

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Gordana N. Kovačević

**Proteinski inženjering i razvoj visoko efikasnih
metoda za pretraživanje biblioteke gena
glukoza-oksidaze iz *Aspergillus niger* u cilju
povećanja enzimske aktivnosti i stabilnosti**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Gordana N. Kovačević

Protein engineering and development of high-throughput screening methods for *Aspergillus niger* glucose-oxidase gene library toward higher enzyme activity and stability

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTOR:

dr Radivoje Prodanović

vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Marija Gavrović-Jankulović

redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Rada Baošić

vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jasmina Nikodinović-Runić

naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE

ZAHVALNICA

Ova disertacija je urađena na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Ovom prilikom želim da se zahvalim mentoru Prof Radivoju Prodanoviću na prilici koju mi je pružio, pomoći i savetima koje mi je davao tokom eksperimentalnog rada i pisanja, kao i studioznom i temeljnom čitanju.

Zahvaljujem se Prof Mariji Gavrović-Jankulović na pomoći, posebno u prvom godinama izrade ove disertacije, kao i savetima do njenog završetka.

Članovima komisije Prof Radi Baošić i dr Jasmini Nikodinović-Runić se zahvaljujem na savetima i sugestijama koji su pomogli u oblikovanju ovog rada.

Specijalno se zahvaljujem dr Raluki Ostafe sa Instituta za Molekularnu Biotehnologiju, Ahen, Nemačka, bez čije pomoći i saveta ove disertacije ne bi bilo.

Zahvaljujem se kolegama iz laboratorije 412 na podršci i naročito na trenucima neobuzdanog smeha ☺, a zajedno sa kolegama iz laboratorija 429 i 434 na druženju i lepim trenucima koje smo delili svih ovih godina.

Danici se zahvaljujem na beskrajnim kafama, filozofskim i ozbiljnim raspravama, a najviše što je bila tu i imala prave reči onda kada je to bilo najpotrebnije. Igoru se zahvaljujem na zanimljivim i edukativnim razgovorima i što je verovao u ovu disertaciju.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima na dugogodišnjoj podršci, bratu i njegovoj porodici na razumevanju koje su imali, ujaku Miši i ujni Zorici na pomoći i podršci koju su pružali.

**Proteinski inženjering i razvoj visoko efikasnih metoda za
pretraživanje biblioteke gena glukoza-oksidadze iz *Aspergillus niger* u cilju
povećanja enzimske aktivnosti i stabilnosti**

SAŽETAK

Glukoza-oksidadza (GOx) je važan industrijski enzim koji se predominantno koristi kao biokatalizator u industriji hrane za proizvodnju glukonske kiseline, uklanjanje kiseonika i sterilizaciju. U farmaceutskoj industriji i kliničkoj biohemiji se koristi kao biosenzor za određivanje koncentracije glukoze, dok postoje pokušaji da se iskoristi i za proizvodnju biogorivnih ćelija koje proizvode električnu energiju koristeći glukozu i kiseonik iz ljudske krvi u okvirima nanobiotehnologije. Za rasprostranjeniju primenu GOx neophodno je unaprediti neke od njenih osobina kao što su aktivnost, pH optimum, reaktivnost sa kiseonikom i stabilnost. Jedna od metoda kojom se unapređuju proteini je dirigovana evolucija. Ova metoda podrazumeva iterativne tehnike generisanja biblioteka proteinskih mutanata (ili varijanti) i selekciju proteina sa odgovarajućom željenom funkcijom iz ovih biblioteka.

U cilju pronalaženja mutanata GOx iz *Aspergillus niger* koji su oksidativno stabilniji i aktivniji, u ovom radu su razvijene dve metode pretraživanja bazirane na ekspresiji proteina na površini ćelija kvasca. Pored razvoja metoda pretraživanja ispitivana je i optimizacija ekspresije rekombinantne GOx u kvascu *Pichia pastoris* za heterolognu ekspresiju mutanata GOx i njihovu kinetičku karakterizaciju.

Oksidacija bočnih ostataka amino kiselina je jedan od glavnih razloga nestabilnosti native trodimenzionalne strukture GOx. Posebno osetljiv prema oksidaciji je metionin, koji se prevodi u metionin-sulfoksid čak i pod blagim uslovima u prisustvu kiseonika i kiseoničnih reaktivnih vrsta kao što su vodonik-peroksid, superoksid anjon radikal i drugi. Da bi utvrdili uticaj

pozicije metionina na oksidativnu stabilnost GOx, svih 11 metionina je razmatrano za mesto specifičnu mutagenezu.

Ekspresija na površini ćelija kvasca je napravila prekretnicu u razvoju metoda za analizu biblioteka mutanata, zbog brze i jeftine selekcije eukariotskih proteina. Prednost ovog sistema predstavlja povezanost genotipa i fenotipa eksprimiranog proteina. Pošto ćelije kvasca imobilizuju enzim na površini, ovaj sistem omogućava uklanjanje egzogenog vodonik-peroksida korišćenog za destabilizaciju i oksidaciju GOx što je neophodno da bi se izmerila rezidualna aktivnost enzima. U prisustvu vodonik-peroksida a bez prisustva glukoze GOx je inaktivirana u manjoj meri, dok je inaktivacija brža kada se enzim nalazi u redukovanoj formi tj kada vrši oksidaciju glukoze.

Metioninski ostaci koji se nalaze na površini enzima imaju malo uticaja na oksidativnu stabilnost, kao i oni koji se nalaze u unutrašnjosti ali ne blizu aktivnog mesta. Mutacije na metioninskim ostacima koji se nalaze u blizini aktivnog mesta najviše doprinose oksidativnoj stabilnosti GOx, uz zadržavanje sličnog nivoa aktivnosti kao divlji tip GOx. Na osnovu dobijenih rezultata rezidualne aktivnosti, pokazano je da se kvasci koji eksprimiraju enzime na svojoj površini mogu koristiti za pretraživanje oksidativno stabilnih mutanata, naročito za enzime čije određivanje aktivnosti se zasniva na endogeno proizvedenom vodonik-peroksidu.

Do sada je razvijeno nekoliko metoda za pretraživanje biblioteka GOx baziranih na protočnoj citometriji, a najefikasnijom se do sada pokazala metoda obeležavanja fluorescentnim tiramidom ćelija kvasaca koje eksprimiraju na svojoj površini GOx. Ovom metodom je moguće kvantitativno odrediti ćelije sa enzimskom varijantom povećane aktivnosti, ali intenzitet fluorescencije zavisi i od količine proteina eksprimirane na površini ćelija. Da bi uprostiti kvantifikaciju eksprimiranog enzima na površini kvasca, testirana je upotreba yGFP kao fuzionog partnera sa GOx gde bi intenzitet fluorescencije yGFP bio mera količine eksprimiranog proteina. U jednoj rundi sortiranja, populacija

enzimskih varijanti sa većom srednjom vrednosti aktivnosti od srednje vrednosti aktivnosti wtGOx je povećana na 44% nakon sortiranja, što je bolji rezultat u poređenju sa 36% dobijenih u prethodnom istraživanju.

Primenom razvijenih metoda pretraživanja biblioteka mutanata zasnovanih na protočnoj citometriji i ekspresiji proteina na površini ćelija kvasca u okviru teze je pronađeno nekoliko mutanata GOx sa povećanom aktivnošću i oksidativnom stabilnošću, što ih čini dobrim kandidatima za primenu u biosenzorima i biogorivnim ćelijama.

Ključne reči: glukoza-oksidaza, visoko efikasne metode pretraživanja, oksidativna stabilnost, ekspresija na površini ćelija kvasca, zeleni fluorescentni protein, *Pichia pastoris*

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj: 577.152

Protein engineering and development of high-throughput screening methods for *Aspergillus niger* glucose-oxidase gene library toward higher enzyme activity and stability

ABSTRACT

Glucose-oxidase (GOx) is an important industrial enzyme that is predominantly used as a biocatalyst in the food industry for the production of gluconic acid, oxygen removal and sterilization. In the pharmaceutical industry and clinical biochemistry it is used as a biosensor for determining glucose concentration, while there are attempts to utilize it in the production of biofuel cells that produce electricity using glucose and oxygen from human blood within the framework of nanobiotechnology. For the widespread use of GOx it is necessary to improve some of its properties such as activity, pH optimum, reactivity with oxygen and stability. One of the methods for improving proteins is directed evolution. This method involves iterative techniques for generating libraries of protein mutants (or variants) and selecting proteins with the desired function from these libraries.

