrednost tri merenja. b) Efekat temperature na aktivnost wtCDH i mutanata sa esejem rađenim u 0,1 M natrijum acetatnom puferu pH 4,5 sa 0,3 mM DCIP kao elektron primaoc i 30 mM laktozom kao supstratom. Uzorci su mereni na različitoj temperature u toku 15 minuta i ohlađeni na ledu. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost tri merenja.

Najveću aktivnost enzim je pokazao na pH 4,5 što je i bio korišćeni pH da se odredi aktivnost za druge karakterizacije. Enzim je stabilan sa 50% relativne aktivnosti od pH 2,5 - 5,0. Optimalni pH za prirodni CDH je pH 6,0 i

REZULTATI I DISKUSIJA

pH 4,0 – 4,5 za direktni elektron transfer [182]. Najviša aktivnost u jednoj studiji je pokazana na pH 4,0 za flavinski domen [180].

Optimalna temperatura za aktivnost wtCDH je od 20 – 50 °C sa DCIP-om kao elektron primaocem (Slika 17.b)). Mutanti su pokazali veću rezidualnu aktivnost od wtCDH do 60 °C.

Studije termalne stabilnosti su išle od 50 – 60 °C i rađeni su na pH 4,5. Rekombinantni enzim je pokazao relativnu stabilnost posle 2,5 h na 50 °C sa rezidualnom aktivnošću koja je spala ispod 40 %, dok su mutanti imali gubitak rezidualne aktivnosti posle 3 h. Kad se inkubiraju na 55 °C u periodu od 1 h, rezidualna aktivnost se smanjila do oko 40 % originalne vrednosti za wtCDH dok je za mutante rezidualna aktivnost bila 90 % posle 2 h inkubacije. Na 60 °C aktivnost je spala na 50 % rezidualne aktivnosti za wtCDH, dok je za S137N mutant pao ispod 40 % rezidualne aktivnosti posle 1,5 h. Slična stabilnost je detektovana za CDH iz *Trametes versicolor* na 40 °C i bila je stabilna u periodu od 2 h. Istraživanje je pokazalo da na 50 °C rezidualna aktivnost je spala na oko 43 % tokom inkubacije od 1 h dok je kod nas smanjena na 80 % od originalne vrednosti za wtCDH. Rekombinantni CDH je pokazao veću rezidualnu aktivnost od 40 % na 55 °C u toku 1 h, dok je CDH iz *T. versicolor* smanjena na oko 11 % originalne vrednosti za aktivnost CDH [183]. Mutacije nađene pretraživanjem epPCR biblioteke za povećanu aktivnost uopšteno vode smanjenju stabilnosti, ali moguće je pronaći mutacije koje povećavaju i aktivnost i stabilnost i to je često u slučaju kad se koristi konsensus pristup u eksperimentima dirigovane evolucije [184].

ABTS esej, sa termalnim stopiranjem enzima, indirektno meri proizvodnju peroksida. Jedan miligram wtCDH proizvodi 0,273 nmol H₂O₂ po minuti, S137N 0,4 nmol H₂O₂ po minuti, M65S 0,44 nmol H₂O₂ po minuti i M685V 0,21 nmol H₂O₂ po minuti. Rezultati su niži u odnosu na opisanu proizvodnju od strane rekombinantnog CDH iz *Myriococcum thermophilum* proizvedene u *P. pastoris* [174], ali su mutanti pokazali skoro dvostruko

REZULTATI I DISKUSIJA

povećanje proizvodnje peroksida što ukazuje na mogućnost daljeg unapređenja aktivnosti korišćene CDH za proizvodnju peroksida.

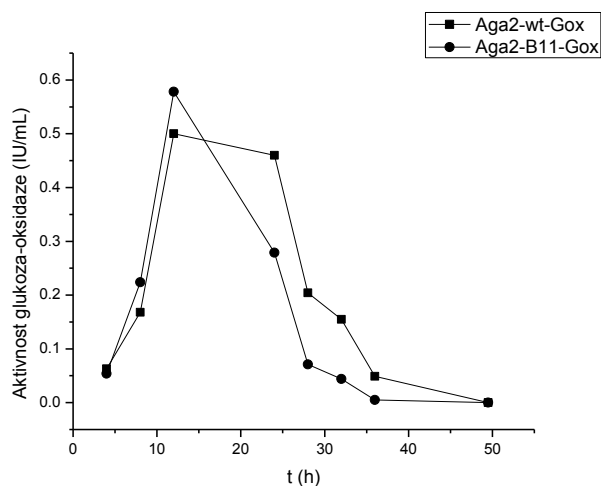
5.2. Ekspresija na površini ćelija kvasca

Testirana je upotrebljivost sistema ekspresije oksidoreduktaznih enzima u vidu himere sa Aga2 proteinom na površini ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 za dirigovanu evoluciju enzima na primeru divljeg soja i jednog mutanta glukoza-oksidaze.

5.2.1. Izolovanje i karakterizacija himere Aga2 proteina i glukoza-oksidaze eksprimirane na površini ćelija kvasca

Sekvence za zreli gen divljeg tipa i B11 glukoza-oksidaze (GOx) bez native pro-sekvence su ubačeni nizvodno od Aga2 gena u pCTCON2 [172] koristeći prajmere koji sadrže *BamHI* i *NheI* restrikciona mesta. PCR proizvod veličine 1,8 kb (proveren DNK elektroforezom) je digestovan sa *BamHI* i *NheI* i umetnut u odgovarajuća mesta u pCTCON2. Umeci su provereni PCR-om i sečenjem izolovanih plazmida DNK sa *EcoRI* koji su imali dve trake.

Kompetentne ćelije *S. cerevisiae* EBY100 su transformisane sa proverenim konstruktima i zasejane na selektivne YNB CAA ploče, a potom su kolonije presejane na selektivni agar sa galaktozom i rafinozom i aktivne varijante GOx detektovane koristeći ABTS esej na agar ploči [178]. Pozitivni klonovi su uzeti i prebačeni u tečni YNB CAA glukozni medijum i gajeni su dva dana, pa razblaženi do OD_{600nm} 0,8 sa YNB CAA galaktoznim medijumom da se podstakne ekspresija GOx. Aktivnost GOx je merena da se odredi idealno trajanje indukcije da se dođe do maksimuma ekspresije himera divljeg tipa i B11. U oba slučaja najveća aktivnost je postignuta posle 12 h posle indukcije, sa smanjenjem aktivnosti GOx ukoliko se fermentacija produži (Slika 18.).



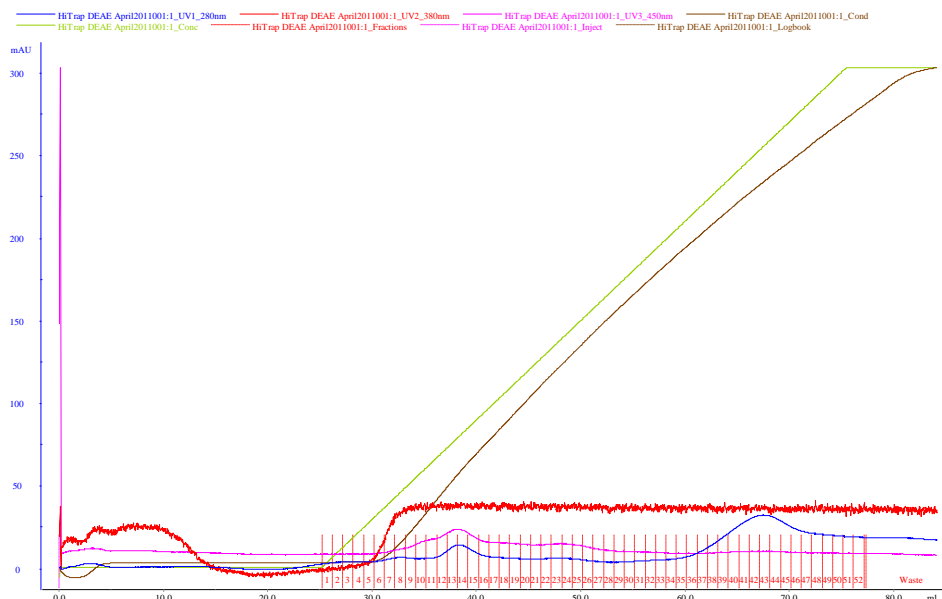
Slika 18. Zavisnost aktivnosti GOx u fermentacionoj tečnosti soja *S.cerevisiae* EBY 100 od vremena fermentacije u erlenmajeru od 250 mL (100 mL YNB-CAA medijuma: 25 mL za rast + 75 mL za indukovanje; 250 rpm; 30°C).

5.2.1.1. Prečišćavanje rekombinantne glukoza-oksidadze

Nakon fermentacije ćelije su odvojene centrifugiranjem 10 minuta na 3000 rpm, isprane puferom tri puta, a zatim je GOx ekstrahovana sa površine ćelijskog zida β -merkaptoetanolom i dijalizovana naspram 10 mM Na-fosfatnog pufera pH 6,0.

Dijalizat GOx je nanet na kolonu DEAE, HiTrap FF 5 mL u 10 mM Na-fosfatnom puferu pH 6,0. GOx je eluirana sa 100 mL linearnog gradijenta od 10 mM do 0,50 M Na-fosfatnog pufera pH 6,0. Sakupljane su frakcije zapremine od 1 mL. Glukoza oksidazna aktivnost u frakcijama je određivana ABTS esejom. Koncentracija proteina i flavoproteina (GOx) u frakcijama je određivana merenjem apsorbancije na tri talasne dužine: 280 nm (od proteina), 452 nm (FAD) i 382 nm (FAD), (Slika 19.).

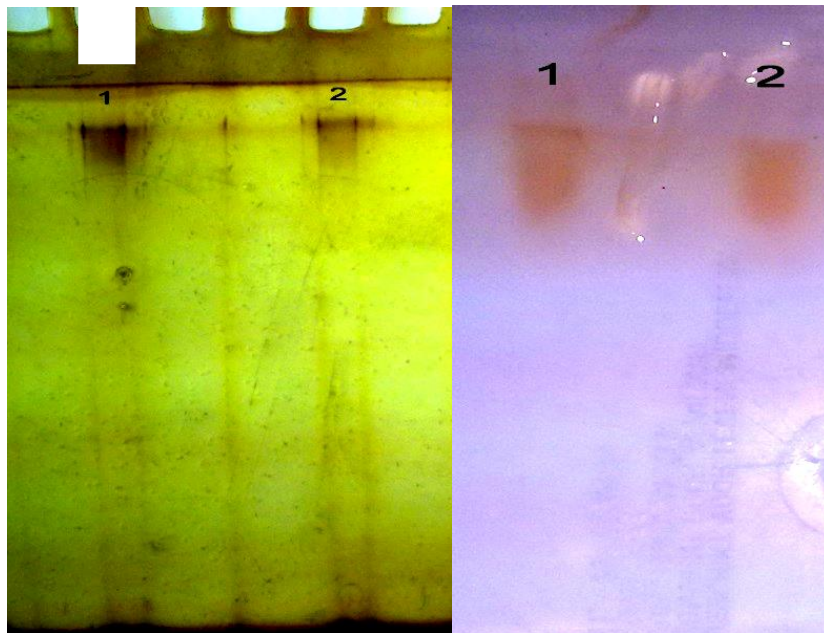
REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 19. Hromatogram prečišćavanja glukozo-oksidaze jonoizmenjivačkom kolonom HiTrap DEAE ff. **Plava linija** prikazuje apsorpciju na 280nm, **Crvena linija** prikazuje apsorpciju na 380nm, **Pink linija** prikazuje apsorpciju na 450nm.

Frakcije sa najvećom GOx-aktivnošću (12.-15. frakcije) su spojene i koncentrovane ultrafiltracijom na membrani sa *cut off*-om od 50 KDa.

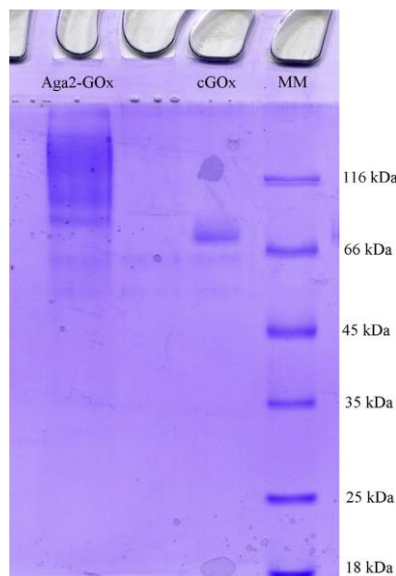
Čistoća enzima je dokazana nativnom elektroforezom i zimogramom. Bojenje gela posle native elektroforeze srebrom je pokazalo široku proteinsku traku koja se poklapa sa širokom trakom aktivnosti detektovanom zimogramom koristeći glukozu, gvajakol i peroksidazu (Slika 20.).



Slika 20. Nativna elektroforeza (I) i zimogram (II) na 8% gelu za razdvajanje.

Uzorci: 1. Aga2-wt-GOx, nakon jonoizmenjivačke hromatografije i koncentrovanja ultrafiltracijom; 2. Aga2-B11-GOx, nakon jonoizmenjivačke hromatografije i koncentrovanja ultrafiltracijom.

Ovo zapažanje i simetrični proteinski pik tokom jonoizmenjivačke hromatografije (Slika 19.) koja odgovara aktivnosti GOx su potvrdili da je konstrukt proteina Aga2-GOx čist. Molekularna masa konstrukta proteina je određena SDS elektroforezom, otkrivajući široku traku između 100 i 140 kDa za oba enzima eksprimirana u *S. cerevisiae* i oštru traku za komercijalnu GOx izolovanu iz *Asperigilus niger* na 75 kDa (Slika 21.).

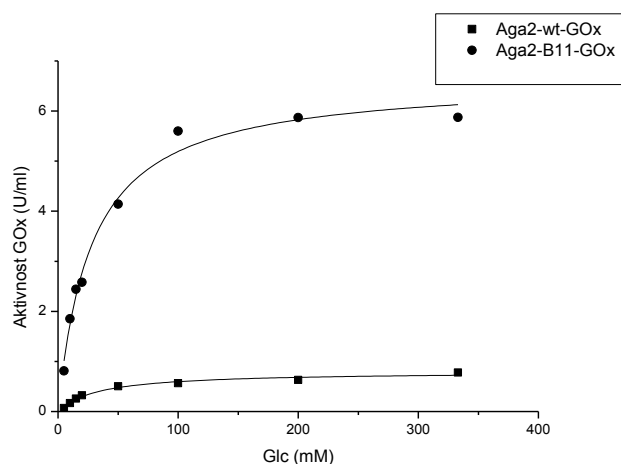


Slika 21. SDS-PAGE prečišćenog konstrukta Aga2-GOx upoređena sa komercijalnom GOx (cGOx) i molekularni markeri (MM).

Ove molekulske mase su veće od teorijski očekivanih molekulskih masa za nativnu GOx od 65 kDa i za Aga2 od 9,5 kDa (75 kDa za konstrukt AGA2-GOx) što je rezultat glikozilacije koja se dešava tokom izlučivanja i u *S. cerevisiae* i u *A. niger*. Široka traka je uočena i kod gel filtracije što je opšte poznata činjenica za izlučene proteine u *S. cerevisiae* što je bilo prijavljeno za invertazu čija je molekulska masa subjedinice bila između 60 kDa i 120 kDa [177] i za GOx čija je molekulska masa bila između 90 i 130 kDa [185]. Široka proteinska traka u svim ovim slučajevima je rezultat mikroheterogenosti izazvana hiperglikozilacijom rekombinantnih proteina koja se dešava u *S. cerevisiae* tokom izlučivanja. Molekulska masa Aga2-GOx koju smo videli je malo viša od one prethodno prijavljene za nativnu GOx eksprimiranu ekstracelularno u istom kvascu (*S. cerevisiae*) [185] verovatno zbog 9,5 kDa konstruktnog partnera AGA2.

5.2.1.2. Kinetička karakterizacija fuzionisanih proteina

Određena je GOx aktivnost prečišćenih himernih proteina sa različitim koncentracijama glukoze, podešene u Mihaelis-Mentenovu krivu da bi se izračunali kinetički parametri (Slika 22.).