In order to find GOx mutants from *Aspergillus niger* that are oxidatively more stable and active, in this work two methods of screening based on protein expression on the surface of yeast cells have been developed. In addition to the development of the screening methods, the optimization of the expression of recombinant GOx in yeast *Pichia pastoris* for heterologous expression of GOx mutants and their kinetic characterization was studied.

Aminoacid side chain oxidation is one of the main causes for structural instability of native tridimensional structure of GOx. Particularly sensitive to oxidation is methionine residue, which is converted to methionine sulfoxide even under mild conditions in the presence of oxygen and oxygen reactive species such as hydrogen peroxide, superoxide anion radical and others. In order to determine the effect of the position of the methionine amino acid

residue on the oxidative stability of GOx, all 11 methionines were considered for site directed mutagenesis.

The expression on the surface of the yeast cells has made a turning point in the development of methods for analyzing mutant libraries, due to quick and inexpensive selection of eukaryotic proteins. The advantage of this system is the association between the genotype and phenotype of the expressed protein. Since yeast cells immobilize the enzyme on the surface, this system allows the removal of exogenous hydrogen peroxide used for destabilization and oxidation of GOx which is necessary to measure the residual activity of the enzyme. In the presence of hydrogen peroxide and without the presence of glucose, GOx is inactivated to a lesser degree, while inactivation is faster when the enzyme is in reduced form, ie when glucose oxidation happens without the presence of oxygen.

Methionine residues on the surface of the enzyme have little effect on oxidative stability, as well as those that are inside but not close to the active site. Mutations on methionine residues near the active site mostly contribute to the oxidative stability of GOx, while retaining a similar level of activity as wild type GOx. Based on the results for oxidative stability obtained on YSD and on polymer immobilization, it has been shown that yeast cells expressing enzymes on their surface could be used for screening of oxidatively stable mutants, especially for enzymes whose determination of activity is based on endogenously produced hydrogen peroxide.

So far, several methods based on flow cytometry screening of GOx libraries have been developed, and the most effective method has been the fluorescent tyramid labeling of the yeast cells that express GOx on its surface. By this method it is possible to quantitatively determine the cells expressing enzymatic variant with increased activity, but the fluorescence intensity also depends on the amount of protein expressed on the surface of the cells. In order to improve the quantification of expressed enzymes on the yeast surface, the

use of yGFP as a fusion partner with GOx was tested, where the intensity of yGFP fluorescence would be the measure of the amount of expressed protein. In one round of sorting, the enzyme population with a higher mean activity than the mean value of the wtGOx activity was increased to 44%, which is a better result compared to 36% obtained in the previous study.

Using developed methods for mutant library screening based on flow cytometry and protein expression on the surface of yeast cells, in this work several GOx mutants with increased activity and oxidative stability were found, making them suitable for use in biosensors and biofuel cells.

Key words: glucose oxidase, high-throughput screening, oxidative stability, yeast surface display, green fluorescent protein, *Pichia pastoris*

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

UDK number: 577.152

LISTA SKRAĆENICA

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

AOX - alkohol-oksidaža

APCC - amino-fenoksi-karboksi-kumarin

APS - amonijum-persulfat

BMGH - eng. *buffered minimal glycerol histidine*

BMMH - eng. *buffered minimal methanol histidine*

BSA - albumin iz seruma govečeta (eng. *bovine serum albumin*)

CAA - eng. *casamino acids*

CBB - eng. *Comasie Brilliant Blue*

CC - karboksi-kumarin

Chl - hloramfenikol

DEAE - dietilaminoetil

DMSO - dimetilsulfoksid

DTT - ditionitritol

EDTA - etilendiamin-tetrasirćetna kiselina

EGFP - *enhanced* zeleni fluorescentni protein

FACS - protočni citometar (eng. *fluorescent activated cell sorter*)

FAD - flavin-adenin-dinukleotid

FCC - eng. *frozen competent cells*

Gal - galaktoza

GFP - zeleni fluorescentni protein (eng. *green fluorescent protein*)

Glc - glukoza

GODA - eng. *glucose-oxidase detection assay*

GOx - glukoza-oksidaža

HA - hemaglutinin

HPLC - tečna hromatografija visokih performansi

HRP – peroksidaza iz rena

HTS – eng. *high-throughput screening*

IVC – *in vitro* kompartmentalizacija

LB – Luria-Bertani

Mal – maltoza

Man – manoza

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza

PBS – puferisani fiziološki rastvor (eng. *phosphate buffered saline*)

PCR – eng. *polymerase chain reaction*

PIPES – piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska kiselina)

SDS – natrijum-dodecil-sulfat

SSC – eng. *side scatter*

TBE – tris-borat-edta

TEMED - 1,2-Bis(dimetilamino)etan

TRIS - *tris*(hidroksimetil)aminometan

ViPer – vanadijum-bromo-peroksidaza

WT – prirodni tip (eng. *wild type*)

yGFP – *yeast enhanced* zeleni fluorescentni protein

YNB – eng. *yeast nitrogen base*

YPD – eng. *yeast peptone dextrose*

YSD – eng. *yeast surface display*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Glukoza-oksidaža	3
2.1.1. Strukturne i kinetičke karakteristike glukoza-oksidaže	4
2.1.2. Mehanizam reakcije glukoza-oksidaže	6
2.1.3. Stabilnost glukoza-oksidaže	9
2.1.4. Značaj i upotreba glukoza-oksidaže	11
2.2. Proteinski inženjering	12
2.2.1. Nasumična mutageneza	14
2.2.2. Polu-racionalni dizajn	15
2.2.3. Proteinski inženjering glukoza-oksidaže	15
2.3. Ekspresioni sistemi	16
2.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ekspresioni sistem	16
2.3.2. <i>Pichia pastoris</i> ekspresioni sistem	17
2.3.3. Post-translacione modifikacije i stabilnost heterolognih proteina	19
2.4. Metode za pretraživanje biblioteka gena	21
2.4.1. In vivo kompartmentalizacija	23
2.4.2. „High-throughput screening“ glukoza-oksidaže	25
2.5. Zeleni fluorescentni protein (<i>GFP</i>)	27
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	30
4. MATERIJAL I METODE	31
4.1. Materijal	31
4.1.1. Izvor gena za glukoza-oksidažu	31
4.1.2. Izvor gena za zeleni fluorescentni protein	31
4.1.3. Vektori i sojevi	31
4.2. Mikrobiološke metode	32
4.2.1. Podloge za rast bakterija	32
4.2.2. Podloge za rast kvasaca	34
4.2.3. Pripremanje kompetentnih ćelija	36
4.3. Molekularno-biološke metode	38
4.3.1. Kloniranje gena za zeleni fluorescentni protein u pCTCON2 vektor	39

4.3.2. Kloniranje glukoza-oksidadnog gena u pCTCON2 i GFP-pCTCON2 vektor	41
4.3.3. Kloniranje glukoza-oksidadnog gena u pPICZ α A vektor	42
4.3.4. Pravljenje saturacionih biblioteka glukoza-oksidade u pCTCON2 vektoru.....	44
4.3.5. Pravljenje kombinovanih mutanata glukoza-oksidade u pCTCON2 i pPICZ α A vektoru.....	45
4.3.6. Pravljenje biblioteke glukoza-oksidade u GFP-pCTCON2 vektoru .	45
4.3.7. Transformacija kompetentnih E. coli ćelija.....	46
4.3.8. Izolovanje plazmida.....	47
4.3.9. Analiza plazmida izolovanih iz bakterija	48
4.4. Ekspresija glukoza-oksidade na površini ćelija kvasca	48
4.4.1. Transformacija S. cerevisiae EBY100	48
4.4.2. Ekspresija glukoza-oksidade u S. cerevisiae EBY100 u mikrotitar ploči	49
4.4.3. Ekspresija himere glukoza-oksidade i zelenog fluorescentnog proteina u S. cerevisiae EBY100	49
4.5. Sintaza fluorescentnog tiramida	50
4.6. Protočna citometrija.....	50
4.6.1. Obeležavanje ćelija kvasaca sa tiramidom i glukozom kao supstratom.....	50
4.6.2. Obeležavanje ćelija kvasaca sa tiramidom i β -oktil-glukozidom kao supstratom.....	51
4.7. Ekspresija i prečišćavanje glukoza-oksidade	52
4.7.1. Transformacija P. pastoris KM71H.....	52
4.7.2. Ekspresija glukoza-oksidade	53
4.7.3. Prečišćavanje glukoza-oksidade.....	53
4.8. Imobilizacija glukoza-oksidade na makroporoznom polimeru	54
4.9. Određivanje oksidativne stabilnosti glukoza-oksidade	54
4.9.1. Određivanje oksidativne stabilnosti glukoza-oksidade eksprimirane na površini ćelija kvasca.....	54
4.9.2. Određivanje oksidativne stabilnosti glukoza-oksidade imobilizovane na makroporoznom polimeru	55
4.10. Karakterizacija glukoza-oksidade.....	56
4.10.1. Određivanje aktivnosti glukoza-oksidade.....	56
4.10.2. Određivanje kinetičkih parametara glukoza-oksidade.....	56