Slika 22. Michaelis-Menten-ove krive za himerne konstrukte GOx sa Aga2 proteinom.

Oba fuziona proteina su imala nižu katalitičku aktivnost nego njihove odgovarajuće native forme. Himerni proteini divljeg tipa i B11 imaju k_{cat} 1,65 – puta i 1,30 – puta niže nego nativni enzimi, K_M vrednosti od divljeg tipa i B11 himernog proteina su bili 1,52 – puta i 1,74 – puta viši od nativnih enzima (Tabela 3).

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 3. Kinetičke konstante Aga2-wt-GOx i Aga2-B11-GOx. Podaci za wt-GOx i B11-GOx su uzeti iz literature [172].

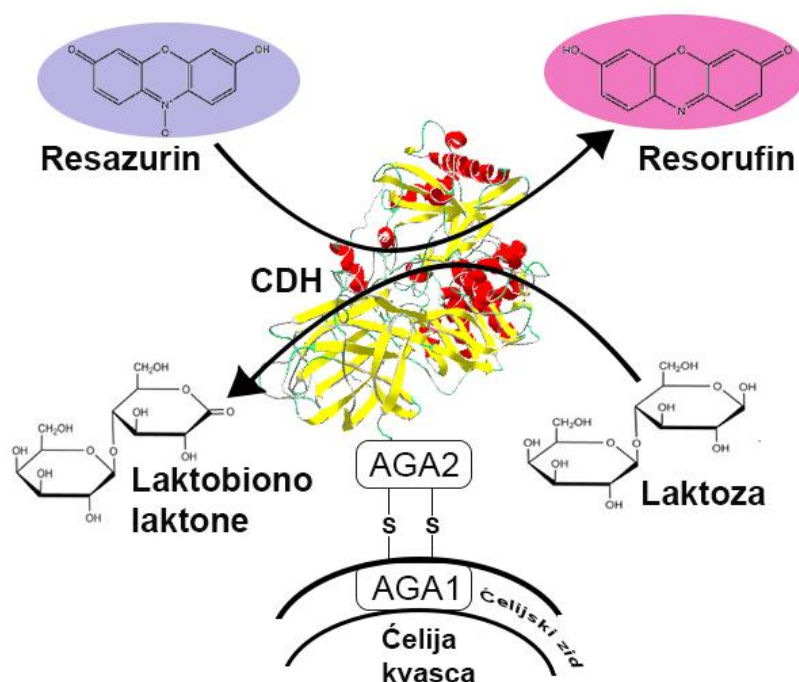
	Aga2-wt-GOx	Aga2-B11-GOx	wt-GOx	B11-GOx
$SA (U/mg)_{A280nm}$	25,04	46,05		
$k_{cat} (s^{-1})_{A280nm}$	8,65	17,85	54,80	80,00
$K_M (mM)$	33,4	27,86	22,00	16,00
k_{cat}/K_M (s^{-1}/mM^{-1}) _{A280nm}	0,26	0,64	2,49	5,00
$V_{max} (U/mL)$	0,79	6,64		

Niske katalitičke aktivnosti himernih proteina mogu odraziti uticaj velike molekulske mase na koeficijent difuzije enzima, no pošto nativni GOx postoji kao dimer, sposobnost Aga2 da stvori dodatne disulfidne mostove može proizvesti oligomerizaciju Aga2-GOx proteina redukujući katalitičku aktivnost i povećavajući K_m vrednost kao što je primećeno kod enzima koji su imobilizovani umrežavanjem [186].

I pored toga je katalitička aktivnost Aga2-B11 ostala viša od himernog proteina divljeg tipa, prateći slično ponašanje nativnih enzima. Zato su upoređivani odnos k_{cat}/K_m himernih proteina i njihovih nativnih izvora, i našli smo da je odnos k_{cat}/K_m za Aga2-B11 2,21 put viši od onog za himerni protein divljeg tipa što je slično relativnim vrednostima za native proteine eksprimirane u *S. cerevisiae* gde je odnos k_{cat}/K_m za nativni B11 dvostruko veći od divljeg tipa GOx [172]. Ovi rezultati pokazuju da otkriće poboljšanih varijanti na površini ćelija kvasca će verovatno odraziti pravo poboljšanje osobina nativnog enzima radije nego artefakt platforme površinskog prikazivanja.

5.2.2. Razvoj fluorescentnog eseja

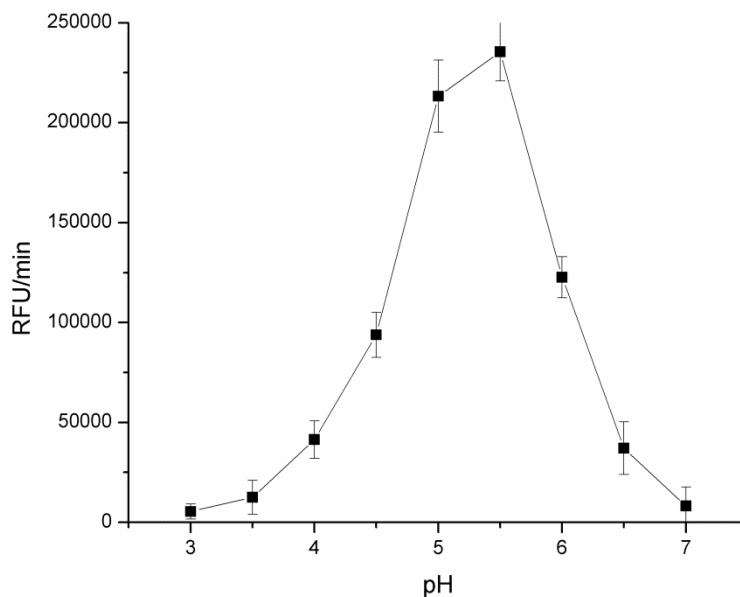
Resazurin je testiran kao supstrat za CDH da bi razvili sistem pretraživanja baziran na fluorescenciji za detekciju CDH aktivnosti u dirigovanoj evoluciji. CDH koristi resazurin kao primaoca elektrona, redukujući resazurin do rezorufina [165] (Slika 23.). Da bi razvili esej menjali smo različite komponente eseja da bi dobili optimalne uslove. Dizajn eseja je prvobitno testiran u kivetu sa rastvornim CDH enzimom, izolovanim iz *Pichia pastoris* koji je posle testiran i u mikrotitar ploči sa CDH eksprimiranim na površini ćelija kvasca.



Slika 23. Mehanizam fluorescentnog eseja za CDH baziranog na resazurinu.

5.2.2.1. Optimizacija pH

Pošto je fluorescencija rezorufina viša na alkalnim pH vrednostima [187], zbog kiselog pH optimuma CDH [11] testirali smo uticaj pH na fluorescentni signal rezorufina stvorenog od rastvornog CDH enzima (Slika 24.).

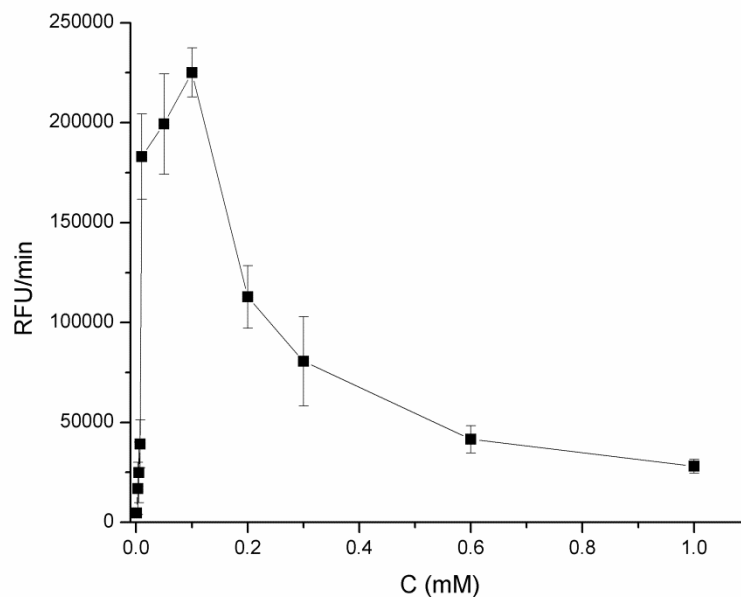


Slika 24. Zavisnost fluorescentnog signala (RFU/min) od pH vrednosti sa 10 mM laktozom, 0,1 mM rezazurinom, rastvornim CDH enzimom 0,29 IU/mL na različitim pH vrednostima, fluorescencija merena na ex/em 540/590 nm.

Maksimalni fluorescentni signal je detektovan oko pH 5,0 – 6,0 što je više nego objavljeni pH optimum enzima na pH 4,5 verovatno zbog više emisije fluorescencije rezorufina na alkalnim pH vrednostima. U daljim eksperimentima optimizacije koristili smo pH 5,5 za merenje aktivnosti CDH.

5.2.2.2. Optimizacija koncentracije rezazurina

Pošto je dobijen optimalni pH za esej, testirali smo uticaj različitih koncentracija rezazurina na fluorescentni signal. Različite koncentracije rezazurina (0,01 – 1 mM) su korišćene u ovom eksperimentu (Slika 25.).



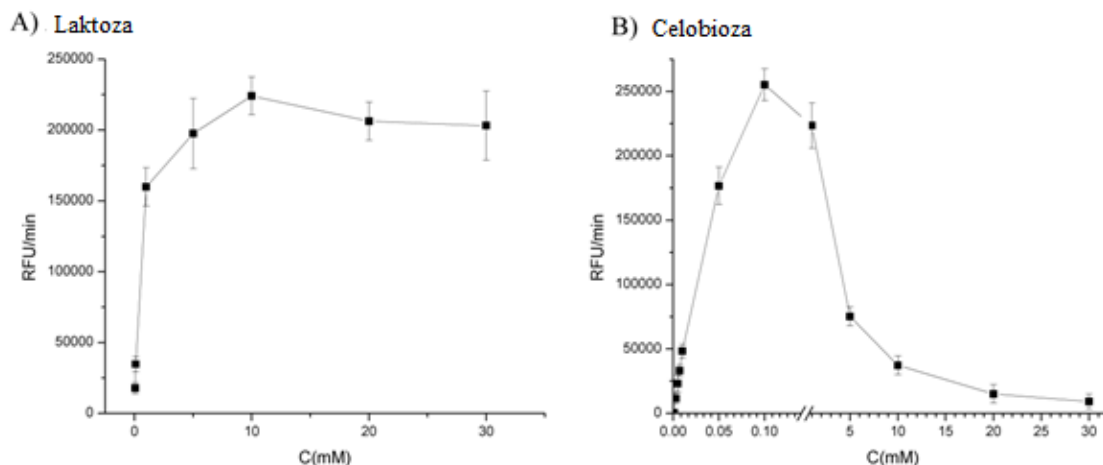
Slika 25. Zavisnost nagiba fluorescencije u vremenu od koncentracije resazurina u smeši 10 mM laktoze, 0,1 M natrijum fosfat pH 5,5; 0,29 IU/mL rastvornog CDH enzima sa opsegom koncentracije resazurina (0.001 - 1 mM), fluorescencija je merena na ex/em 540/590 nm.

Najveća enzimaska aktivnost i fluorescentni signal je dobijen za 0,1 mM koncentraciju resazurina i ta je koncentracija korišćena za dalje eksperimente.

5.2.2.3. Optimizacija koncentracije supstrata

U ovom eseju koristili smo laktozu i celobiozu kao supstrate. Koncentracija laktoze je varirala od 0,1 mM do 30 mM (Slika 26.A)).

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 26. Zavisnost fluorescentnog signala (RFU/min) od A) koncentracije laktoze, B) koncentracije celobioze, u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu pH 5,5, 0,1 mM resazurinu, 0,29 IU/mL rastvornog CDH enzima sa opsegom koncentracija laktoze (0,1 - 30 mM), fluorescencija merena na ex/em 540/590nm.

Može se videti da je najveći fluorescentni signal dobijen za 10 mM koncentraciju laktoze.

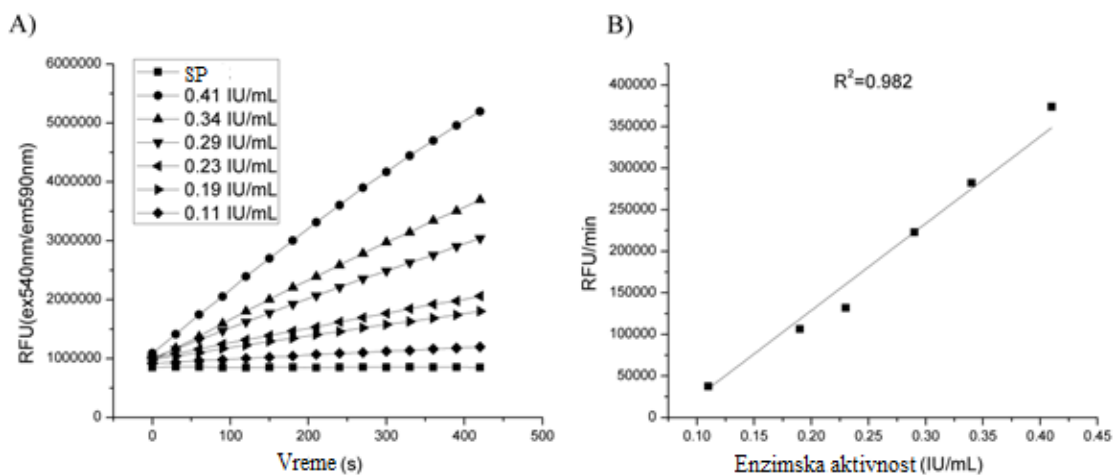
Drugi CDH supstrat koji je od interesovanja za industriju je celobioza i zato smo testirali takođe koncentracije celobioze od 0,001 - 0,1 mM (Slika 26.B)).

U slučaju celobioze maksimum fluorescentnog signala je bio između 0,05 i 0,1 mM, preciznije 0,08 mM koncentracija celobioze i zato je ta koncentracija korišćena u daljim eksperimentima.

5.2.2.4. Uticaj koncentracije enzima

Različite koncentracije celobioza-dehidrogenaze su dodavane u esej i merena je fluorescencija. Esej je pokazao linearni odgovor na koncentracije celobioza-dehidrogenaze u opsegu 0,1 - 0,45 IU/mL (Slika 27.A)).

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 27. Zavisnost promene fluorescencije (RFU) u vremenu od različite koncentracije enzima u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu na pH 5,5 i 10 mM laktozom i 0,1 mM resazurinom. A) Reakciona kinetika u vremenu. B) Kalibraciona kriva. Fluorescencija je merena na ex/em 540/590nm.

Nije bilo povećanja fluorescencije u kontrolnoj reakciji, što potvrđuje da je posmatrana promena fluorescencije u vremenu posledica aktivnosti celobioza-dehidrogenaze. Esej je pokazao linearni odgovor na koncentracije celobioza-dehidrogenaze u opsegu 0,11 - 0,45 IU/mL (Slika 27.B)). Ovo je pozitivan dokaz da se ovaj esej može koristiti da se otkriju mutanti sa opsegom različitih aktivnosti.