4.10.3. Određivanje temperaturne stabilnosti glukoza-oksidge	56
4.10.4. Određivanje šećerne specifičnosti glukoza-oksidge	57
4.10.5. Određivanje pH optimuma glukoza-oksidge	57
4.10.6. Određivanje aktivnosti glukoza-oksidge sa N,N-dimetil-nitrozoanilinom	57
4.10.7. Određivanje aktivnosti glukoza-oksidge sa ferocen-metanolom.	57
4.10.8. Karakterizacija glukoza-oksidge cikličnom voltametrijom	58
4.11. Analitičke metode	59
4.11.1. Određivanje kolonija kvasaca koje eksprimiraju glukoza-oksidge	59
4.11.2. Određivanje koncentracije proteina spektroskopskom metodom.	59
4.11.3. Agarozna DNK elektroforeza	59
4.11.4. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	60
5. REZULTATI I DISKUSIJA	62
5.1. Ekspresija i karakterizacija M12 mutanta glukoza-oksidge u <i>Pichia pastoris</i> KM71H	62
5.1.1. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantne glukoza-oksidge	62
5.1.2. Karakterizacija rekombinantne glukoza-oksidge	64
5.2. Povećanje oksidativne stabilnosti glukoza-oksidge	69
5.2.1. Razvoj metode za pronalaženje oksidativno stabilnijih mutanata glukoza-oksidge	70
5.2.2. Pretraživanje saturacionih biblioteka glukoza-oksidge	71
5.2.3. Analiziranje kombinovanih mutanata glukoza-oksidge	75
5.2.4. Ekspresija i prečišćavanje mutanata glukoza-oksidge iz <i>P. pastoris</i>	76
5.2.5. Karakterizacija mutanata glukoza-oksidge	78
5.3. Razvoj visoko efikasnih metoda pretraživanja biblioteka gena glukoza-oksidge	84
5.3.1. Ekspresija GOx-yGFP konstrukta	84
5.3.2. Optimizacija eseja	87
5.3.3. Pretraživanje biblioteke GOx	89
6. ZAKLJUČCI	94
7. LITERATURA	96
8. PRILOG 1: prajmeri za kloniranje	113

1. UVOD

Enzimi poreklom iz mikroorganizama imaju široku primenu u različitim sektorima industrije kao što su prehrambena, hemijska, poljoprivredna, farmaceutska i energetska. Ono što enzimске procese izdvaja od hemijskih je smanjeno vreme procedura i potrošnje energije, niski troškovi proizvodnje, netoksičnost i ekološki su prihvatljiviji¹. Od skoro 4000 poznatih i klasifikovanih enzima, oko 200 mikrobni enzima se koristi komercijalno, dok se samo 20 proizvodi na pravom industrijskom nivou. Od korišćenih industrijskih enzima $\frac{3}{4}$ su hidrolitički enzimi, među kojima se ističu proteaze, lipaze i saharaze². Sa razvojem rekombinantne DNK tehnologije i proteinskog inženjeringa, mikroorganizmi mogu biti prilagođeni i uzgajani u velikim količinama kako bi se odgovorilo na povećanu potražnju za industrijskim enzimima³. Globalno tržište industrijskih enzima je procenjeno na 4,2 milijarde američkih dolara za 2014. godinu i očekuje se konstantan porast do 2020. godine kada bi dostiglo 6,2 milijarde dolara¹.

Industrijska primena enzima je često ograničena nepostojanjem enzima koji mogu da izdrže industrijske uslove u proizvodnji i koji katalizuju određenu reakciju na efikasan način. Eksploatacija novih tipova enzima, unapređenje enzimskih osobina i proizvodnih procesa, predstavlja glavni cilj inovacija u industrijskoj proizvodnji enzima². Sistematičnim pristupom je moguće postići krajnji cilj, a neki od koraka su: potraga za novim enzimima iz prirodnih izvora⁴, inženjering postojećih enzima⁵, fino podešavanje procesa enzimске manipulacije kao što su proizvodnja enzima, imobilizacija, formulacija enzimskog preparata i slično.

Glukoza-oksidaža (GOx) se koristi kao biokatalizator u prehrambenoj industriji za proizvodnju glukonske kiseline, uklanjanje kiseonika i sterilizaciju. U farmaceutskoj industriji i kliničkoj biohemiji se koristi kao biosenzor za određivanje koncentracije glukoze, dok se dok postoje pokušaji da se iskoristi i

za proizvodnju biogorivnih ćelija koje proizvode električnu energiju koristeći glukozu i kiseonik iz ljudske krvi u okvirima nanobiotehnologije⁶. Više od polovine proizvedenih biosenzora u svetu se koristi za određivanje glukoze, i njihovo tržište čini 85% celokupnog tržišta biosenzora. Prvi elektrohemijski senzor za glukozu na bazi olovke i tračice činili su GOx i ferocenski medijator, i od tad su razvijeni različiti proizvodi za praćenje glukoze od strane nekoliko kompanija⁷.

Za uspešniju primenu GOx neophodno je poboljšati neke od njenih osobina kao što su aktivnost, pH optimum, reaktivnost sa kiseonikom i stabilnost. Dirigovana evolucija predstavlja jedan od načina da se poboljšaju njene osobine, uglavnom aktivnost i/ili stabilnost, ali je za uspešnost te metode neophodno postojanje enzimskih eseja pogodnih za visoko efikasne metode pretraživanja (eng. *high throughput screening*) u kojima se čuva fizička veza između gena koji kodira GOx, eksprimirane GOx i proizvoda enzimske reakcije⁸⁻¹⁰. Polu-racionalnim dizajnom GOx je re-dizajnirana za upotrebu sa različitim medijatorima koji se koriste u uređajima za merenje glukoze¹¹⁻¹³. U eksperimentima dirigovane evolucije GOx korišćen je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, ali zbog hiperglikozilacije eksprimirani enzim ima izmenjene kinetičke osobine koje ograničavaju njegovu upotrebu¹⁴.

U cilju pronalaženja mutanata *Aspergillus niger* GOx koji su oksidativno stabilniji i aktivniji, u ovom radu su razvijene dve metode pretraživanja bazirane na ekspresiji proteina na površini ćelija kvasca. Pored razvoja ovih metoda ispitivana je i optimizacija ekspresije rekombinantne GOx u kvascu *Pichia pastoris* za heterolognu ekspresiju mutanata GOx i njihovu kinetičku karakterizaciju.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Glukoza-oksidaža

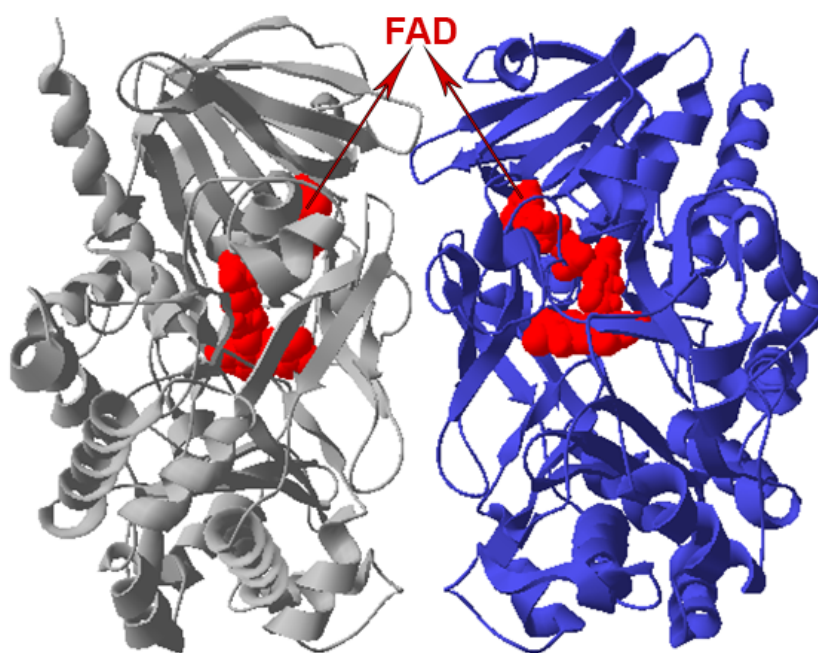
Glukoza-oksidaža (GOx, β -D-glukoza:kiseonik 1-oksidoireduktaza, EC 1.1.3.4) je enzim čija je aktivnost prvi put detektovana 1928. godine, a potom je izolovan iz različitih vrsta gljiva, uglavnom roda *Aspergillus* i *Penicillium*^{15,16}. Najviše komercijalno proizvedene GOx se izoluje iz micelijuma *Aspergillus niger*, gajenog u cilju proizvodnje glukonske kiseline ili njenih soli kao što su natrijum-glukonat i kalcijum-glukonat. Shodno tome, enzim se dobija kao sporedni proizvod u proizvodnji glukonata¹⁷.

Ćelijska lokacija glukoza-oksidaže u *A. niger* je već dugi period predmet diskusije. Prva istraživanja i prečišćavanja su tretirala enzim kao intracelularni, što je potkrepljeno prisustvom enzima u peroksizomima. Druge studije su se bavile prečišćavanjem i određivanjem isključivo ekstracelularnog enzima, čija je polazna osnova bila da je enzim vezan za površinu ćelije i da se pojavljuje u ekstracelularnom medijumu kao posledica aktivne sekrecije enzima. Ovo je takođe potvrđeno imunocitohemijskim obeležavanjem koje je pokazalo da je najveći deo enzima vezan za ćelijski zid¹⁸⁻²⁰. Pored toga, visok sadržaj ugljenih-hidrata na površini enzima potvrđuje prisustvo aktivnog sekrecionog mehanizma. Razlike u stepenu glikozilacije dovode do pojave različitih izoformi enzima koje imaju iste kinetičke osobine kao i aminokiselinsku sekvencu. Veći stepen glikozilacije ekstracelularne forme u odnosu na formu vezane za ćeliju je povezan sa većom temperaturnom i pH stabilnošću enzima¹⁸. Zbog prisustva signalne sekvence GOx je lokalizovana u periplazmi micelijuma *A. niger*, odakle se izoluje razaranjem ćelija praćeno isoljavanjem i jonoizmenjivačkom hromatografijom¹⁶. Problemi koji se javljaju u procesu proizvodnje i izolovanja GOx su uglavnom niska produktivnost i/ili izolovanje i drugih enzima kao što je katalaza¹⁷.

Osnovna funkcija GOx u prirodi je da deluje antibakterijski i antifungalno proizvodeći vodonik-peroksid. Konstantni oksidativni stres postignut održavanjem niske koncentracije vodonik-peroksida glukozo-oksidadnom aktivnošću, pokazao se kao veoma efikasan protiv bakterijskog i fungalnog rasta, naročito ako mikroorganizmi ne proizvode enzime za razgradnju vodonik-peroksida. Druge funkcije koje GOx ima u prirodi su da učestvuje u infekciji biljaka, degradaciji lignina, snižavanju pH u životnoj sredini, itd²¹.

2.1.1. Strukturne i kinetičke karakteristike glukoza-oksidade

GOx iz *A. niger* se sastoji iz dve identične subjedinice i u svojoj glikozilovanoj formi ima molekulsku masu oko 155-160 kDa. Svaki monomer u aktivnom mestu sadrži čvrsto ali ne kovalentno vezan flavin-adenin-dinukleotid (FAD) kofaktor (**Slika 1**)²²⁻²⁴. Aktivni redoks centar FAD koenzima je sistem prstena izoaloksazina. Redoks promena FAD-FADH₂ je direktno povezana sa malom sekundarnom strukturnom reorganizacijom GOx, lokalizovanom između dve subjedinice²⁵. FAD nije kovalentno vezan i njegovo oslobađanje iz holo enzima praćeno je delimičnim razvijanjem proteina. Apoenzim bez FAD kofaktora je biokatalitički neaktivan, ali se može reaktivirati sa nativnim ili hemijski modifikovanim analogima FAD-a²⁶⁻²⁸. Enzim je glikozilovan sa ugljenohidratnim sastavom od oko 10-25% (w/w). Većinu ugljenohidratne komponente čini manozna, oko 80% (w/w), koja je N- i O-glikozidno vezana za asparagin, treonin i serin²⁹⁻³¹. Deglikozilacija GOx ne utiče značajno na njene osobine, a omogućila je određivanje trodimenzionalne strukture enzima^{32,33}.

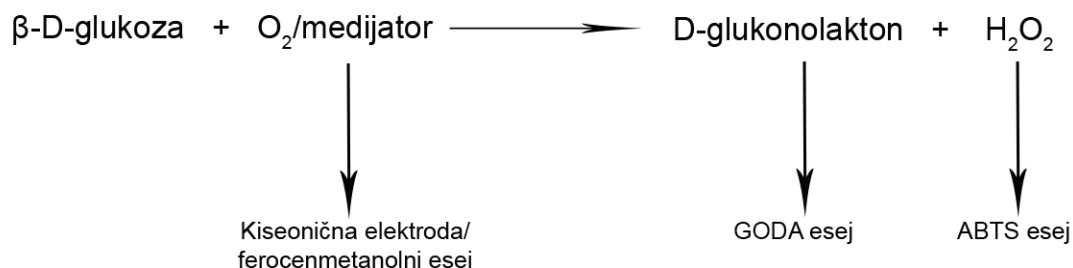


Slika 1. Trodimenzionalna struktura glukoza-oksidadze iz *Aspergillus niger* (PDB kod 1CF3). Slika je kreirana korišćenjem programa Swiss-PdbViewer verzija 4.1.0 (Švajcarska)

Vrednosti za *Mihaelis-Menten* konstante (K_m) *A. niger* GOx za β -D-glukozu variraju u intervalu između 11 do 40 mM (30°C, pH 5,0). Maksimalnu aktivnost GOx ima u opsegu pH od 4 do 6,5, sa optimumom na pH 5,5-6,0¹⁶. Na pH vrednosti nižoj od 4 i višoj od 8 enzim se inaktivira u roku od 6 sati na sobnoj temperaturi. Na pH 7 (30°, 20 sati) aktivnost je redukovana za 20%. Kombinacija niskog pH (nižeg od 4) i prisustva halida (hlorida) pokazuje reverzibilnu inhibiciju³⁴.

Za određivanje aktivnosti GOx mogu se koristiti dostupni detekcioni eseji koji prate bilo potrošnju reaktanata ili formiranje proizvoda (**Slika 2**). Esej za detektovanje glukoza-oksidadze (GODA) kvantifikuje formiranje D-glukonolaktona³⁵, proizvoda reakcije oksidacije β -D-glukoze, dok ABTS esej kvantifikuje formiranje vodonik-peroksida u kuplovanom eseju sa peroksidazom. Za detekciju potrošnje reaktanata, ulogu kiseonika može igrati

hromoforni medijatori kao što su ferocenmetanol³⁶, ili *p*-nitroso-*N,N*-dimetilanilin³⁷.