5.2.3. Optimizacija resazurinskog fluorescentnog esaja sa CDH eksprimiranog na površini ćelija kvasca

5.2.3.1. Testiranje kloniranja glukoza-oksidaze u YSD

Rezultati koje smo dobili pokazuju da konstrukt GOx-a, sa Aga2 proteinom mogu da dovedu do ekspresije aktivne forme enzima na površini ćelija kvasca koja ostaje vezana kovalentnom vezom za ćelijski zid. Dobijeni

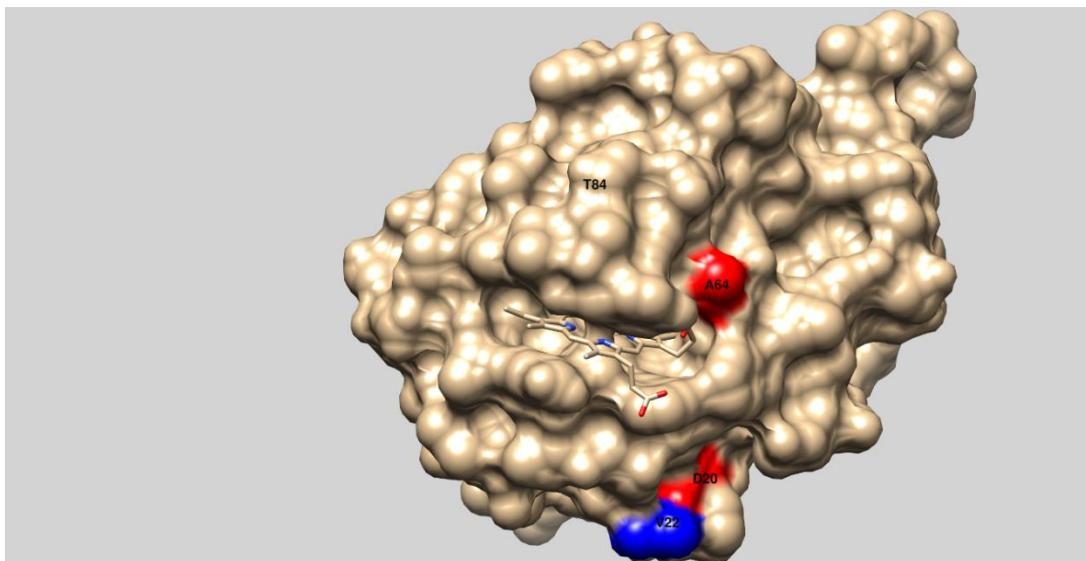
REZULTATI I DISKUSIJA

konstrukti GOx-a imaju manju katalitičku konstantu i veću Km vrednost u odnosu na nativan oblik GOx usled difuzionih ograničenja. I pored toga mutanti sa većom aktivnošću u nativnom obliku, takođe pokazuju veću aktivnost i u konstrukt sa Aga2, što ukazuje da se dobijeni konstrukt može koristiti za dirigovanu evoluciju GOx i razvoj visoko efikasnih metoda pretraživanja, jer je njegova aktivnost proporcionalna aktivnosti nativne GOx. Stoga se može zaključiti da se isti ekspresioni sistem može koristiti i za dirigovanu evoluciju drugih oksido-reduktaza, kao što je CDH.

5.2.3.2. Kloniranje CDH na površinu ćelija kvasca

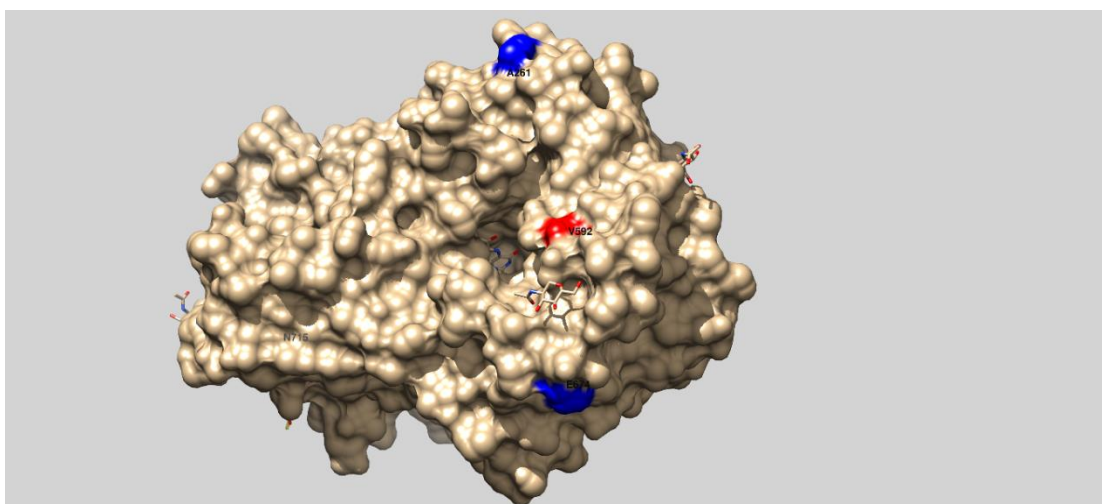
Gen celobioza-dehidrogenaze je kloniran u pCTCON2 vektor za ekspresiju kao himera sa Aga2 proteinom na površini ćelija kvasca. Ovo je provereno DNK elektroforezom, PCR-om i sekvenciranjem. Pretražene su kolonije na nekoliko agar ploča na CDH aktivnost i većina njih koje su imale wtCDH gen nisu pokazali aktivnost ni na agar pločama ni u tečnoj kulturi. U okviru rada na sličnom projektu u našoj laboratoriji, dobijen je klon koji je pokazao merljivu aktivnost na površini ćelija kvasca. Rezultati sekvenciranja u tom projektu su pokazali da klon ima tri mutacije unutar cdh gena: D20N, A64T i V529M – trostruki mutant – tmCDH (dobijen u okviru doktorske teze doktoranda Ana Marije Balaž). Fermentacija je ponovljena za wtCDH, tmCDH i ćelije sa praznim vektorom i samo je tmCDH pokazao aktivnost na ćelijskom zidu, te je on dalje korišćen u ovoj tezi za dobijanje bilbioteke gena i dalje poboljšanje osobina CDH prikazane na površini ćelija kvasca.

Sve tri supstitucije su locirane na površini CDH proteina gde se dve nalaze u hem domenu (D20N i A64T) blizu aktivnog mesta koji sadrži hem (Slika 28.).



Slika 28 Predstavljanje strukture hem domena CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* (PDB broj 1D7C) sa označenim zamenama. Slika je napravljena sa UCSF Chimera 1.13.1.

Treća zamena V592M se nalazi unutar FAD domena i takođe je veoma blizu ulaska u aktivno mesto koje sadrži u sebi FAD (Slika 29.).



Slika 29 Predstavljanje strukture FAD domena CDH iz *Phanerochaete chrysosporium* (PDB broj 1NAA) sa označenim zamenama. Slika je napravljena sa UCSF Chimera 1.13.1.

REZULTATI I DISKUSIJA

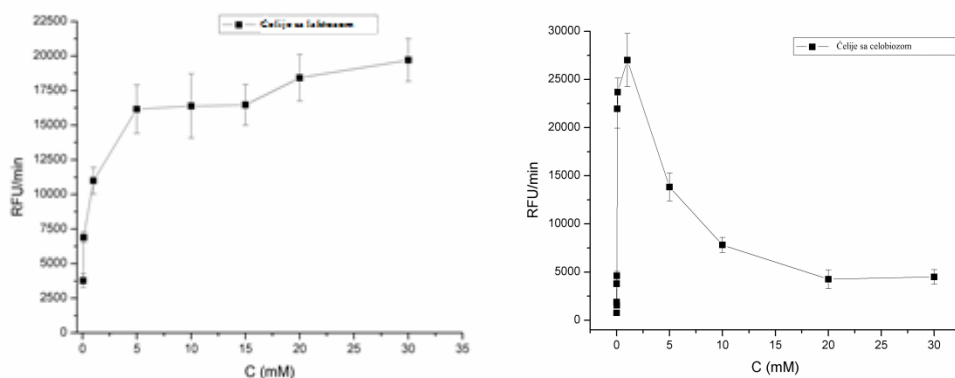
Obe zamene A64T i V592M su u regionu gde oba domena uzajamno deluju jedan na drugi i ove interakcije su veoma značajne za aktivnost CDH [40]. Bilo koja promena u ovom regionu može značajno da utiče na aktivnost CDH i ove dve zamene mogu biti razlog zašto je tmCDH pokazao merljivu aktivnost na površini ćelija kvasca dok se u isto vreme nije mogla detektovati aktivnost wtCDH.

Uslovi fermentacije za maksimalnu proizvodnju CDH aktivnosti su bili na 25 °C posle 24 – 36 h galaktozne indukcije.

5.2.3.3. Uticaj koncentracije supstrata

Pošto enzimi imobilizovani na površini ćelija kvasca mogu imati više K_m vrednosti od njihovih rastvornih enzima, testirali smo uticaj koncentracije supstrata na fluorescentni signal. Može se videti da je maksimum enzimske aktivnosti detektovan oko 10 – 20 mM laktoze (Slika 30.a) dok je maksimum aktivnosti kod celobioze detektovan na malo višoj koncentraciji supstrata od 0,1 mM u odnosu na 0,08 mM za rastvorni enzim (Slika 30.b).

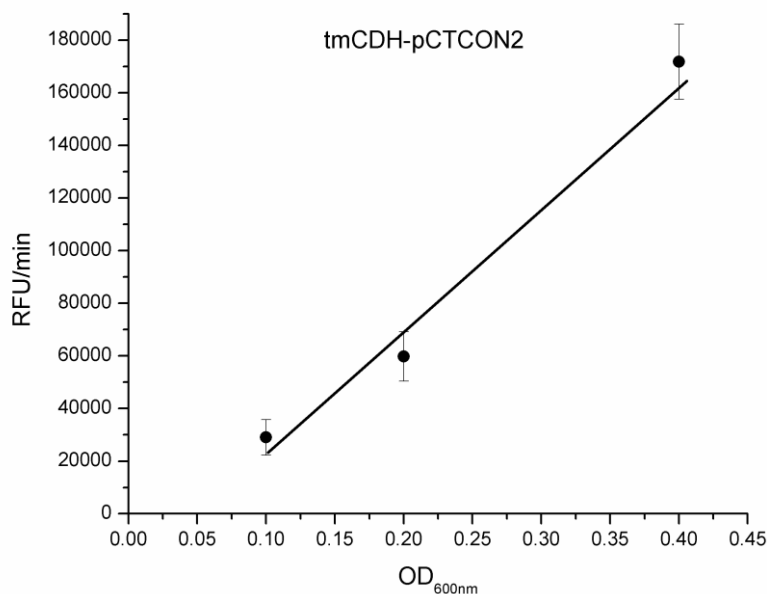
REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 30. a) Zavisnost fluorescentnog signala (RFU/min) od koncentracije laktoze u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu, pH 5,5, 0,1 mM resazurinom, 0,1 OD_{600nm} EBY100 ćelije sa tmCDH sa opsegom koncentracija laktoze (0,05 – 30 mM), esej je meren na ex/em 540/590. b) Zavisnost fluorescentnog signala (RFU/min) od koncentracije celobioze u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu, pH 5,5, 0,1 mM resazurinom, 0,1 OD_{600nm} EBY100 ćelije sa tmCDH sa opsegom koncentracija celobioze (0,001 – 30 mM), esej je meren na ex/em 540/590.

5.2.3.4. Uticaj gustine ćelija kvasca

Pošto su uspostavljeni uslovi optimizovane reakcije, testirali smo esej u kiveti koristeći *S. cerevisiae* EBY100 ćelije koje eksprimiraju tmCDH sa visokim i niskim koncentracijama po zapremini smeše. Koristili smo EBY100 ćelije transformisane sa praznim vektorom kao negativnu kontrolu. Posle 24 h od indukcije različite količine ćelija su dodavane u reakcionu smešu tako da finalna OD_{600nm} bude 0,1; 0,2 i 0,4 ($1,28 \times 10^6$; $2,55 \times 10^6$ i $5,3 \times 10^6$ redom), Slika 31.

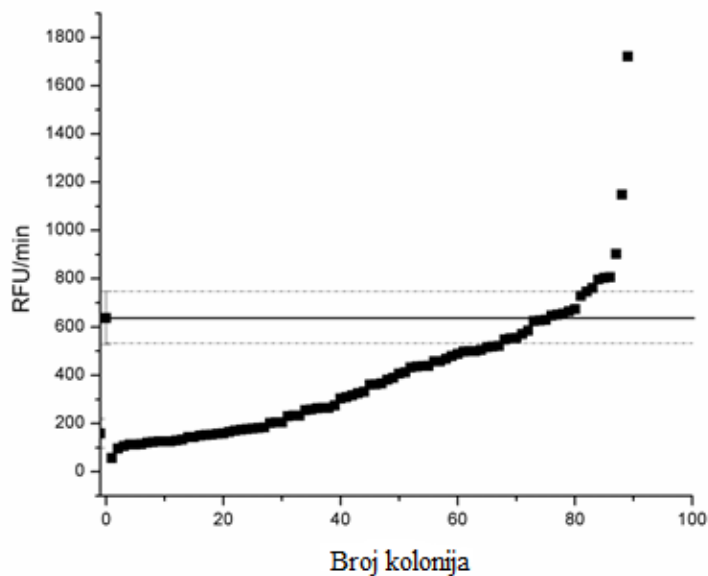


Slika 31. Zavisnost fluorescentnog signala (RFU/min) od OD na 600nm ćelija kvasca koji eksprimiraju celobioza-dehidrogenazu. Relativne fluorescentne jedinice (RFU) merene na ekscitaciji/emisiji (ex/em) talasnim dužinama 540/590nm.

Može se videti da je esej pokazao linearni odgovor na količinu dodatih ćelija potvrđujući da se može koristiti za pretragu CDH mutanata eksprimiranih na površini ćelija kvasca.

5.2.3.5. Pretraga biblioteke gena *tmCDH* u MTP sa resazurinskim esejem

Biblioteka gena napravljena PCR-om sklonom greškama od *tmCDH* roditeljskog gena je bila eksprimirana u *S. cerevisiae* EBY100 ćelijama. Klonovi su prebačeni sa agar ploča u bunare mikrotitar ploča u tečni YNB CAA glukozni medijum i rasle na 30 °C u toku 48h do zasićenja, razblaženi 4 puta sa YNB CAA galaktoznim medijumom da bi se indukovala ekspresija CDH, na 25 °C u toku 24h i aktivnost ćelijske suspenzije je merena u MTP-u, Slika 32.



Slika 32. Pretraga biblioteke gena tmCDH-pCTCON2 u MTP-u. Aktivnost je merena u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu pH 5,5 sa 0,1 mM resazurinom i 10 mM laktozom u toku 30 minuta. Relativne fluorescentne jedinice (RFU/min) su merene na ex/em 540/590nm.

Dva mutanta su nađena iz ove bibliotke sa višom aktivnošću nego roditeljski tmCDH mutant, H5 i H9.

5.2.3.6. Kinetička karakterizacija CDH mutanata na površini ćelija kvasca

Mutanti koji pokazuju višu aktivnost od roditeljskog gena su detaljnije kinetički okarakterisani u imobilizovanoj formi na površini ćelija kvasca i njihovi geni su sekvencirani, Tabela 4.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 4. Kinetika za supstrate za različite mutante. Esej je rađen u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu pH 5,5 i 0,1 mM resazurinu, laktoza/celobioza (različite koncentracije) i merene na ex/em 540/590nm.

	Laktoza		Cellobiose		<i>Mutations</i>
	<i>V_{max}</i> (RFU*10 ⁵ / OD*min)	<i>K_M</i> (mM)	<i>V_{max}</i> (RFU*10 ⁵ / OD*min)	<i>K_M</i> (μM)	
tmCDH	1,70±0,11	0,144±0,063	2,71±0,05	2,7±0,4	D20N, A64T, V529M
H5	2,80±0,16	0,225±0,099	3,51±0,18	5,5±1,3	D20N, A64T, V529M, V22A, T99T
H9	3,53±0,24	0,654±0,245	3,13±0,16	4,5±1,2	D20N, A64T, V529M, T84A, A261P, E674G, S715N

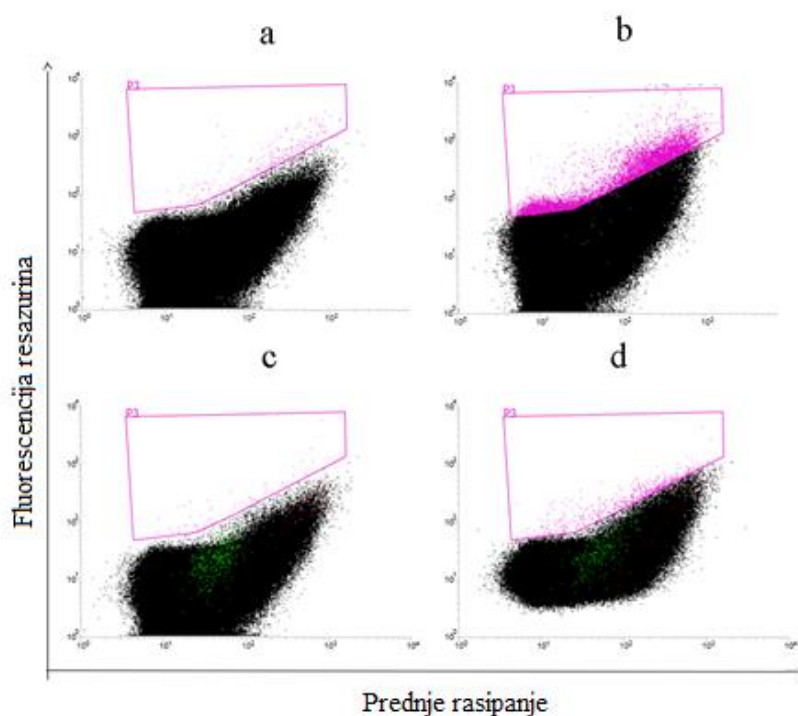
Može se videti iz kinetičkih podataka da H5 i H9 mutanti imaju 1,6 i 2 puta povećan, po redu, V_{max} u poređenju sa roditeljskim enzimom koji je već pokazao aktivnost na površini ćelije dok wtCDH nije imao merljivu aktivnost. Oba mutanta imaju povećane K_M vrednosti, ali pošto je pretraživanje rađeno na visokoj koncentraciji supstrata oni su bili odabrani iz biblioteke zbog povišene vrednosti V_{max} .