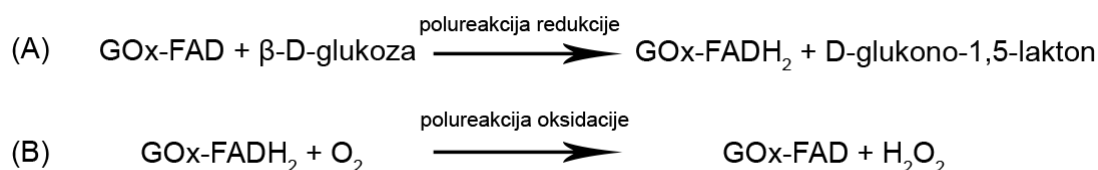


Slika 2. Dostupni eseji za određivanje aktivnosti GOx, bazirani na redukciji medijatora, formiranju glukonolaktona (GODA) ili formiranju vodonik-peroksida (ABTS esej)

2.1.2. Mehanizam reakcije glukoza-oksidaze

Glukoza-oksidaza katalizuje oksidaciju β -D-glukoze do D-glukono-1,5-laktona i redukciju kiseonika do vodonik peroksida²³. Mehanizam katalize je u skladu sa Ping-Pong mehanizmom bisupstranih enzimskih reakcija i može se razdvojiti u dve polu-reakcije (**Slika 3**). Polureakcija redukcije GOx uključuje oksidaciju β -D-glukoze do D-glukono-1,5-laktona od strane GOx-FAD-glukoze kompleksa. Proizvod D-glukono-1,5-lakton je zatim ne-enzimski hidrolizovan do glukonske kiseline. U polureakciji oksidacije dva protona i dva elektrona se prenose od enzima do molekula kiseonika, stvarajući vodonik-peroksid i regenerišući oksidovano stanje enzima^{22,25}. Akumulacija proizvoda reakcije GOx, vodonik-peroksida i D-glukonolaktona, može dovesti do inhibicije enzima^{38,39}.

TEORIJSKI DEO



Slika 3. Mehanizam katalize glukoza-oksidadze: (A) polureakcija redukcije; (B) polureakcija oksidacije

Supstrati GOx se mogu podeliti u dve velike grupe: jednu čine elektron-donori u polureakciji redukcije, a drugu čine elektron-akceptori u polureakciji oksidacije. Mnogi šećeri i derivati glukoze su potencijalni supstrati za GOx, ali je β -D-glukoza ubedljivo najbolji supstrat (Tabela 1)^{28,40,41}.

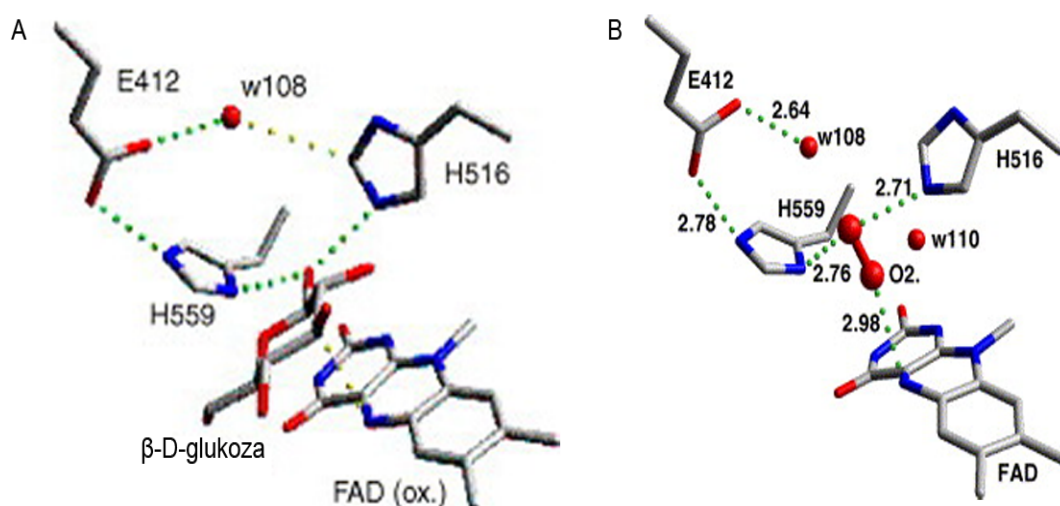
Tabela 1. Elektron-donor supstrati u polureakciji redukcije^{22,28}

Supstrat	Aktivnost u poređenju sa glukozom (%)	Supstrat	Aktivnost u poređenju sa glukozom (%)
β -D-glukoza	100	3-deoksi-D-glukoza	1
2-deoksi-D-glukoza	25-30	6-O-metil-D-glukoza	1
4-O-metil-D-glukoza	15	α -D-glukoza	0,64
6-deoksi-D-glukoza	10	Manoza	0,2
4-deoksi-D-glukoza	2	Altrosa	0,16
2-deoksi-6-fluoro-D-glukoza	1,85	Galaktoza	0,08
3,6-dimetil-D-glukoza	1,85	Ksiloza	0,03
4,6-dimetil-D-glukoza	1,22	Idoza	0,02

Medju elektron-akceptorima u polureakciji oksidacije, pored kiseonika, mogu se naći dvoelektronski akceptori (benzohinoni i naftohinoni⁴²) i jednoelektronski akceptori (kalijum-fericijanid⁴², soli ferocena⁴³ i nitroksid radikali) koji su kinetički okarakterisani²². Pored njih ispitivani su i mnogi drugi elektron akceptori (2,6-dihlorindofenol⁴², metilensko-plavo, nitrozobenzen, *p*-

nitroso-*N,N*-dimetilanilin³⁷ i mnogi drugi) ali sa nedovoljno kinetičkih informacija²².

Katalitički centar GOx se sastoji of FAD molekula i bočnih lanaca tri aminokiseline u njegovoj blizini, Glu412, His516 i His559. Glu412 je delimično uvučen u unutrašnjost proteina dok je bočni lanac His516 više fleksibilan i izložen rastvaraču. Bez supstrata, u aktivnom mestu se nalazi molekul vode, koji formira vodonične veze sa konzerviranim histidinskim ostacima His516 i His559 i N1 pozicijom na flavinu²⁴.



Slika 4. A) Modelovano aktivno mesto GOx, kompleks enzim-FAD_{oks}-glukoza⁴⁴. B) Molekularni model radikalskog jonskog para, kompleks superoksid anjon radikala i radikalskog oblika FAD koenzima u GOx⁴⁵

Predložena su dva mehanizma za polureakciju redukcije sa β -D-glukozom: hidridni transfer i nukleofilni napad praćen deprotonizacijom⁴⁶. Mehanizam nukleofilnog napada praćen deprotonizacijom je manje verovatan jer kovalentni intermedijer enzim-glukoza nikad nije detektovan. Mehanizam hidridnog transfera se opisuje uklanjanjem protona sa C1 hidroksilne grupe glukoze preko His516 uz simultani direktni hidridni transfer sa C1 pozicije

glukoze na N5 poziciju FAD-a (**Slika 4A**)^{42,47}. Hidridni transfer na N5 izoalksazinskog prstena stvara negativno naelektrisanje oko N1 atoma FAD kofaktora⁴⁸. U oksidativnoj polu-reakciji, redukovani kofaktor FADH⁻ je reoksidovan do FAD pomoću kiseonika koji se redukuje do vodonik-peroksida. Ova reakcija se odvija preko dva jedno-elektronska transfera. Intermedijeri u reakciji su superoksid anjon radikal i flavin semihinon radikal (**Slika 4B**)^{45,49-51}.

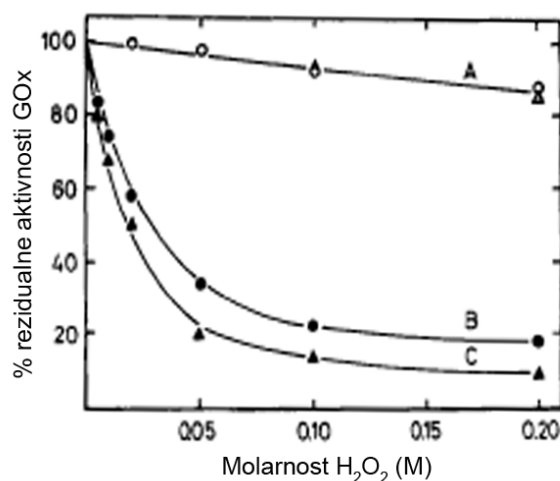
2.1.3. Stabilnost glukoza-oksidge

Hidrofobne interakcije imaju važnu ulogu u stabilnosti GOx u odnosu na jonske interakcije. Prilikom termalne denaturacije dolazi do disocijacije FAD kofaktora koju prati razvijanje proteina, što upućuje na važnu ulogu FAD u održavanju aktivne strukture GOx²⁷. Pokazano je da GOx ne menja svoje oligomerno stanje tokom termalne tranzicije (oko 55,5°C), niti se disosuje na monomere niti stvara velike agregate, već se nalazi u stanju stopljene globule⁵². Prisustvo aditiva kao što su polioli, šećeri i soli, doprinosi povećanju stabilnosti⁵³.