5.2.3.7. Merenje reakcije protočnim citometrom

Da bi se isprobalo da li postoji potencijal korišćenja razvijenog resazurinskog eseja za detekciju CDH aktivnosti pomoću protočnog citometra u

REZULTATI I DISKUSIJA

voda-u ulju-u vodi duplim emulzijama serije enzimskih reakcija je postavljeno i analizirano protočnim citometrom. Slika 33.



Slika 33. Analiza protočnog citometra resazurinskog eseja za aktivnost celobioza-dehidrogenaze u dvostrukim emulzijama. a) Emulzije sa resazurinom, b) rastvoran enzim, c) ćelije koje ne ekspimiraju CDH u emulziji, d) ćelije koje ekspimiraju tmCDH u emulziji. Grafici pokazuju dvostruki histogram prednjeg rasipanja (eng. forward scattering) i fluorescencije resazurina.

Može se primetiti populacija kapljica sa povećanom crvenom fluorescencijom koja je vidljiva sa enzimskom reakcijom postavljenom sa rastvornim enzimom nasuprot slepoj probi. Takođe je uočena i manja populacija kapljica sa povećanom fluorescencijom u slučaju ćelija ubačenih unutar dvostrukih emulzija koje ekspimiraju aktivni tmCDH nasuprot ćelija bez ekspimirane CDH.

5.3. Ekspresija i prečišćavanje odabranih mutanata CDH u kvascu *P. pastoris* i karakterizacija

5.3.1. Kloniranje odabranih mutanata CDH u *Pichia pastoris*

Geni divljeg soja *cdh* i mutanata su klonirani u pPICZ α A, transformisani u *E. coli* i transformantima je proverena dužina. Dobra dužina od 5,5 kb je nađena u nekoliko klonova i oni su izolovani, linearizovani sa *MssI* enzimom i prečišćeni.

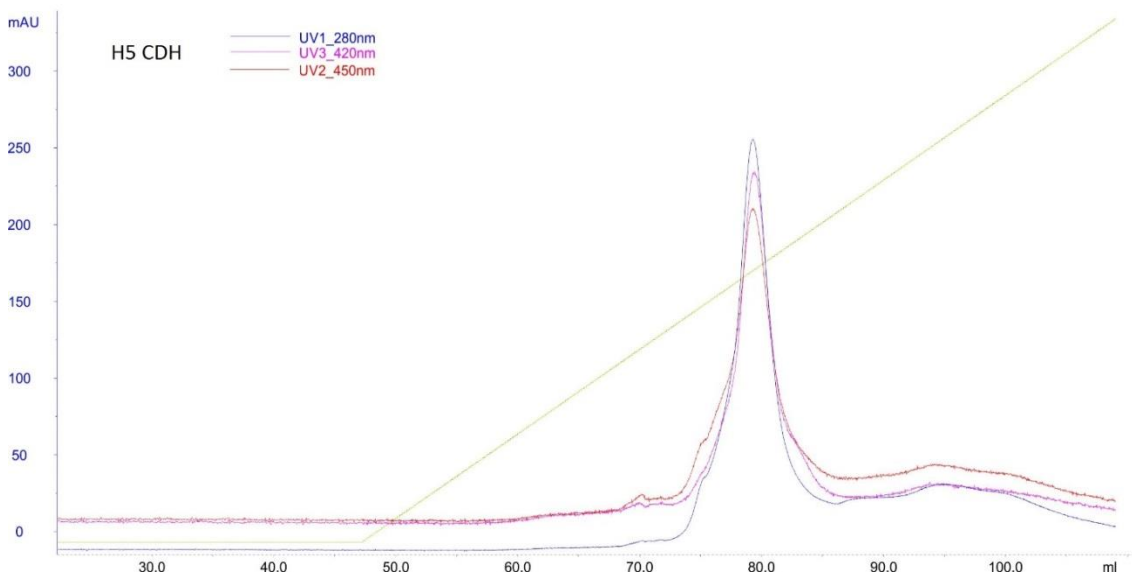
Linearizovani geni su korišćeni za transformaciju *P. pastoris* KM71H i transformisani kvasac je zasejan na YPDS ploče sa 100 μ g/mL zeocina.

5.3.2. Ekspresija i prečišćavanje mutanata

Fermentacija je urađena u *Pichia pastoris* KM71H u puferisanom minimalnom glicerolnom medijumu i posle dva dana rasta ćelije su centrifugirane i koncentrovane 5 puta u puferisanom minimalnom metanolnom medijumu. Optimalno vreme fermentacije za najveću proizvodnju CDH je određeno merenjem aktivnosti CDH u fermentacionoj tečnosti svakih 24h u toku 8 dana od početka metanolne indukcije. Maksimalna proizvodnja CDH se kretala od oko 2000 IU/L za H5 mutant do 420 IU/L za H9 mutant i bila je dostignuta posle 4 dana od metanolne indukcije nakon čega se nije značajno menjala. Slično optimalno vreme ekspresije je ranije dobijeno za ekspresiju CDH u *P. pastoris* koristeći pPIC9K vektor [175]. Za ekspresiju mutanata CDH je zbog toga korišćeno 6 dana metanolne indukcije da bi se dobila maksimalna stopa ekspresije i da bi se ostalo u srednjem platou aktivnosti CDH u fermentacionoj tečnosti. Mi smo dobili višu stopu ekspresije nego prethodno dobijenu za divlji tip CDH koristeći *P. pastoris* KM71H soj koja je iznosila 221 IU/L [188].

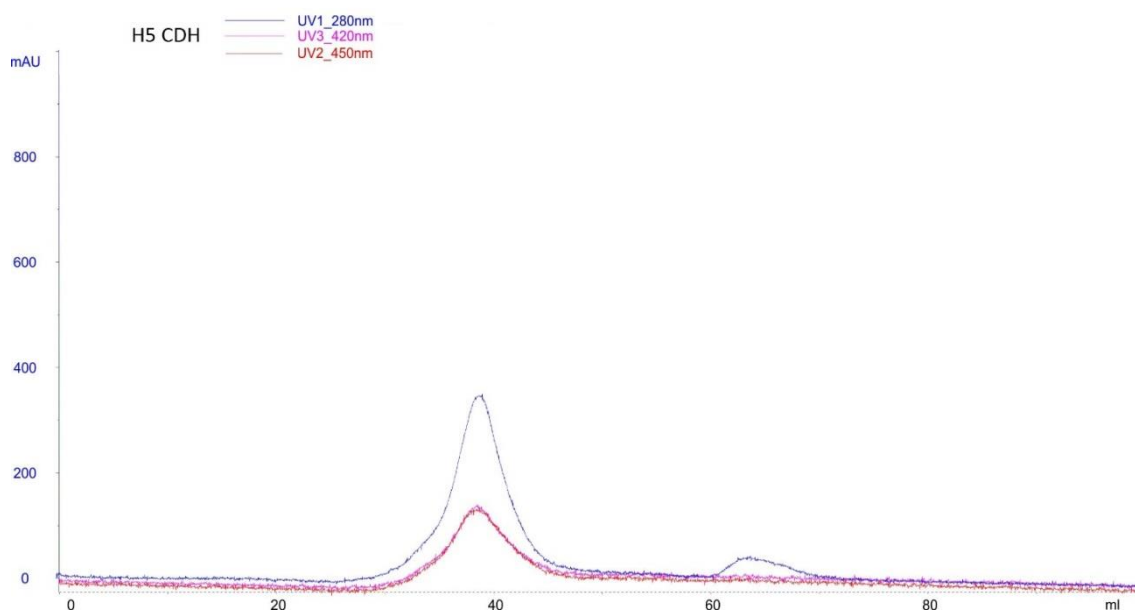
REZULTATI I DISKUSIJA

Ćelije su uklonjene centrifugiranjem i supernatant je koncentrovan membranom sa cut-off od 50 kDa, dijalizovan naspram 10 mM natrijum fosfatnog pufera pH 6,0. Dijalizovani uzorak je nanet na jonoizmenjivačku kolonu DEAE Toyopearl i eluiran sa gradijentom soli u istom puferu (Slika 34.), a potom prečišćen na gel hromatografiji Toyopearl HF55 (Slika 35.).



Slika 34. Primer jono-izmenjivačkog hromatograma za H5 CDH izolovan iz *Pichia pastoris* KM71H.

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 35 Primer gel filtracionog hromatograma za H5 CDH izolovan iz *Pichia pastoris* KM71H.

Faktor prečišćavanja koji je definisan kao odnos specifičnih aktivnosti pre i posle prečišćavanja je između 7,3 i 16 za različite mutante, dok je prinos prečišćavanja koji je definisan kao procenat enzimske aktivnosti dobijene posle prečišćavanja bio između 8 i 29 %. Specifične aktivnosti za prečišćeni wt, D2, H5 i H9 CDH mutante su po redu iznosili 20,4; 17,3; 28,7 i 14,2 IU/mg (Tabela 5 i 6.).

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5 Tabela prečišćavanja za CDH. FT- fermentaciona tečnost, UF- ultrafiltrat, DEAE- uzorak posle jonoizmenjivačke hromatografije, GF- uzorka posle gel filtracije. Cp- koncentracija proteina, Ac- enzimaska aktivnost, V- zapremina, Y- prinos prečišćavanja, Pf- faktor prečišćavanja, SA- enzimaska aktivnost.

	wtCDH			
	<i>FT</i>	<i>UF</i>	<i>DEAE</i>	<i>GF</i>
Cp (mg/mL)	0,57	0,72	0,59	0,22
Ac (IU/mL)	4,04	8,86	8,1	4,49
V (mL)	50	12	5	6
Y (%)	100	53	20	14
Pf	1	1,73	1,28	2,88
SA (IU/mg)	7,1	12,3	13,7	20,4

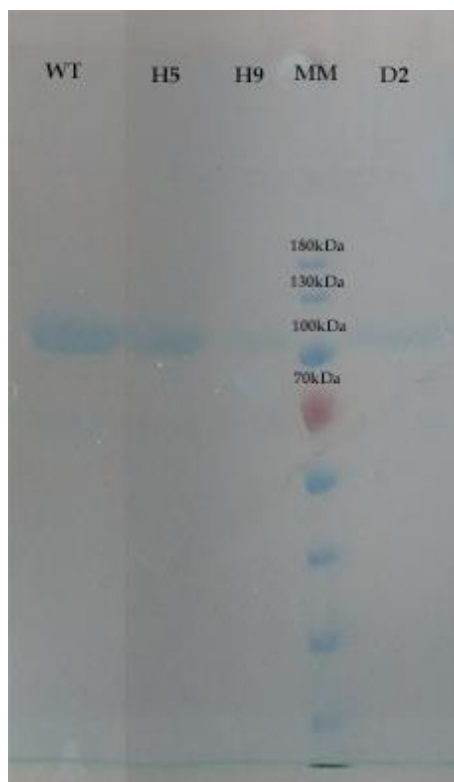
REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 6 Tabela prečišćavanja za mutante CDH. FT- fermentaciona tečnost, UF- ultrafiltrat, DEAE- uзорak posle jonoizmenjivačke hromatografije, GF- uzorka posle gel filtracije. Cp- koncentracija proteina, Ac- enzimska aktivnost, V- zapremina, Y- prinos prečišćavanja, Pf- faktor prečišćavanja, SA- enzimska aktivnost.

	D2 CDH				H5 CDH				H9 CDH			
	FT	UF	DEAE	GF	FT	UF	DEAE	GF	FT	UF	DEAE	GF
Cp (mg/mL)	0,44	0,22	0,23	0,063	0,52	0,45	0,74	0,17	0,46	0,2	0,15	0,024
Ac (IU/mL)	0,67	2,45	4,61	1,08	1,99	7,3	16,5	4,89	0,42	1,1	1,87	0,34
V (mL)	50	12	3	5	50	12	3	6	50	12	3	5
Y (%)	100	88	42	17	100	88	50	29	100	63	27	8,2
Pf	1	7,31	13,16	11,35	1	4,23	5,82	7,51	1	6,02	13,6	15,5
SA (IU/mg)	1,53	11,1	20,04	17,3	3,83	16,2	22,2	28,7	0,92	5,5	12,5	14,2

Da bi se utvrdila čistoća dobijenih mutanata CDH, enzimi su analizirani proteinskom elektroforezom. Molekularna masa kloniranih CDH je određena sa proteinskom elektroforezom, koja pokazuje traku oko 100 kDa za eksprimirani enzim u *P. pastoris* (Slika 36.).

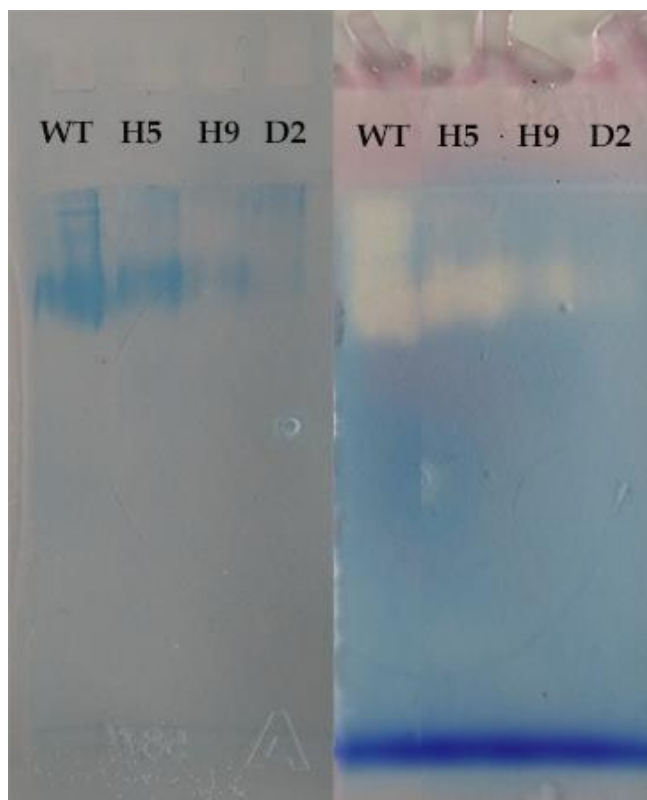
REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 36. SDS elektroforeza na 10% razdvajajućem gelu. Uzorci su prečišćeni enzimi: 1.) wtCDH, 2.) H5 CDH, 3.) H9 CDH, 4.) MM, 5.) D2 CDH mutant.

Elektroforeza je pokazala jedanu proteinsku traku u svim uzorcima sa molekularnom masom od 100 kDa koja je slična molekularnoj masi prirodnog CDH iz *P. chrysosporium* od 97 kDa [189] i isto kao 100 kDa za opisani rekombinantni CDH eksprimiran u *Pichia pastoris* [175, 189].

Nativna poliakrilamidna gel elektroforeza i zimogram su rađeni da bi se proverila čistoća proteina. Bojenje gela CBB-om posle native elektroforeze je pokazalo da prečišćeni enzimi imaju traku na poliakrilamidnom gelu koja se poklapa sa pozicijom trake aktivnosti detektovane od strane zimograma koristeći DCIP i laktozu (Slika 37.).



Slika 37. Nativna elektroforeza na 10% razdvajajućem gelu. Uzorci: 1) wtCDH prečišćen, 2) H5CDH prečišćen i 3) D2CDH prečišćen. Sa leve strane a) pokazuje nativnu elektroforezu obojenu srebrom i b) zimogram sa 0,3 mM DCIP, 30 mM laktoza i 0,1 M natrijum fosfatnim puferom pH 4,5.

Proteini su čisti, zbog simetričnog pika proteina na jonoizmenjivačkoj hromatografiji koji odgovaraju aktivnosti CDH i poklapanja traka aktivnosti na zimogramu.

5.3.3. Karakterizacija mutanata

Posle potvrde čistoće kinetičke konstante enzima za laktozu i celobiozu su određene za sve prečišćene mutante merenjem enzimske aktivnosti sa različitim koncentracijama supstrata i unošenjem dobijenih podataka direktno u Mihaelis-Mentenovu jednačinu (Tabela 7).

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 7 Kinetičke konstante prečišćenih mutanata za laktozu i celobiozu sa DCIP kao elektron akceptorom.

	Lactose			Cellobiose		
	K_m / mM	k_{cat} / s ⁻¹	k_{cat}/K_m / mM ⁻¹ s ⁻¹	K_m / μM	k_{cat} / s ⁻¹	k_{cat}/K_m / mM ⁻¹ s ⁻¹
wt CDH	3,49	35,7	10,2	168	29,8	177
D2 CDH	0,95	19,5	20,5	54,3	23,2	427
H5 CDH	3,25	43,5	13,4	140	34,5	247
H9 CDH	0,17	22,5	132	10,6	33,7	3180

Mutirani proteini proizvedeni u *Pihiji pastoris* su imali povećane K_m vrednosti u odnosu na iste varijante eksprimirane u imobilizovanoj formi na površini ćelija *S.cerevisiae* kao himere sa Aga2 proteinom, dok su H5 i H9 mutanti zadržali više k_{cat} u poređenju sa njihovim roditeljskim tmCDH i u rastvornoj i u imobilizovanoj formi. Razlog povećanog K_m može biti promenjena konformacija CDH proteina pri ekspresiji kao himera sa Aga2 proteinom.

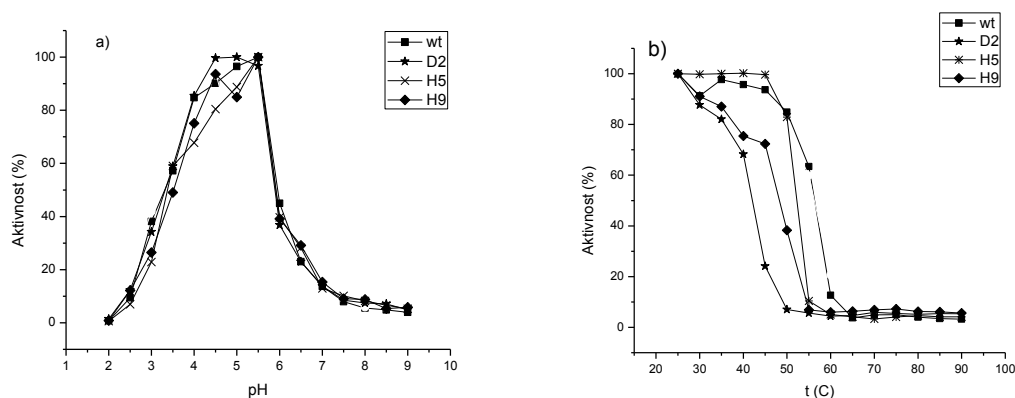
Može se videti da su svi mutanti povećali k_{cat} vrednost za laktozu koristeći DCIP kao elektron akceptor u odnosu na prethodno objavljene vrednosti za k_{cat} 8,2 s⁻¹ za divlji tip CDH enzima *P. chrysosporium* KCCM 60256 soja rekombinantno eksprimiranom u *P. pastoris* X33 [189]. Vrednosti k_{cat} za celobiozu za sve mutante su takođe veće od k_{cat} vrednosti prethodno objavljenih 6,27 s⁻¹ za divlji tip CDH enzima *P. chrysosporium* KCCM 60256 soja rekombinantno eksprimiranom u *P. pastoris* X33 [189]. Ovi podaci su pokazali da mutanti koje smo dobili imaju mnogo više aktivnosti za laktozu nego prethodno opisane varijante CDH i da mogu biti dobri kandidati za upotrebu kao biokatalizatori za proizvodnju laktobionske i celobionske kiseline [190].

Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) kao jedan od najvažnijih parametara za enzim koji se koristi u biosenzorima [191] je najviša za mutant H9 za laktozu (132 mM⁻¹s⁻¹) i celobiozu (3180 μM⁻¹s⁻¹). U poređenju sa prethodno objavljenim vrednostima za divlji tip enzima CDH iz *P. chrysosporium* KCCM 60256 soja rekombinantno eksprimiranom u *P. pastoris* X33 (laktoza: 24,1 mM⁻¹s⁻¹,

REZULTATI I DISKUSIJA

celobiozu: $29,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) [189] može se videti da je naš mutant H9 imao mnogo veću konstantu specifičnosti i za laktozu i za celobiozu. Zbog toga je izuzetno dobar kandidat za upotrebu u biosenzorima sa povećanom osetljivošću na laktozu i celobiozu.

Optimum pH je meren sa McIlvaine puferom. Vrhunac aktivnosti merenih na različitim pH vrednostima je kod wtCDH i mutanata H5, H9 i D2CDH primećena na pH 3,5 - 6,5 sa širokim opsegom pH vrednosti (Slika 38.a)). pH optimum nije značajno promenjen za sve mutante.



Slika 38. a) Efekti pH na aktivnost wtCDH i mutanata koristeći 0,3 mM DCIP kao elektron akceptor i 30 mM laktozu u McIlvaine puferu pH 2,0 - 9,0. Vrednosti su pokazane kao srednja vrednost tri merenja. b) Efekat temperature na aktivnost wtCDH i mutanata sa esejem rađenim u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu pH 4,5 sa 0,3 mM DCIP i 30 mM laktozom. Uzorci su mereni na različitoj temperaturi u toku 15 minuta i ohlađeni na ledu. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost tri merenja.

Vrhunac aktivnosti je bio na pH 5,5. Enzimi su pokazali stabilnost sa 50% relativne aktivnosti od pH 3,0 - 6,0. Optimum pH za prirodni CDH je pH 6,0 i pH 4,0 do 4,5 za direktan elektron transfer [182]. Najviša aktivnost u jednoj studiji je dobijena na pH 4,0 za flavinski domen [180].

REZULTATI I DISKUSIJA

Optimalna temperatura za aktivnost wtCDH i mutante CDH je od 20 – 55 °C sa DCIP – om kao elektron akceptorom (Slika 38.b)) što odgovara literaturnim podacima [44]. Većina mutanata je pokazala nižu rezidualnu aktivnost od wtCDH između 45 i 52 °C. Pošto su mutanti D2, H5 i H9 imali višu aktivnost i dobijeni su od tmCDH, a on od wtCDH, kao roditeljskog gena tokom eksperimenata dirigovane evolucije niža termostabilnost novo dobijenih mutanata u odnosu na wtCDH je bila očekivana i u saglasnosti je sa prethodnim eksperimentima gde su mutanti sa povećanom aktivnošću imali gubitak stabilnosti [192]. Poredeći termostabilnost prirodne CDH koja je zadržala oko 65 % svoje aktivnosti posle 15 minuta inkubiranja na 55 °C, D2, H5 i H9 mutanti su pokazali manju termostabilnost sa oko 5-10 % aktivnosti posle inkubiranja na 55 °C.

6. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji su uspešno klonirani celobioza-dehidrogenaza u pYES2, pCTCON2 i pPICZ α A vektor, razvijena je metoda visoko efikasne pretrage biblioteke gena celobioza-dehidrogenaze i okarakterisani su dobijeni mutanti tokom čega je uočeno sledeće:

- ❖ S137N mutant proizveden u kvascu *S. cerevisiae* Invsc1 je pokazao dva puta veću aktivnost od divljeg tipa CDH proizvedenog u istom soju, sa delimično pomerenim pH optimumom i sličnim temperaturnim profilom. M65S mutant je pokazao 1,6 puta veću aktivnost od divljeg tipa za laktozu, a M685V 1,14 puta veću aktivnost za celobiozu od divljeg tipa.
- ❖ Uspešno je testiran sistem ekspresije u vidu himere glukoza-oksidadze sa Aga2 proteinom na površini ćelija kvasca. Mutanti sa većom aktivnošću u nativnom obliku, takođe pokazuju veću aktivnost i u konstrukt sa Aga2, što ukazuje da se dobijeni konstrukt može koristiti za dirigovanu evoluciju GOx i razvoj visoko efikasnih metoda pretraživanja, jer je njegova aktivnost proporcionalna aktivnosti nativne GOx.
- ❖ Razvijen je novi fluorescentni esej i optimizovan koristeći 0,1 mM resazurin, 10 mM laktozu i 0,1 M natrijum fosfatni pufer pH 5,5 na ekscitaciji/emisiji 540/590nm za merenje aktivnosti CDH. Dobijen je linearni odgovor fluorescencije na povećanje koncentracije CDH.
- ❖ Gen za *cdh* je uspešno kloniran u pCTCON2 plazmid i napravljena je biblioteka gena od trostrukog mutanta CDH (D20N, A64T i V592M), jer wtCDH nije pokazao merljivu aktivnost.
- ❖ Fluorescentni esej baziran na resazurinu za detekciju CDH aktivnostina površini ćelija kvasca je optimizovan u MTP za pronalaženje mutanata sa poboljšanom aktivnošću. Esej je pokazao

ZAKLJUČAK

potencijal za detekciju CDH aktivnosti i protočnom citometrijom. Razvijeni resazurinski esej i ekspresioni sistem se može koristiti za pronalaženje boljih CDH biokatalizatora u vidu celih ćelija u eksperimentima dirigovane evolucije. Mutanti H5 i H9 sa povišenom aktivnošću prema laktozi na površini ćelija kvasca su pronađeni.

- ❖ Tri mutanta CDH (H5, H9 i D2) nađeni tokom dirigovane evolucije enzima na površini ćelija kvasca su klonirani iz pCTCON2 u pPICZ α vektor nizvodno od α -faktora za ekstracelularnu ekspresiju u *P. pastoris* KM71H pod metanolnom indukcijom. Prečišćeni mutanti su imali masu od 100 kDa, proverenu SDS elektroforezom.
- ❖ Mutanti proizvedeni u *P. pastoris* (H5, H9 i D2) su pokazali veću aktivnost za laktozu i celobiozu u odnosu na prethodno opisane CDH varijante enzima. Visoka katalitička konstanta od 43,5 s⁻¹ H5 mutanta ga čini veoma obećavajućim biokatalizatorom za proizvodnju laktobionske kiseline, dok visoka konstanta specifičnosti mutanta H9 od 132 mM⁻¹s⁻¹ ga čini odličnim biokatalizatorom za upotrebu u biosenzorima. Razvijeni ekspresioni sistemi za nove mutante CDH koji su opisani u ovom radu mogu biti od značaja za proizvodnju laktobionske kiseline i razvoj biosenzora sa većom osetljivošću za laktozu i celobiozu.

7. PRILOG

7.1. Prilog prajmeri

Prajmeri za kloniranje celobioza-dehidrogenaze u pYES2 i pravljenje biblioteka u pYES2 vektoru

FP ATCGAATTCATGAGATTCCTTCAATTTT

RP ATCTCTAGATCAAGGACCTCCCGCAAGCG

Prajmeri za kloniranje celobioza-dehidrogenaze u pCTCON2 i pravljenje biblioteka u pCTCON2 vektoru

FP ATGCTAGCCAGAGTGCCTCACAGTTTACC

RP ATGGATCCTCAAGGACCTCCCGCAAG

Prajmeri za kloniranje celobioza-dehidrogenaze u pPICZ α A vector

FP ATGAATTCCAGAGTGCCTCACAGTTTACC

RP ATTCTAGATCAAGGACCTCCCGCAAG

Prajmeri za kloniranje glukoza-oksidaze u pCTCON2 vektor

FP ATCGCTAGCAGCAATGGCATTGAAGC

RP ATCGGATCCTCCCTGCATGGAAGC

7.2. Prilog 2

Poravnanje sekvenci 28 CDH sekvenci koristeći Pubmed COBALT server (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?CMD=Web>).

Q01738.1 Cellobiose dehydrogenase cellobiose dehydrogenase [*Phanerochaete chrysosporium*]; CAA61359.1 cellobiose dehydrogenase [*Phanerochaete chrysosporium*]; 2118247A cellobiose dehydrogenase [*Phanerochaete chrysosporium*]; KIP11283.1 cellobiose dehydrogenase [*Phlebiopsis gigantea* 11061_1 CR5-6]; BAD36748.1 cellobiose dehydrogenase [*Irpex lacteus*]; AGE45679.1 cellobiose dehydrogenase [*Phlebia lindtneri*]; AGS09130.1 cellobiose dehydrogenase [*Trametes sanguinea*]; XP_007363678.1 cellobiose dehydrogenase [*Dichomitus squalens* LYAD- 421 SS1]; AAC32197.1 cellobiose dehydrogenase [*Trametes cinnabarina*]; RDX41638.1 cellobiose dehydrogenase [*Polyporus brumalis*]; AGS09131.1 cellobiose dehydrogenase [*Cerrena unicolor*]; BAC20641.1 cellobiose dehydrogenase [*Grifola frondosa*]; JT10842.1 Cellobiose dehydrogenase [*Trametes pubescens*]; ANA11091.1 cellobiose dehydrogenase [*Trametes velutina*]; AO32063.1 cellobiose dehydrogenase [*Trametes versicolor*]; BAD32781.1 cellobiose dehydrogenase [*Coniophora puteana*]; XP_007774356.1 cellobiose dehydrogenase [*Coniophora puteana* RWD-64-598 SS2]; EMD36613.1 cellobiose dehydrogenase [*Gelatoporia subvermispora* B]; ACF60617.1 cellobiose dehydrogenase [*Gelatoporia subvermispora*]; AAO64483.1 cellobiose dehydrogenase [*Athelia rolfsii*]; XP_007387326.1 cellobiose dehydrogenase [*Punctularia strigosozonata* HHB-11173 SS5]; KXN88673.1 Cellobiose dehydrogenase [*Leucoagaricus* sp. SymC.cos]; ESK89469.1 cellobiose dehydrogenase [*Moniliophthora roreri* MCA 2997]; ESK87577.1 cellobiose dehydrogenase [*Moniliophthora roreri* MCA 2997]; PBK71428.1 cellobiose dehydrogenase [*Armillaria solidipes*]; PBK88946.1 cellobiose dehydrogenase [*Armillaria gallica*]; ATJ01065.1 cellobiose dehydrogenase [*Volvariella volvacea*]; KLO11658.1 cellobiose dehydrogenase [*Schizopora paradoxa*]; KEP50503.1 cellobiose dehydrogenase [*Rhizoctonia solani* 123E].

sp Q01738.1 CDH_PHACH	I	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V
emb CAA61359.1	I	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V	
prf 2118247A	I	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V		
qb KIP11283.1	I	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V		
dbj BAD36748.1	I	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V		
qbi AGE45679.1	I	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V		
qb AGS09130.1	I	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V		
ref XP_007363678.1	V	A	F	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
qb AAC32197.1	I	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V		
qb RXD41638.1	I	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V		
qb AGS09131.1	V	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
dbj BAC20641.1	V	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
qb JUT10842.1	V	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
qb ANA11091.1	V	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
qb IAO32063.1	V	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
dbj BAD32781.1	V	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
qb IAO32063.1	V	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
dbj BAD32781.1	V	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
ref XP_007774356.1	V	S	F	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
qb EMD36613.1	V	S	F	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
qb ACF60617.1	L	S	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
qb IAO64483.1	L	S	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T	H	K	W	V	F	R	C	G	G	T	E	W	N	N	G	G	---	I	D	V	T	S	G	V	L	A	F	S	N	V	A	V			
ref XP_007387326.1	L	A	L	G	G	A	M	N	D	L	L	L	V	A	W	A	N	G	N	O	I	V	S	S	T	R	W	A	T	G	Y	V	O	P	T	A	Y	T	G	A	T	L	L	T	L	P	E	T	T	I	N	S	T																																			