Oksidacija enzima, praćena inaktivacijom ili denaturacijom, je jedan od glavnih razloga njihove strukturne nestabilnosti. Posebno osetljiv prema oksidaciji je aminokiselina metionin, koji se prevodi u metionin-sulfoksid čak i pod blagim uslovima⁵⁴ u prisustvu kiseonika i kiseoničnih reaktivnih vrsta kao što su vodonik-peroksid, superoksid anjon radikal i drugi⁵⁵. Pored metionina oksidaciji su podložni cistein, triptofan, tirozin i histidin, naročito ako se nalaze u ili oko aktivnog mesta enzima^{56,57}. Oksidacija metionina je gotovo pH nezavisna, dok temperatura ima direktan uticaj na koncentraciju kiseonika i samim tim na oksidativni stres⁵⁴. Jedan od najbitnijih faktora kontrole oksidacije u proteinima predstavlja izloženost aminokiselinskog ostatka rastvaraču. Metioninski ostaci koji su u potpunosti izloženi se oksiduju veoma brzo, dok se oni koji se nalaze u unutrašnjosti proteina oksiduju sporije^{58,59}. Jedan od načina

da se spreči oksidacija metionina je zamena tih ostataka sa aminokiselinama koje nisu podložne oksidaciji, kao što su alanin, leucin ili izoleucin^{60,61}.

U prisustvu vodonik-peroksida, a bez prisustva glukoze, GOx je inaktivirana u manjoj meri, dok je inaktivacija brža kada se enzim nalazi u redukovanoj formi tj kada vrši oksidaciju glukoze bez prisustva kiseonika (Slika 5)^{62,63}. Inaktivacija enzima se značajno smanjuje ukoliko se vodonik-peroksid nastao u toku same reakcije GOx razlaže katalazom, koja može biti koimobilizovana sa GOx^{62,64}.



Slika 5. Efekat koncentracije vodonik-peroksida na inaktivaciju GOx; A) efekat na oksidovani enzim u aerobnim i anaerobnim uslovima; B) efekat na enzim u prisustvu glukoze i kiseonika; C) efekat na enzim u prisustvu glukoze i bez prisustva kiseonika (redukovani enzim) (modifikovano iz publikacije Kleppe 1966⁶³)

Neka istraživanja su pokazala da redukovana forma GOx (FADH₂) ima sličan afinitet prema vodonik-peroksidu kao i prema kiseoniku³⁹, i da stvaranje kompleksa FADH₂-H₂O₂ dovodi do promene u lokalnoj strukturi oko FAD kofaktora što dovodi do inaktivacije enzima⁶⁵, dok rezultati do kojih je došao

Klepe govore da ne postoji kompeticija između kiseonika i vodonik-peroksida za vezivanje za redukovani FAD kofaktor⁶³. Upoređivanjem broja oksidovanih metionina po molekulu enzima između redukovane i oksidovane GOx tretirane vodonik-peroksidom, pokazano je da redukovana forma enzima poseduje 2 oksidovana metionina više, što ukazuje da se metionini koji oksidovanjem dovode do inaktivacije enzima nalaze u blizini aktivnog mesta⁶³.

2.1.4. Značaj i upotreba glukoza-oksidaze

Glukoza-oksidaza je stekla značajnu komercijalnu vrednost zbog raznovrsne primene u hemijskoj, farmaceutskoj, prehrambenoj, tekstilnoj i biotehnološkoj industriji^{17,66}. Smatra se neškodljivom, i dostupna je u velikoj količini za upotrebu u prehrambenoj industriji (npr uklanja kiseonik u hrani koja sadrži visok procenat masnoće⁶⁷, gde oksidacija lipida može dovesti do pokvarenosti hrane i užeglog ukusa). Produkt reakcije, D-glukonska kiselina, je bezbedna za ljudsku ishranu, stoga ova osobina zajedno sa potrebom da se hemijski antioksidanti zamene prirodnim jedinjenjima, čini glukoza-oksidazu idealnim kandidatom za prezervaciju hrane²¹. Koristi se i kao aditiv za uklanjanje kiseonika iz pića da bi se produžio njihov rok trajanja i održali ukus i boja⁶⁸. Preparati GOx za ishranu obično sadrže smešu glukoza-oksidaze i katalaze zato što se ova dva enzima prirodno nalaze zajedno u ćelijskom zidu micelija. Katalaza pomaže u razgradnji vodonik-peroksida sprečavajući inhibiciju i deaktivaciju glukoza-oksidaze²⁰.

U proizvodnji vina sa smanjenim procentom alkohola, GOx se koristi u cilju smanjenja glukoze koju bi kvasci u toku fermentacije prevodili u alkohol. Jedan od načina da se ovo uradi je da se doda GOx pulpi pre fermentacije, gde GOx troši kiseonik a nastali vodonik-peroksid može smanjiti aktivnost ili rast kvasca⁶⁹. Drugi način je da se kvasac podvrgne gentskom inženjeringu tako da eksprimira GOx. Pored toga, GOx može da spreči kvarenje vina baktericidnim

delovanjem na bakterije mlečno-kiselinskog vrenja u toku fermentacije. Ovaj baktericidni efekat dovodi do toga da se manje konzervativa dodaje u vino⁷⁰.

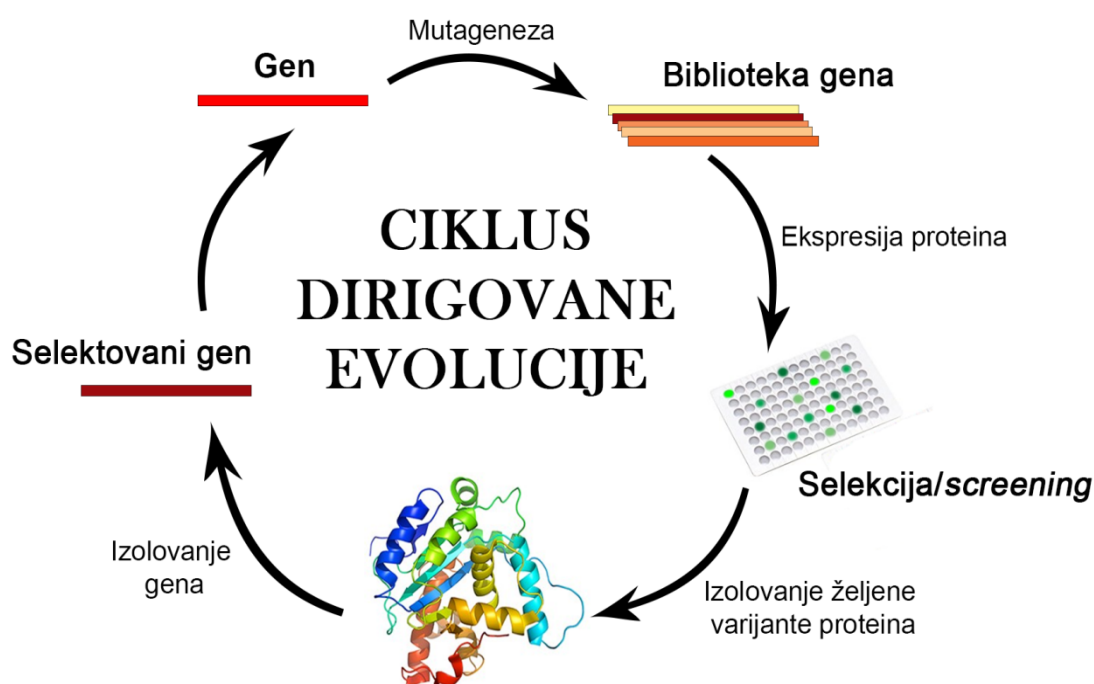
GOx je jedan od enzima koji se može koristiti u biosenzorima za merenje koncentracije glukoze u različitim uzorcima. Biosenzori rade na principu merenja broja elektrona koji prodju kroz enzim povezujući ih sa elektrodom. Alternativno, neki biosenzori koriste osetljivo merenje fluorescencije, prateći promenu u unutrašnjoj fluorescenciji FAD-a ili triptofana u glukozooksidazi^{34,71}. Neki od biosenzora koji koriste GOx su: *online* praćenje glukoze u fermentacijama⁷², optički biosenzor za analizu koncentracije glukoze u negaziranim pićima⁷³, biosenzor za praćenje glukoze u krvi i serumu za jednokratnu upotrebu⁷⁴, minijaturizovani termalni biosenzor za punu krv⁷⁵, biosenzor za merenje glukoze u serumu humane krvi⁷⁶.