7.3. Prilog 3: NetNGlyc 1.0 Server – rezultati predviđanja

Ime: Sekvenca Dužina: 755

QSASQFTDPTTGFQFTGITDPVHDVTYGFVFPPLATSGAQSTEFIGEVEVAPIASKWIGIALGGAMNNDLLLVAWANGNQI	80
VSTRWATGYVQPTAYTGTATLTLPETIINSTHWKWWVFCQCGCTEWNNGGGIDVTSQGVLAWAFSNVAVDDPSDPQSTF	160
SEHTDFGFFGIDYSTAHSANYQNYLNGDSCGNPTTSTKPTSTSSVTTGPTVSATPYDYIIVGAGPGGIIAADRLSEAGK	240
KVLLLERGGPSTKQTGGTYVAPWATSSGLTKFDIPGLFESLFTDSNPFWWCKDITVFAGCLVGGGTSVNGALYWYPNDGD	320
FSSVGVWPSWTNHAPYTSKLSRLPSTDHPSTDGQRYLEQSFNVVSQLKGGYQATINDNPNYKDHVFGYSAFDFLN	400
GKRAGPVATYLTALARPNTFKTNVMVSNVVRNGSQILGVQTNPTLGPNGFIPVTPKGRVILSAGAFGTSRILFQSGI	480
GPTDMIQTVQSNPTAAAAALPPQNQWINLPVGMNAQDNPSINLVFTHPSIDAYENWADVWSNPRPADAAQYLANQSGVFAG	560
ASPKLNFWRAYSGSDGFTRYAQGTVRPGAASVNSSLPYNASQIFITITVYLSTGIQSRGRIGIDAALRGTVLTPPWLVPV	640
DKTVLLQALHDVVSNISSIPGLTMITPDVTQTLLEYVDAYDPATMNSNHVSSITIGSSPQSAVVDSNVKVFGTNNLFIV	720
DAGIIPHLPTGNPQGTLMSSAAEQAAAAILALAGGP	720
.....	80
.....N.....	160
.....N.....	240
.....	320
.....	400
.....N.....	480
.....N.....N.....	560
.....N.....	640
.....	720
.....	800

(Prag=0.5)

Ime sekvenca	Pozicija	Potencijal	Porota	N-Glyc Rezultat dogovora
Sekvenca	111 NSTH	0.5406	(7/9)	+
Sekvenca	191 NPTT	0.5042	(5/9)	+ WARNING: PRO-X1.
Sekvenca	419 NFTF	0.4533	(6/9)	-
Sekvenca	434 NGSQ	0.5574	(7/9)	+
Sekvenca	492 NPTA	0.5879	(6/9)	+ WARNING: PRO-X1.
Sekvenca	517 NPSI	0.6024	(8/9)	+ WARNING: PRO-X1.
Sekvenca	553 NQSG	0.4408	(7/9)	-
Sekvenca	593 NSSL	0.4753	(6/9)	-
Sekvenca	599 NASQ	0.6196	(8/9)	+

7.4. Prilog 4: NetOGlyc 3.1 Server - rezultati predviđanja

Ime: Sekvenca Dužina: 755

QSASQFTDPTTGFQFTGITDPVHDVYGFVFPPLATSGAQSTEFIGEVVAPIASKWIGIALGGAMNNDLLLVAWANGNQI
 VSSIRWATGYVQPTAYTGTATLTLPEITINSIHWKWWFRCQGCTEWNNGGGIDVTSQGVLAWAFSNVAVDDPSDPQSTF
 SEHTDFGFFGIDYSTAHSANYQNYLNGDSGNPTTSTKPTSTSSSVTTGPTVSATPYDYIIVGAGPGGIIAADRLSEAGK
 KVLLELGGPSTKQTGGTYVAPWATSSGLTKFDIPGLFESLFTDSNPFWWCKDITVFAGCLVGGGTSVNGALYWYPNDGD
 FSSVGVWSSWTNHAPYTSKLSRLPSTDHPSTDGQRYLEQSFNVVSQLKGGQYNQATINDNPNYKDHVFGYSADFNLN
 GK RAGPVATYLQALARPNTFKTNMVSNNVVRNGSQILGVQTNDP TLGPNGFIPVTPKGRVILSAGAFGTSRILFQSGI
 GPTDMIQTVQSNPTAAAAALPPQNQWINLPVGMNAQDNPSINLVFTHPSIDAYENWADVWSNPRPADAAQYLANQSGVFAG
 ASPKLNFWRAYSGSDGFTRYAQGTVRPGAASVNSSLPYNASQIFITITVYVYLSGQSRGRIGIDAALRGTVLTPPWLVNPV
 DKTVLLQALHDVVSNISSIPGLTMITPDVTQTLEEVVDAYDPATMNSNHVVSSTIGSSPQSAVVDSNVKVFGTNNLFIV
 DAGIIPHLPTGNPQGTLM SAAEQAAA KILALAGGP

.....T.....

TTT.T..TSTSSS.TT..T...T.....

T.....

 ..T.....

Ime	S/T	Poz	G-rez	I-rez	Y/N	Komentar
Sekvenca	S	2	0.461	0.019	.	-
Sekvenca	S	4	0.435	0.031	.	-
Sekvenca	T	7	0.507	0.064	T	-
Sekvenca	T	10	0.440	0.397	.	-
Sekvenca	T	11	0.440	0.021	.	-
Sekvenca	T	16	0.345	0.055	.	-
Sekvenca	T	19	0.361	0.190	.	-
Sekvenca	T	26	0.348	0.059	.	-
Sekvenca	T	36	0.406	0.300	.	-
Sekvenca	S	37	0.251	0.025	.	-
Sekvenca	S	41	0.241	0.042	.	-
Sekvenca	T	42	0.333	0.068	.	-
Sekvenca	S	54	0.118	0.078	.	-

PRILOG

Sekvenca	S	82	0.129	0.053	.	-
Sekvenca	S	83	0.145	0.040	.	-
Sekvenca	T	84	0.245	0.034	.	-
Sekvenca	T	88	0.336	0.077	.	-
Sekvenca	T	94	0.455	0.201	.	-
Sekvenca	T	97	0.467	0.124	.	-
Sekvenca	T	99	0.443	0.032	.	-
Sekvenca	T	101	0.400	0.035	.	-
Sekvenca	T	103	0.396	0.098	.	-
Sekvenca	T	104	0.372	0.090	.	-
Sekvenca	T	108	0.321	0.019	.	-
Sekvenca	T	109	0.264	0.060	.	-
Sekvenca	S	112	0.176	0.023	.	-
Sekvenca	T	113	0.228	0.022	.	-
Sekvenca	T	125	0.167	0.051	.	-
Sekvenca	T	136	0.178	0.180	.	-
Sekvenca	S	137	0.122	0.083	.	-
Sekvenca	S	146	0.244	0.049	.	-
Sekvenca	S	154	0.213	0.108	.	-
Sekvenca	S	158	0.198	0.021	.	-
Sekvenca	T	159	0.318	0.207	.	-
Sekvenca	S	161	0.239	0.064	.	-
Sekvenca	T	164	0.356	0.022	.	-
Sekvenca	S	174	0.107	0.023	.	-
Sekvenca	T	175	0.152	0.044	.	-
Sekvenca	S	178	0.118	0.048	.	-
Sekvenca	S	189	0.381	0.030	.	-
Sekvenca	T	193	0.530	0.138	T	-
Sekvenca	T	194	0.515	0.067	T	-
Sekvenca	T	195	0.544	0.086	T	-
Sekvenca	S	196	0.474	0.279	.	-
Sekvenca	T	197	0.613	0.073	T	-
Sekvenca	T	200	0.690	0.270	T	-
Sekvenca	S	201	0.624	0.025	S	-
Sekvenca	T	202	0.716	0.347	T	-
Sekvenca	S	203	0.605	0.080	S	-

PRILOG

Sekvenca	S	204	0.596	0.021	S	-
Sekvenca	S	205	0.573	0.033	S	-
Sekvenca	T	207	0.686	0.303	T	-
Sekvenca	T	208	0.653	0.219	T	-
Sekvenca	T	211	0.605	0.316	T	-
Sekvenca	S	213	0.435	0.253	.	-
Sekvenca	T	215	0.545	0.024	T	-
Sekvenca	S	236	0.163	0.062	.	-
Sekvenca	S	251	0.239	0.026	.	-
Sekvenca	T	252	0.335	0.078	.	-
Sekvenca	T	255	0.327	0.081	.	-
Sekvenca	T	258	0.341	0.031	.	-
Sekvenca	T	265	0.395	0.238	.	-
Sekvenca	S	266	0.226	0.051	.	-
Sekvenca	S	267	0.200	0.028	.	-
Sekvenca	T	270	0.305	0.037	.	-
Sekvenca	S	280	0.136	0.047	.	-
Sekvenca	T	283	0.169	0.078	.	-
Sekvenca	S	285	0.101	0.032	.	-
Sekvenca	T	295	0.191	0.057	.	-
Sekvenca	T	306	0.145	0.032	.	-
Sekvenca	S	307	0.111	0.032	.	-
Sekvenca	S	322	0.208	0.071	.	-
Sekvenca	S	323	0.208	0.033	.	-
Sekvenca	S	324	0.222	0.044	.	-
Sekvenca	S	329	0.269	0.049	.	-
Sekvenca	S	330	0.259	0.019	.	-
Sekvenca	T	332	0.406	0.075	.	-
Sekvenca	T	338	0.539	0.072	T	-
Sekvenca	S	339	0.390	0.068	.	-
Sekvenca	S	342	0.356	0.067	.	-
Sekvenca	S	343	0.349	0.048	.	-
Sekvenca	S	347	0.280	0.049	.	-
Sekvenca	T	348	0.361	0.264	.	-
Sekvenca	S	352	0.251	0.165	.	-
Sekvenca	T	353	0.338	0.056	.	-

PRILOG

Sekvenca	S	362	0.121	0.031	.	-
Sekvenca	S	367	0.091	0.052	.	-
Sekvenca	T	379	0.148	0.030	.	-
Sekvenca	S	394	0.123	0.021	.	-
Sekvenca	T	409	0.218	0.036	.	-
Sekvenca	T	413	0.215	0.046	.	-
Sekvenca	T	421	0.237	0.078	.	-
Sekvenca	T	424	0.186	0.053	.	-
Sekvenca	S	429	0.121	0.073	.	-
Sekvenca	S	436	0.156	0.033	.	-
Sekvenca	T	443	0.355	0.076	.	-
Sekvenca	T	447	0.326	0.089	.	-
Sekvenca	T	457	0.375	0.368	.	-
Sekvenca	S	465	0.185	0.086	.	-
Sekvenca	T	471	0.284	0.101	.	-
Sekvenca	S	472	0.172	0.030	.	-
Sekvenca	S	478	0.192	0.052	.	-
Sekvenca	T	483	0.353	0.616	T	-
Sekvenca	T	488	0.358	0.304	.	-
Sekvenca	S	491	0.272	0.056	.	-
Sekvenca	T	494	0.383	0.306	.	-
Sekvenca	S	519	0.129	0.369	.	-
Sekvenca	T	525	0.232	0.057	.	-
Sekvenca	S	528	0.143	0.063	.	-
Sekvenca	S	540	0.186	0.115	.	-
Sekvenca	S	555	0.169	0.032	.	-
Sekvenca	S	562	0.129	0.089	.	-
Sekvenca	S	572	0.183	0.052	.	-
Sekvenca	S	574	0.193	0.037	.	-
Sekvenca	T	578	0.259	0.053	.	-
Sekvenca	T	584	0.330	0.399	.	-
Sekvenca	S	591	0.236	0.044	.	-
Sekvenca	S	594	0.228	0.025	.	-
Sekvenca	S	595	0.215	0.092	.	-
Sekvenca	S	601	0.213	0.031	.	-
Sekvenca	T	605	0.257	0.065	.	-

PRILOG

Sekvenca	T	607	0.237	0.036	.	-
Sekvenca	S	611	0.132	0.078	.	-
Sekvenca	T	612	0.197	0.026	.	-
Sekvenca	S	616	0.140	0.056	.	-
Sekvenca	T	629	0.278	0.142	.	-
Sekvenca	T	632	0.226	0.195	.	-
Sekvenca	T	643	0.258	0.040	.	-
Sekvenca	S	654	0.172	0.058	.	-
Sekvenca	S	658	0.182	0.041	.	-
Sekvenca	T	663	0.298	0.132	.	-
Sekvenca	T	666	0.294	0.079	.	-
Sekvenca	T	670	0.338	0.081	.	-
Sekvenca	T	672	0.367	0.223	.	-
Sekvenca	T	684	0.354	0.170	.	-
Sekvenca	S	687	0.282	0.023	.	-
Sekvenca	S	692	0.335	0.053	.	-
Sekvenca	S	693	0.301	0.034	.	-
Sekvenca	T	694	0.438	0.068	.	-
Sekvenca	T	695	0.402	0.108	.	-
Sekvenca	S	698	0.289	0.028	.	-
Sekvenca	S	699	0.293	0.027	.	-
Sekvenca	S	702	0.234	0.063	.	-
Sekvenca	S	707	0.229	0.023	.	-
Sekvenca	T	714	0.251	0.088	.	-
Sekvenca	T	730	0.264	0.414	.	-
Sekvenca	T	736	0.310	0.031	.	-
Sekvenca	S	739	0.221	0.113	.	-

8. LITERATURA

1. Ummartyotin, S. and H. Manuspiya, *A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2015. **41**: p. 402-412.
2. Azizi Samir, M.A.S., F. Alloin, and A. Dufresne, *Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field*. Biomacromolecules, 2005. **6**(2): p. 612-626.
3. Simon, J., et al., *Thermoplastic and biodegradable polymers of cellulose*. Polymer Degradation and Stability, 1998. **59**(1): p. 107-115.
4. Cameron, M.D., S. Timofeevski, and S.D. Aust, *Enzymology of Phanerochaete chrysosporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics*. Appl Microbiol Biotechnol, 2000. **54**(6): p. 751-8.
5. Singh, R., et al., *Microbial enzymes: industrial progress in 21st century*. 3 Biotech, 2016. **6**(2): p. 174.
6. Choi, J.M., S.S. Han, and H.S. Kim, *Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects*. Biotechnol Adv, 2015. **33**(7): p. 1443-54.
7. Johannes, T.W. and H. Zhao, *Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(3): p. 261-7.
8. Demain, A.L. and J.L. Adrio, *Contributions of microorganisms to industrial biology*. Mol Biotechnol, 2008. **38**(1): p. 41-55.
9. Falch, E.A., *Industrial enzymes--developments in production and application*. Biotechnol Adv, 1991. **9**(4): p. 643-58.
10. Kumar, V., et al., *Global scenario of industrial enzyme market*. 2014. 173-196.
11. Cameron, M.D. and S.D. Aust, *Cellobiose dehydrogenase-an extracellular fungal flavocytochrome*. Enzyme Microb Technol, 2001. **28**(2-3): p. 129-138.
12. Barr, D.P. and S.D. Aust, *Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants*. Environ Sci Technol, 1994. **28**(2): p. 78A-87A.
13. Tasca, F., et al., *Determination of lactose by a novel third generation biosensor based on a cellobiose dehydrogenase and aryl diazonium modified single wall carbon nanotubes electrode*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013. **177**: p. 64-69.
14. Lutz, S. and S.M. Iamurri, *Protein Engineering: Past, Present, and Future*, in *Protein Engineering: Methods and Protocols*, U.T. Bornscheuer and M. Höhne, Editors. 2018, Springer New York: New York, NY. p. 1-12.
15. Traxlmayr, M.W. and C. Obinger, *Directed evolution of proteins for increased stability and expression using yeast display*. Arch Biochem Biophys, 2012. **526**(2): p. 174-80.
16. Ruff, A.J., A. Dennig, and U. Schwaneberg, *To get what we aim for--progress in diversity generation methods*. FEBS J, 2013. **280**(13): p. 2961-78.

LITERATURA

17. Mack, M., et al., *A high-throughput microtiter plate-based screening method for the detection of full-length recombinant proteins*. Protein Expression and Purification, 2008. **61**(1): p. 92-98.
18. Dieter, K., et al., *Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material*. Angewandte Chemie International Edition, 2005. **44**(22): p. 3358-3393.
19. Huber, T., et al., *A critical review of all-cellulose composites*. Journal of Materials Science, 2012. **47**(3): p. 1171-1186.
20. VanderHart, D.L. and R.H. Atalla, *Studies of microstructure in native celluloses using solid-state carbon-13 NMR*. Macromolecules, 1984. **17**(8): p. 1465-1472.
21. Perez, J., et al., *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview*. Int Microbiol, 2002. **5**(2): p. 53-63.
22. Banerjee, G., J.S. Scott-Craig, and J.D. Walton, *Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective*. BioEnergy Research, 2010. **3**(1): p. 82-92.
23. F., S.S., V.W.P. G., and H. Bram, *The effects of ensiling whole crop maize with a multi-enzyme preparation on the chemical composition of the resulting silages*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1992. **60**(2): p. 223-228.
24. Béguin, P. and J.-P. Aubert, *The biological degradation of cellulose*. FEMS Microbiology Reviews, 1994. **13**(1): p. 25-58.
25. Pathak, P., N.K. Bhardwaj, and A.K. Singh, *Enzymatic deinking of office waste paper: An overview*. Vol. 22. 2010. 83-88.
26. Komaki, N., et al., *Antifungal mechanism of hinokitiol against Candida albicans*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(4): p. 735-7.
27. Srivastava, D.S., R. Kumar, and V. Singh, *Wood Decaying Fungi*. 2013.
28. Schwarze, F.W.M.R., D. Lonsdale, and S. Fink, *Soft rot and multiple T-branching by the basidiomycete Inonotus hispidus in ash and London plane*. Mycological Research, 1995. **99**(7): p. 813-820.
29. Yelle, D.J., et al., *Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete*. Environ Microbiol, 2008. **10**(7): p. 1844-9.
30. Martinez, A.T., et al., *Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin*. Int Microbiol, 2005. **8**(3): p. 195-204.
31. Green, F. and T. L. Highley, *Mechanism of Brown-Rot Decay: Paradigm or Paradox*. Vol. 39. 1997. 113-124.
32. N., P., W.G. E., and L. W., *Ultrastructural aspects of beech bark degradation by fungi*. European Journal of Forest Pathology, 1976. **6**(5): p. 274-286.
33. Blanchette, R.A., *Screening Wood Decayed by White Rot Fungi for Preferential Lignin Degradation*. Applied and Environmental Microbiology, 1984. **48**(3): p. 647-653.
34. Blanchette Robert, A., R. Obst John, and E. Timell Tore, *Biodegradation of Compression Wood and Tension Wood by White and Brown Rot Fungi*, in *Holzforschung - International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*. 1994. p. 34.

LITERATURA

35. PAUL, A. and E. KARL-ERIK, *Selective Degradation of Wood Components by White-Rot Fungi*. *Physiologia Plantarum*, 1977. **41**(4): p. 239-248.
36. Blanchette, R.A., *Delignification by Wood-Decay Fungi*. *Annual Review of Phytopathology*, 1991. **29**(1): p. 381-403.
37. Blanchette Robert, A., et al., *Evaluating Isolates of Phanerochaete chrysosporium and Ceriporiopsis subvermispora for Use in Biological Pulping Processes*, in *Holzforschung - International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*. 1992. p. 109.
38. Barr, B.K., et al., *Identification of two functionally different classes of exocellulases*. *Biochemistry*, 1996. **35**(2): p. 586-92.
39. Srisodsuk, M., et al., *Modes of action on cotton and bacterial cellulose of a homologous endoglucanase-exoglucanase pair from Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem*, 1998. **251**(3): p. 885-92.
40. Zamocky, M., et al., *Cellobiose dehydrogenase--a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotropic fungi*. *Curr Protein Pept Sci*, 2006. **7**(3): p. 255-80.
41. Roy, B.P., et al., *Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenases from the White Rot Fungus Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 1996. **62**(12): p. 4417-27.
42. Bao, W., E. Lyman, and V. Renganathan, *Optimization of cellobiose dehydrogenase and β -glucosidase production by cellulose-degrading cultures of Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994. **42**(4): p. 642-646.
43. Raices, M., et al., *Cellobiose quinone oxidoreductase from the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium is produced by intracellular proteolysis of cellobiose dehydrogenase*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1576**(1-2): p. 15-22.
44. Bao, W., S.N. Usha, and V. Renganathan, *Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **300**(2): p. 705-13.
45. Wood, J.D. and P.M. Wood, *Evidence that cellobiose:quinone oxidoreductase from Phanerochaete chrysosporium is a breakdown product of cellobiose oxidase*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1992. **1119**(1): p. 90-96.
46. Habu, N., et al., *Release of the FAD domain from cellobiose oxidase by proteases from cellulolytic cultures of Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 1993. **327**(2): p. 161-164.
47. Baminger, U., et al., *Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase from the plant pathogen Sclerotium (Athelia) rolfsii*. *Appl Environ Microbiol*, 2001. **67**(4): p. 1766-74.
48. Igarashi, K., et al., *Cellobiose dehydrogenase from the fungi Phanerochaete chrysosporium and Humicola insolens. A flavohemoprotein from Humicola insolens contains 6-hydroxy-FAD as the dominant active cofactor*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(6): p. 3338-44.

LITERATURA

49. Henriksson, G., G. Johansson, and G. Pettersson, *A critical review of cellobiose dehydrogenases*. J Biotechnol, 2000. **78**(2): p. 93-113.
50. Li, B., S.R. Nagalla, and V. Renganathan, *Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from Phanerochaete chrysosporium*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(4): p. 1329-35.
51. Eriksson, K.-E.L., N. Habu, and M. Samejima, *Recent advances in fungal cellobiose oxidoreductases*. Enzyme and Microbial Technology, 1993. **15**(12): p. 1002-1008.
52. Hallberg, B.M., et al., *A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase*. Structure, 2000. **8**(1): p. 79-88.
53. Hallberg, B.M., et al., *Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase*. J Mol Biol, 2002. **315**(3): p. 421-34.
54. Cox, M.C., et al., *Spectroscopic identification of the haem ligands of cellobiose oxidase*. FEBS Letters, 1992. **307**(2): p. 233-236.
55. Barbas, A., et al., *Rossmann-fold motifs can confer multiple functions to metabolic enzymes: RNA binding and ribonuclease activity of a UDP-glucose dehydrogenase*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **430**(1): p. 218-24.
56. Lehner, D., et al., *Small-angle X-ray scattering studies on cellobiose dehydrogenase from Phanerochaete chrysosporium*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1293**(1): p. 161-9.
57. Morpeth, F.F., *Some properties of cellobiose oxidase from the white-rot fungus Sporotrichum pulverulentum*. Biochem J, 1985. **228**(3): p. 557-64.
58. Henriksson, G., G. Johansson, and G. Pettersson, *Is cellobiose oxidase from Phanerochaete chrysosporium a one-electron reductase?* Biochim Biophys Acta, 1993. **1144**(2): p. 184-90.
59. Henriksson, G., et al., *Substrate specificity of cellobiose dehydrogenase from Phanerochaete chrysosporium*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1998. **1383**(1): p. 48-54.
60. Hallberg, B.M., et al., *Mechanism of the reductive half-reaction in cellobiose dehydrogenase*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7160-6.
61. Rotsaert, F.A., V. Renganathan, and M.H. Gold, *Role of the flavin domain residues, His689 and Asn732, in the catalytic mechanism of cellobiose dehydrogenase from phanerochaete chrysosporium*. Biochemistry, 2003. **42**(14): p. 4049-56.
62. Xu, F., et al., *Humicola insolens cellobiose dehydrogenase: cloning, redox chemistry, and "logic gate"-like dual functionality*. Enzyme Microb Technol, 2001. **28**(9-10): p. 744-753.
63. Igarashi, K., et al., *Kinetics of inter-domain electron transfer in flavocytochrome cellobiose dehydrogenase from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical Journal, 2002. **365**(Pt 2): p. 521-526.

LITERATURA

64. Kiyohiko, I., et al., *Electron transfer chain reaction of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. The FEBS Journal, 2005. **272**(11): p. 2869-2877.
65. Cameron, M.D. and S.D. Aust, *Kinetics and reactivity of the flavin and heme cofactors of cellobiose dehydrogenase from Phanerochaete chrysosporium*. Biochemistry, 2000. **39**(44): p. 13595-601.
66. Morpeth, F.F., *Some properties of cellobiose oxidase from the white-rot fungus Sporotrichum pulverulentum*. Biochemical Journal, 1985. **228**(3): p. 557-564.
67. Bao, W.J. and V. Renganathan, *Triiodide reduction by cellobiose:quinone oxidoreductase of Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett, 1991. **279**(1): p. 30-2.
68. Cohen, J.D., et al., *Resonance Raman spectroscopic studies of cellobiose dehydrogenase from Phanerochaete chrysosporium*. Arch Biochem Biophys, 1997. **341**(2): p. 321-8.
69. Samejima, M., R.S. Phillips, and K.-E.L. Eriksson, *Cellobiose oxidase from Phanerochaete chrysosporium Stopped-flow spectrophotometric analysis of pH-dependent reduction*. FEBS Letters, 1992. **306**(2): p. 165-168.
70. Renganathan, V., S.N. Usha, and F. Lindenburg, *Cellobiose-oxidizing enzymes from the lignocellulose-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium: interaction with microcrystalline cellulose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990. **32**(5): p. 609-613.
71. Ander, P., et al., *Possible Applications of Cellobiose Oxidizing and Other Flavine Adenine Dinucleotide Enzymes in the Pulp and Paper Industry*, in *Enzymes for Pulp and Paper Processing*. 1996, American Chemical Society. p. 297-307.
72. Ayers, A.R., S.B. Ayers, and K.E. Eriksson, *Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from Sporotrichum pulverulentum*. Eur J Biochem, 1978. **90**(1): p. 171-81.
73. Roy, B.P., et al., *Creation of metal-complexing agents, reduction of manganese dioxide, and promotion of manganese peroxidase-mediated Mn(III) production by cellobiose:quinone oxidoreductase from Trametes versicolor*. J Biol Chem, 1994. **269**(31): p. 19745-50.
74. Kremer, S.M. and P.M. Wood, *Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of Phanerochaete chrysosporium*. Eur J Biochem, 1992. **208**(3): p. 807-14.
75. Elmgren, M., S.-E. Lindquist, and G. Henriksson, *Cellobiose oxidase crosslinked in a redox polymer matrix at an electrode surface – a new biosensor*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1992. **341**(1): p. 257-273.
76. Nordling, M., et al., *A Combined Cellobiose Oxidase/Glucose Oxidase Biosensor for HPLC Determination On-Line of Glucose and Soluble Cellodextrines*. Analytical Biochemistry, 1993. **214**(2): p. 389-396.
77. Lindgren, A., et al., *Development of a cellobiose dehydrogenase modified electrode for amperometric detection of diphenols*. Analyst, 1999. **124**(4): p. 527-532.

LITERATURA

78. Nistor, C., et al., *In-field monitoring of cleaning efficiency in waste water treatment plants using two phenol-sensitive biosensors*. *Analytica Chimica Acta*, 2002. **456**(1): p. 3-17.
79. Samejima, M., et al., *Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose*. *Carbohydrate Research*, 1997. **305**(2): p. 281-288.
80. J. Kelleher, T., B. S. Montenecourt, and D. Eveleigh, *Cellobiose-quinone oxidoreductase – application in monitoring cellobiohydrolase purification*. Vol. 27. 1987. 299-305.
81. Safina, G., R. Ludwig, and L. Gorton, *A simple and sensitive method for lactose detection based on direct electron transfer between immobilised cellobiose dehydrogenase and screen-printed carbon electrodes*. *Electrochimica Acta*, 2010. **55**(26): p. 7690-7695.
82. Bloom, J.D. and F.H. Arnold, *In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106 Suppl 1**: p. 9995-10000.
83. Chatterjee, R. and L. Yuan, *Directed evolution of metabolic pathways*. *Trends in Biotechnology*, 2006. **24**(1): p. 28-38.
84. Cobb, R.E., T. Si, and H. Zhao, *Directed evolution: an evolving and enabling synthetic biology tool*. *Curr Opin Chem Biol*, 2012. **16**(3-4): p. 285-91.
85. Patel, S.C. and M.H. Hecht, *Directed evolution of the peroxidase activity of a de novo-designed protein*. *Protein Eng Des Sel*, 2012. **25**(9): p. 445-52.
86. Johannes, T.W., R.D. Woodyer, and H. Zhao, *Directed Evolution of a Thermostable Phosphite Dehydrogenase for NAD(P)H Regeneration*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. **71**(10): p. 5728-5734.
87. Gupta, N. and E.T. Farinas, *Directed evolution of CotA laccase for increased substrate specificity using Bacillus subtilis spores*. *Protein Eng Des Sel*, 2010. **23**(8): p. 679-82.
88. Reetz, M.T., *Directed Evolution of Enantioselective Enzymes: An Unconventional Approach to Asymmetric Catalysis in Organic Chemistry*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2009. **74**(16): p. 5767-5778.
89. Roodveldt, C., A. Aharoni, and D.S. Tawfik, *Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability*. *Curr Opin Struct Biol*, 2005. **15**(1): p. 50-6.
90. Karanicolas, J., et al., *A de novo protein binding pair by computational design and directed evolution*. *Mol Cell*, 2011. **42**(2): p. 250-60.
91. Shaffee, T., *Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity* 2014.
92. Bulter, T., et al., *Functional Expression of a Fungal Laccase in Saccharomyces cerevisiae by Directed Evolution*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003. **69**(8): p. 5037-5037.
93. Maté, D., et al., *Directed Evolution of Fungal Laccases*. *Current Genomics*, 2011. **12**(2): p. 113-122.
94. Pourmir, A. and T.W. Johannes, *Directed evolution: selection of the host organism*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2012. **2**: p. e201209012.

LITERATURA

95. Zhang, X.Z. and Y. Zhang, *Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in Bacillus subtilis*. *Microb Biotechnol*, 2011. **4**(1): p. 98-105.
96. Sorensen, H.P. and K.K. Mortensen, *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2005. **115**(2): p. 113-28.
97. Khow, O. and S. Suntrarachun, *Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012. **2**(2): p. 159-162.
98. Daly, R. and M.T. Hearn, *Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production*. *J Mol Recognit*, 2005. **18**(2): p. 119-38.
99. Cereghino, J.L. and J.M. Cregg, *Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000. **24**(1): p. 45-66.
100. Liu, Z., et al., *Laboratory evolved biocatalysts for stereoselective syntheses of substituted benzaldehyde cyanohydrins*. *Chembiochem*, 2008. **9**(1): p. 58-61.
101. Lee, C.C., et al., *An episomal expression vector for screening mutant gene libraries in Pichia pastoris*. *Plasmid*, 2005. **54**(1): p. 80-5.
102. Tawfik, D.S., *Directed enzyme evolution: Screening and selection methods*. *Methods in molecular biology Vol. 230 edited by Frances H. Arnold and George Georgiou*. 2003.: Totowa, NJ: Humana Press. 383 pages. *Directed evolution library creation: Methods and protocols*. *Methods in molecular biology, Vol. 231, edited by Frances H. Arnold and George Georgiou*. 2003. Totowa, NJ: Humana Press. 224 pages. *Directed molecular evolution of proteins: Or how to improve enzymes for biocatalysis, edited by Susanne Brackmann and Kay Johnsson*. 2002. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. 357 pages. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 2004. **13**(10): p. 2836-2837.
103. Arnold, F. and G. Georgescu, *Directed evolution library creation: methods and protocols*. Vol. 230. 2003.
104. van Maris, A.J., et al., *Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative Saccharomyces cerevisiae, yielding a C2-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(1): p. 159-66.
105. Rakestraw, J.A., et al., *Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2009. **103**(6): p. 1192-201.
106. Bulter, T., V. Sieber, and M. Alcalde, *Screening mutant libraries in Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*, 2003. **230**: p. 99-107.
107. Morawski, B., S. Quan, and F.H. Arnold, *Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2001. **76**(2): p. 99-107.
108. Lee, S.M., T. Jellison, and H.S. Alper, *Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2012. **78**(16): p. 5708-16.