Biogorivne ćelije konvertuju biohemijsku energiju u električnu energiju koristeći enzime. Sastoje se od seta dve elektrode modifikovanih enzimima koje specifično oksiduju ili redukuju supstrat. Elektronski transfer između enzima i elektrode može biti direktan ili posredovan redoks medijatorima. GOx se može koristiti u biogorivnim ćelijama za oksidaciju glukoze u kombinaciji sa kiseonik redukujućim enzimima kao što su lakaza, bilirubin oksidaza ili citohrom oksidaza¹⁷. Dve glavne prepreke u primeni biogorivnih ćelija su ograničeni životni vek i ograničena energijska proizvodnja ćelija. Veća enzimska stabilnost je neophodna da bi se produžio vek ćelija sa meseci na godine, dok je veća aktivnost neophodna da se poveća energetska signal za nekoliko redova veličine²¹.

2.2. Proteinski inženjering

Proteinski inženjering se razvio početkom osamdesetih godina sa pojavom mesto-specifične mutageneze (eng. *site-directed mutagenesis*), i značajno

doprinese dobijanju podataka o ulogama pojedinih aminokiselinskih ostataka u strukturi i funkciji proteina^{77,78}. Dirigovana evolucija je opšti naziv koji se primenjuje za ponavljajući ciklus generisanja biblioteka proteinskih mutanata (ili varijanti) i selekcije proteina sa odgovarajućom željenom funkcijom iz ovih biblioteka (**Slika 6**)⁷⁹. Enzimi koji se koriste u komercijalne svrhe moraju imati visoku aktivnost i stabilnost pod datim uslovima, određenu supstratnu specifičnost i visoku selektivnost. Prirodni enzimi ne zadovoljavaju ove oštre industrijske uslove i optimizacija je potrebna da bi se dobio odgovarajući enzim za industrijske potrebe⁸⁰.



Slika 6. Šematski prikaz ciklusa dirigovane evolucije

Dirigovana evolucija se uspešno koristi za ciljano traženje brojnih enzimskih karakteristika, uključujući aktivnost⁸¹, supstratnu specifičnost⁸², termalnu⁸³ i oksidativnu stabilnost⁸⁴, pH optimum ili opseg i toleranciju prema rastvaraču⁸⁵. Dok se tipični eksperimenti dirigovane evolucije fokusiraju na

jednu enzimsku osobinu, postoje i primeri kad se simultano može poboljšati nekoliko osobina⁸⁶. Dobar proces proteinskog inženjeringa predstavlja onaj koji će u najkraćem vremenskom periodu dati tražene rezultate⁸². U proteinskom inženjeringu mogu se koristiti dva eksperimentalna puta: racionalni ili poluracionalni dizajn i nasumična mutageneza.

2.2.1. Nasumična mutageneza

U najvećem broju slučajeva tačan odnos između strukture i funkcije kod mnogih enzima je još uvek nepoznat i korišćenje nasumične mutageneze je najbolji način za dobijanje enzima sa odgovarajućom funkcijom ili pronalaženje važnih funkcionalnih aminokiselinskih ostataka^{87,88}. Uspešnost nasumične mutageneze zavisi od dostupnosti efikasnih procedura kao i mogućnosti za kloniranje velikih biblioteka mutanata⁸⁹. Neke od metoda za pravljenje biblioteka nasumičnom mutagenezom koriste nukleozidne analoge⁷⁷, Mn²⁺ jone, specifične DNK polimeraze⁹⁰, mutatorske sojeve bakterija⁹¹ ili rekombinaciju. Rekombinacija gena se može vršiti *in vitro* od bilo kog broja roditeljskih gena, uključujući i prirodno homologe gene, stvarajući biblioteku himernih gena⁹². *In vitro* rekombinacija za dobijanje biblioteka zahteva visok stepen homologije između gena (više od 60%), i jedna od mana ove metode predstavlja ograničena veličina biblioteke (<10⁹ varijanata)⁸⁰. Kombinacijom *in vitro* i *in vivo* rekombinacionog mehanizma mogu se dobiti biblioteke visoke kompleksnosti sa niskim sadržajem roditeljskog gena⁹³. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* poseduje visoko frekventnu DNK rekombinacionu aktivnost, što je korišćeno za *in vivo* kloniranje i rekombinaciju mutiranih biblioteka sa linearizovanim vektorom, izbegavajući korake ligiranja^{94,95}. Zbog jednoličnog mutagenacionog spektra DNK polimeraza, metode nasumične mutageneze stvaraju ograničenu raznovrsnost na nivou gena⁹⁶.

2.2.2. *Polu-racionalni dizajn*

Racionalni ili polu-racionalni dizajn pogađa specifične aminokiselinske ostatke u proteinu i može se primeniti kad postoji detaljno poznavanje strukture enzima i mehanizma enzimske reakcije⁸⁷. Polu-racionalnim dizajnom se najčešće ciljaju aminokiseline u blizini aktivnog mesta, u potrazi za varijantama koje imaju promenjenu specifičnost ili regioselektivnost⁹⁷⁻⁹⁹. Napredak metoda u polu-racionalnom proteinskom inženjeringu i *de novo* enzimskom dizajnu poslednjih godina, pruža moćnu i efektivnu strategiju za manipulaciju enzima. Glavna prednost polu-racionalnog pristupa leži u pravljenju malih, pametno dizajniranih i funkcionalno bogatih biblioteka¹⁰⁰. Nakon određivanja važnih pozicija, saturacionom mutagenezom prave se biblioteke koje sadrže smešu svih 64 kodona na željenim pozicijama u genu. Ovaj pristup povećava verovatnoću delotvornih mutacija u poređenju sa nasumičnom mutagenezom, a takođe smanjuje i vreme pretrage.^{101,102}

2.2.3. *Proteinski inženjering glukoza-oksidaze*

Zbog svoje široke primene u industriji i uske supstratne specifičnosti, proteinski inženjering GOx je uglavnom imao za cilj povećanje aktivnosti i/ili stabilnosti. Kada je u pitanju povećanje aktivnosti nekoliko varijanti GOx je pronađeno u eksperimentima dirigovane evolucije, M12 mutant sa povećanjem aktivnosti od 2,7 puta⁹, A2 mutant 5,8 puta aktivniji⁸ i ostali^{35,103}. Neke od varijanti GOx koje su pokazivale povećanu aktivnost su imale i veću termostabilnost^{8,103}, ali do sada nije radjen proteinski inženjering GOx samo sa ciljem povećanja temperaturne stabilnosti. Još jedna karakteristika GOx koja je modifikovana proteinskim inženjeringom je i veća reaktivnost sa elektrohemijским medijatorima kao što su ferocenmetanol^{35,104}, fenazin metosulfat¹² i nitroso-anilin¹¹, zbog njihove uloge u biosenzorima za detekciju glukoze.

2.3. Ekspresioni sistemi

Proizvodnja proteina u mikroorganizmima zahteva proizvodnju velikih količina kada su u pitanju tehnički enzimi i sigurnost i autentičnost kada su u pitanju farmaceutski proteini. Proizvodnja bazirana na kvascima zadovoljava ove kriterijume, jer proizvode proteine u višegramskim količinama¹⁰⁵ i nepatogeni su¹⁰⁶. Kao eukariotski organizmi, kvasci imaju sposobnost sekrecije rekombinantnih proteina i da ih modifikuju u skladu sa opštom eukariotskom šemom¹⁰⁷. Za svaki rekombinantni sistem bitna su dva cilja, prvi je da ima mogućnost dostizanja visoke koncentracije ćelija a drugi da dostigne visoki nivo prinosa proizvoda po jednoj ćeliji (specifična produktivnost) ili po jedinici zapremine medijuma (zapreminska produktivnost). Među faktorima koji utiču na specifičnu produktivnost u kvascima su jačina promotora, broj kopija plazmida i lider sekvenca¹⁰⁸. Iako postoji mnogo vrsta kvasaca, nije svaki sistem odgovarajući za proizvodnju svih proteina, stoga je poželjno imati u vidu nekoliko najkorišćenijih za proizvodnju rekombinantnih proteina¹⁰⁶.