LITERATURA

109. Scott, J.K. and G.P. Smith, *Searching for peptide ligands with an epitope library*. Science, 1990. **249**(4967): p. 386-90.
110. Tanaka, T., et al., *Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **95**(3): p. 577-91.
111. Domingo-Calap, P., P. Georgel, and S. Bahram, *Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools*. HLA, 2016. **87**(3): p. 133-40.
112. McCafferty, J., et al., *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*. Nature, 1990. **348**(6301): p. 552-4.
113. Francisco, J.A., et al., *Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(22): p. 10444-10448.
114. Hanes, J. and A. Pluckthun, *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 4937-42.
115. Boder, E.T. and K.D. Wittrup, *Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(6): p. 553-7.
116. Beerli, R.R., et al., *Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14336-41.
117. Hockney, R.C., *Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli*. Trends Biotechnol, 1994. **12**(11): p. 456-63.
118. Delhalle, S., J.C. Schmit, and A. Chevigne, *Phages and HIV-1: from display to interplay*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(4): p. 4727-94.
119. Georgiou, G., et al., *Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines*. Nature Biotechnology, 1997. **15**: p. 29.
120. Kondo, A. and M. Ueda, *Yeast cell-surface display--applications of molecular display*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **64**(1): p. 28-40.
121. Mei, M., et al., *Application of modified yeast surface display technologies for non-Antibody protein engineering*. Microbiological Research, 2017. **196**: p. 118-128.
122. Benatuil, L., et al., *An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries*. Protein Eng Des Sel, 2010. **23**(4): p. 155-9.
123. Lipke, P.N. and J. Kurjan, *Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins*. Microbiol Rev, 1992. **56**(1): p. 180-94.
124. Lipke, P.N., D. Wojciechowicz, and J. Kurjan, *AG alpha 1 is the structural gene for the Saccharomyces cerevisiae alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(8): p. 3155-65.
125. *Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha- agglutinin and beta 1,6-glucan in the Saccharomyces cerevisiae cell wall*. The Journal of Cell Biology, 1995. **128**(3): p. 333-340.

LITERATURA

126. Jochens, H. and U.T. Bornscheuer, *Natural diversity to guide focused directed evolution*. *Chembiochem*, 2010. **11**(13): p. 1861-6.
127. Xiaojiang, F., et al., *Enhancing the Efficiency of Directed Evolution in Focused Enzyme Libraries by the Adaptive Substituent Reordering Algorithm*. *Chemistry - A European Journal*, 2012. **18**(18): p. 5646-5654.
128. Nobili, A., et al., *Use of 'small but smart' libraries to enhance the enantioselectivity of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* towards tetrahydrofuran-3-yl acetate*. *FEBS J*, 2013. **280**(13): p. 3084-93.
129. Liang, C., et al., *Directed evolution of a thermophilic endoglucanase (Cel5A) into highly active Cel5A variants with an expanded temperature profile*. *J Biotechnol*, 2011. **154**(1): p. 46-53.
130. Verma, R., U. Schwaneberg, and D. Roccatano, *Computer-Aided Protein Directed Evolution: a Review of Web Servers, Databases and other Computational Tools for Protein Engineering*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2012. **2**: p. e201209008.
131. Reetz, M.T., et al., *Iterative Saturation Mutagenesis Accelerates Laboratory Evolution of Enzyme Stereoselectivity: Rigorous Comparison with Traditional Methods*. *Journal of the American Chemical Society*, 2010. **132**(26): p. 9144-9152.
132. Kirsch, R.D. and E. Joly, *An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes*. *Nucleic Acids Research*, 1998. **26**(7): p. 1848-1850.
133. Peng, R.H., A.S. Xiong, and Q.H. Yao, *A direct and efficient PAGE-mediated overlap extension PCR method for gene multiple-site mutagenesis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006. **73**(1): p. 234-40.
134. Herman, A. and D.S. Tawfik, *Incorporating Synthetic Oligonucleotides via Gene Reassembly (ISOR): a versatile tool for generating targeted libraries*. *Protein Eng Des Sel*, 2007. **20**(5): p. 219-26.
135. Seyfang, A. and J.H. Jin, *Multiple site-directed mutagenesis of more than 10 sites simultaneously and in a single round*. *Anal Biochem*, 2004. **324**(2): p. 285-91.
136. Shivange, A.V., et al., *Advances in generating functional diversity for directed protein evolution*. *Curr Opin Chem Biol*, 2009. **13**(1): p. 19-25.
137. Wong, T.S., D. Zhurina, and U. Schwaneberg, *The diversity challenge in directed protein evolution*. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2006. **9**(4): p. 271-88.
138. Wong, T.S., et al., *A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution*. *J Mol Biol*, 2006. **355**(4): p. 858-71.
139. McCullum, E.O., et al., *Random mutagenesis by error-prone PCR*. *Methods Mol Biol*, 2010. **634**: p. 103-9.
140. Wong, T.S., et al., *Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution*. *Nucleic Acids Research*, 2004. **32**(3): p. e26-e26.
141. Bradel-Tretheway, B.G., Z. Zhen, and S. Dewhurst, *Effects of codon-optimization on protein expression by the human herpesvirus 6 and 7 U51 open reading frame*. *J Virol Methods*, 2003. **111**(2): p. 145-56.

LITERATURA

142. Zhou, Z., et al., *Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in Escherichia coli by codon optimization*. *Protein Expr Purif*, 2004. **34**(1): p. 87-94.
143. Wu, X., et al., *Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in Escherichia coli: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **313**(1): p. 89-96.
144. Yanofsky, C., E.C. Cox, and V. Horn, *The unusual mutagenic specificity of an E. Coli mutator gene*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966. **55**(2): p. 274-281.
145. Greener, A., M. Callahan, and B. Jerpseth, *An efficient random mutagenesis technique using an E. coli mutator strain*. *Methods Mol Biol*, 1996. **57**: p. 375-85.
146. Stemmer, W.P., *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*. *Nature*, 1994. **370**(6488): p. 389-91.
147. Coco, W.M., et al., *DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes*. *Nat Biotechnol*, 2001. **19**(4): p. 354-9.
148. Zhao, H., et al., *Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination*. *Nat Biotechnol*, 1998. **16**(3): p. 258-61.
149. Jackel, C., P. Kast, and D. Hilvert, *Protein design by directed evolution*. *Annu Rev Biophys*, 2008. **37**: p. 153-73.
150. Yuan, L., et al., *Laboratory-directed protein evolution*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. **69**(3): p. 373-92.
151. Leemhuis, H., R.M. Kelly, and L. Dijkhuizen, *Directed evolution of enzymes: Library screening strategies*. *IUBMB Life*, 2009. **61**(3): p. 222-8.
152. Watt, A.P., et al., *Higher throughput bioanalysis by automation of a protein precipitation assay using a 96-well format with detection by LC-MS/MS*. *Anal Chem*, 2000. **72**(5): p. 979-84.
153. Duetz, W.A., *Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods*. *Trends Microbiol*, 2007. **15**(10): p. 469-75.
154. Autour, A. and M. Ryckelynck, *Ultrahigh-Throughput Improvement and Discovery of Enzymes Using Droplet-Based Microfluidic Screening*. *Micromachines*, 2017. **8**(4).
155. Becker, S., et al., *Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts*. *Curr Opin Biotechnol*, 2004. **15**(4): p. 323-9.
156. Yang, G. and S.G. Withers, *Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution*. *Chembiochem*, 2009. **10**(17): p. 2704-15.
157. Santoro, S.W. and P.G. Schultz, *Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(7): p. 4185-90.
158. Lee, S.Y., J.H. Choi, and Z. Xu, *Microbial cell-surface display*. *Trends Biotechnol*, 2003. **21**(1): p. 45-52.
159. Chen, I., B.M. Dorr, and D.R. Liu, *A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(28): p. 11399-404.

LITERATURA

160. Catherine, C., et al., *Cell-free platforms for flexible expression and screening of enzymes*. *Biotechnology Advances*, 2013. **31**(6): p. 797-803.
161. Guo, M.T., et al., *Droplet microfluidics for high-throughput biological assays*. *Lab Chip*, 2012. **12**(12): p. 2146-55.
162. Miller, O.J., et al., *Directed evolution by in vitro compartmentalization*. *Nat Methods*, 2006. **3**(7): p. 561-70.
163. Wang, B.L., et al., *Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption*. *Nature Biotechnology*, 2014. **32**: p. 473.
164. Stapleton, J.A. and J.R. Swartz, *Development of an in vitro compartmentalization screen for high-throughput directed evolution of [FeFe] hydrogenases*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15275.
165. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(17): p. 5421-6.
166. Twigg, R.S., *Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin*. *Nature*, 1945. **155**: p. 401.
167. Nakayama, G.R., et al., *Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro*. *J Immunol Methods*, 1997. **204**(2): p. 205-8.
168. Guerin, T.F., et al., *Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms*. *Lett Appl Microbiol*, 2001. **32**(5): p. 340-5.
169. Pfaller, M.A. and A.L. Barry, *Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994. **32**(8): p. 1992-1996.
170. Peeters, E., H.J. Nelis, and T. Coenye, *Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates*. *J Microbiol Methods*, 2008. **72**(2): p. 157-65.
171. Mariscal, A., et al., *Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009. **82**(4): p. 773-83.
172. Prodanovic, R., et al., *Ultrahigh-throughput screening system for directed glucose oxidase evolution in yeast cells*. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2011. **14**(1): p. 55-60.
173. McIlvaine, T.C., *A buffer solution for colorimetric comparison*. *J Biol Chem*, 1921. **49**: p. 183-186.
174. Sygmund, C., et al., *Semi-rational engineering of cellobiose dehydrogenase for improved hydrogen peroxide production*. *Microb Cell Fact*, 2013. **12**: p. 38.
175. Yoshida, M., et al., *Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris**. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001. **65**(9): p. 2050-7.
176. Li, B., S.R. Nagalla, and V. Renganathan, *Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium**. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. **62**(4): p. 1329-1335.

LITERATURA

177. Chu, F.K. and F. Maley, *The effect of glucose on the synthesis and glycosylation of the polypeptide moiety of yeast external invertase*. J Biol Chem, 1980. **255**(13): p. 6392-7.
178. Zhu, Z., et al., *Directed evolution of glucose oxidase from Aspergillus niger for ferrocenemethanol-mediated electron transfer*. Biotechnol J, 2007. **2**(2): p. 241-8.
179. Kovacevic, G., et al., *Cloning, heterologous expression, purification and characterization of M12 mutant of Aspergillus niger glucose oxidase in yeast Pichia pastoris KM71H*. Mol Biotechnol, 2014. **56**(4): p. 305-11.
180. Desriani, S. Ferri, and K. Sode, *Functional expression of Phanerochaete chrysosporium cellobiose dehydrogenase flavin domain in Escherichia coli*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(6): p. 855-9.
181. Porter, J.L., C.A. Collyer, and D.L. Ollis, *Compensatory stabilizing role of surface mutations during the directed evolution of diene lactone hydrolase for enhanced activity*. Protein J, 2015. **34**(1): p. 82-9.
182. Tasca, F., et al., *Comparison of direct and mediated electron transfer for cellobiose dehydrogenase from Phanerochaete sordida*. Anal Chem, 2009. **81**(7): p. 2791-8.
183. Stapleton, P.C., et al., *Molecular cloning of the cellobiose dehydrogenase gene from Trametes versicolor and expression in Pichia pastoris*. Enzyme and Microbial Technology, 2004. **34**(1): p. 55-63.
184. Ostafe, R., et al., *Ultra-high-throughput screening method for the directed evolution of glucose oxidase*. Chem Biol, 2014. **21**(3): p. 414-21.
185. Momeu, I.C., *Improving glucose oxidase properties by directed evolution*. 2007.
186. Sheldon, R.A., *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2007. **349**(8-9): p. 1289-1307.
187. Rampersad, S.N., *Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays*. Sensors (Basel, Switzerland), 2012. **12**(9): p. 12347-12360.
188. Desriani, S. Ferri, and K. Sode, *Amino acid substitution at the substrate-binding subsite alters the specificity of the Phanerochaete chrysosporium cellobiose dehydrogenase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **391**(2): p. 1246-1250.
189. Choi, H.S., et al., *Production and characterization of cellobiose dehydrogenase from Phanerochaete chrysosporium KCCM 60256 and its application for an enzymatic fuel cell*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2016. **33**(12): p. 3434-3441.
190. Alonso, S., M. Rendueles, and M. Díaz, *Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects*. Biotechnology Advances, 2013. **31**(8): p. 1275-1291.
191. Ludwig, R., et al., *Cellobiose Dehydrogenase: A Versatile Catalyst for Electrochemical Applications*. ChemPhysChem, 2010. **11**(13): p. 2674-2697.
192. Siddiqui, K.S., *Defying the activity-stability trade-off in enzymes: taking advantage of entropy to enhance activity and thermostability*. Critical Reviews in Biotechnology, 2017. **37**(3): p. 309-322.

LITERATURA

Biografija

Marija Blažić rođena je 14. Jula 1987. godine u Prijedoru, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu i srednju medicinsku školu, smer laboratorijski tehničar, završila je u Prijedoru. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, upisala je 2006. godine. Diplomirala je 28. jula 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,23 i ocenom 10 na diplomskom radu. Master studije biohemije na Hemijskom fakultetu upisala je 2010. godine i diplomirala 09. Septembra 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,87 i ocenom 10 na master radu. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer biohemija, upisala je 2011. godine.

Od 01.06.2012. do 31.12.2013. zaposlena je kao istraživač pripravnik u Centru za Hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu na projektu „Ispitivanja odnosa struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zoda enzimskim inženjeringom” (Rukovodilac projekta dr Ksenija Radotić Hadži-Manić). Od 01.01.2014. do danas zaposlena je kao istraživač saradnik u Centru za Hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu na istom projektu.

Dobitnik je stipendije FEBS short term fellowship programa zahvaljujući kojoj boravi dva meseca na usavršavanju u Fraunhofer institutu (Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology) u Ahenu, Nemačka.

Do sada je objavila pet radova u međunarodnim časopisima, od kojih tri kao prvi autor. Imala je šest saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Блажић

Број индекса ДБ10/2011

Изјављујем

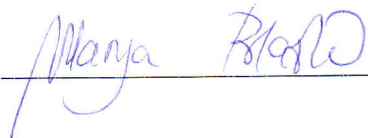
Да је докторска дисертација под насловом

Протеински инжењеринг и развој високо ефикасних метода за претраживање библиотеке гена целобиоза-дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* за повећање ензимске активности

- Резултат сопственог истраживачког рада;
- Да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- Да су резултати коректно наведени и
- Да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 10.04.2019.године

Потпис аутора



**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Марија Блажић

Број индекса ДБ10/2011

Студијски програм Биохемија

Наслов рада **Протеински инжењеринг и развој високо ефикасних метода за претраживање библиотеке гена целобиоза-дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* за повећање ензимске активности**

Ментор др Радивоје Продановић

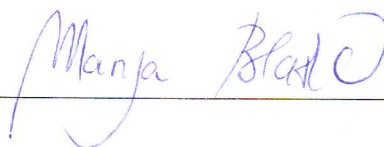
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 10.04.2019.године

Потпис аутора



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под називом:

Протеински инжењеринг и развој високо ефикасних метода за претраживање библиотеке гена целобиоза-дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* за повећање ензимске активности

као моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

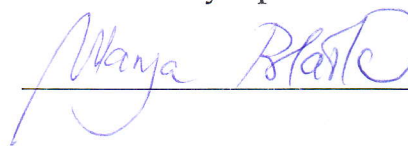
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 10.04.2019.године

Потпис аутора



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство - некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално - без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство - без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.