2.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* ekspresioni sistem

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ima najdužu tradiciju upotrebe u fermentacijama, i najčešće se termin kvasac odnosi upravo na ovu vrstu. Sekvenciranje genoma *S. cerevisiae* je završeno 1996. godine čineći ga prvim eukariotskim organizmom čiji je genom u potpunosti određen¹⁰⁹. Vektori koji se koriste za proizvodnju rekombinantnih proteina u kvascu su uglavnom hibridi bakterijskih i kvašćevih sekvenci. Bakterijski segment čine elementi potrebni za propagaciju plazmida u *E. coli* i sekvenca rezistencije na određeni antibiotik, dok kvašćev segment čine elementi za selekciju transformanata u kvascima^{106,110}. Za ekspresiju heterolognog proteina, sekvenca gena je fuzionisana sa promotorom visoko eksprimiranog *S. cerevisiae* gena, kao na primer gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaznog gena¹¹⁰, i ukoliko se protein

eksprimira ekstracelularno, za prepro signalnu sekvencu MF α 1 koja je funkcionalna u svim do sada analiziranim kvascima^{111,112}. Prepro signalna sekvencu MF α 1 se sastoji od 89 aminokiselina i inicira translokaciju proteina u endoplazmatični retikulum¹¹¹, a takođe sadrži tri mesta za glikozilaciju što može imati uticaj na pravilno proteolitičko sazrevanje proteina u toku sekrecije¹¹³. Pored MF α 1 signalne sekvence mogu se koristiti i nativne i sintetičke signalne sekvence¹¹⁴. *S. cerevisiae* je tolerantan na nisko pH, visoke koncentracije šećera i etanola i visoki osmotski pritisak, što ga čini dobrim sistemom za industrijske fermentacije¹¹⁵.

GOx je uspešno eksprimirana i sekretovana u *S. cerevisiae* u gramskim količinama koristeći različite promotore i signalne sekvence¹¹⁶⁻¹²⁰, i jedan je od najvećih sekretovanih glikoproteina u ovom kvascu. Enzim eksprimiran u kvascu ima značajno veći nivo N-glikozilacije nego divlji tip enzima iz *A. niger* i stepen glikozilacije zavisi od korišćene signalne sekvence^{116,121}. Upoređivanjem aktivnosti GOx iz *A. niger* i hiperglikozilovane iz *S. cerevisiae* uočeno je da hiperglikozilovana forma ima veću termostabilnost u odnosu na divlji tip GOx^{116,122}. Pokazano je i da hiperglikozilacija nastala u kvascu dovodi do ograničene upotrebe eksprimiranog enzima na imobilizovanim elektrodama za direktan elektronski transfer između enzima i elektrode¹⁴. Za razliku od *S. cerevisiae* kvasac *Pichia pastoris* se pokazao kao dobar domaćin za heterolognu proizvodnju GOx, kako ekstracelularno tako i intracelularno^{123,124}.

2.3.2. *Pichia pastoris* ekspresioni sistem

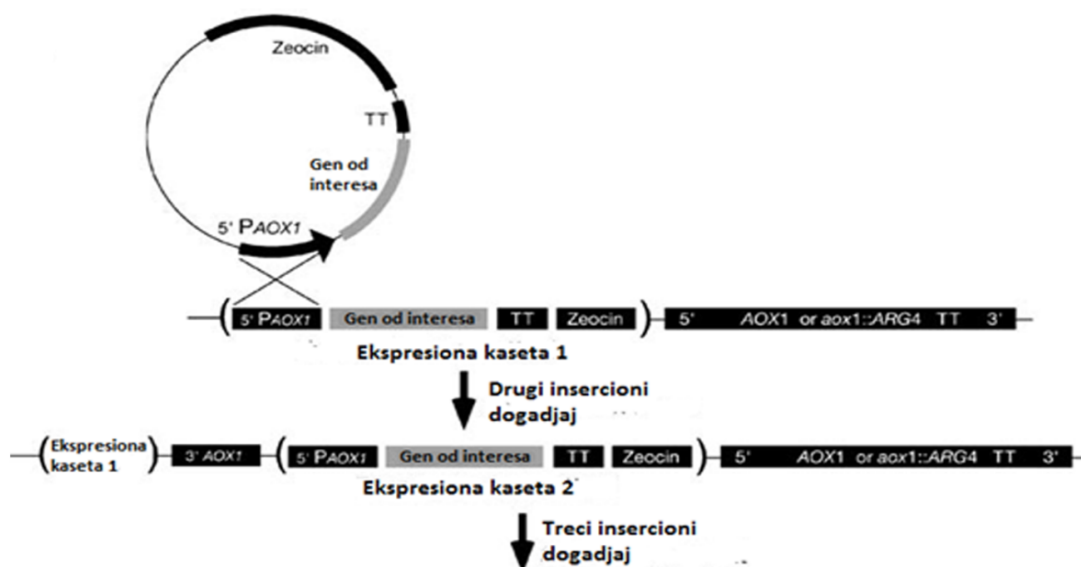
Kvasac *Pichia pastoris* je postao jedan od najčešće korišćenih eukariotskih organizama za produkciju rekombinantnih proteina u gramskim količinama¹²⁵, a njegova osobina da može dostići veliku gustinu ćelija je od posebnog industrijskog interesa¹²⁶. Pored toga ovaj sistem poseduje jake i regulisane promotore, ima sposobnost sekrecije heterolognih proteina kao i uvođenje post-

translacionih modifikacija u vidu glikozilacije i stvaranja disulfidnih veza^{127,128}. Metanol-inducibilnom promotoru AOX1 je pripisan uspeh *P. pastoris* kao sistema za ekspresiju heterolognih proteina. Alkohol-oksidaza (AOX), prvi enzim u metanol-indukovanom metaboličkom putu, predstavlja 35% ukupnih proteina u netransformisanim ćelijama koje se gaje na metanolu¹²⁹. Zbog toga sistemi koji koriste pAOX1 dominiraju u ekspresiji heterolognih proteina. Postoje dva *P. pastoris* fenotipa u zavisnosti od sposobnosti da rastu na metanolu: Mut⁺ koji je divlji tip i slobodno raste na metanolu kao jedinom izvoru ugljenika, i Mut^s koji zbog nedostatka AOX1 gena nema sposobnost metabolisanja metanola¹²⁶. Mut^s sojevi imaju prednost u proizvodnji proteina na velikoj skali jer su potrebne manje količine metanola da bi se indukovala ekspresija¹²⁸.

Zato što nisu razvijeni stabilni epizomalni vektori za *P. pastoris*, ekspresioni vektori se uglavnom integrišu u genom *P. pastoris* u cilju dobijanja stabilnog ekspresionog soja¹²⁸. Linearna DNK vektora može da formira stabilni transformant *P. pastoris* homologom rekombinacijom između sekvenci koje poseduju i vektor i genom domaćina^{130,131}. Najjednostavniji način integracije je da se digestuje vektor na jedinstvenom mestu unutar promotorske sekvence, i potom da se njim transformiše odgovarajući domaćin. Slobodni DNK krajevi stimulišu vektor da se homologno rekombinuje sa isečenim lokusom u jednom prelaznom događaju. Sojevi koji sadrže višestruko integrisane kopije ekspresione kasete često proizvode veće količine proteina od sojeva koji imaju jednu kopiju¹³². Stoga, nakon potvrde da soj *P. pastoris* sa jednom kopijom gena proizvodi biološki aktivan protein odgovarajuće veličine, preporučljivo je konstruisati i ispitati ekspresiju proteina u sojevima sa višestrukim kopijama. (Slika 7).

Fermentacija *P. pastoris* se odvija u dve faze, gde je prva faza rast ćelija u glicerolu dok se ne dostigne velika gustina ćelija, a druga faza je ekspresija proteina kontinualnim dodavanjem metanola u fermentor^{128,133}. Zbog niskog

nivoa sekrecije nativnih proteina, ekstracelularna ekspresija heterolognih proteina može da čini više od 80% od ukupnih proteina u medijumu, što značajno olakšava prečišćavanje rekombinantnog proteina¹³⁴.



Slika 7. Višestruka integracija vektora sa insertovanim heterolognim genom u genom *P. pastoris*¹²⁸

2.3.3. Post-translacione modifikacije i stabilnost heterolognih proteina

Glikozilacija je jedan od kritičnih post-translacionih događaja u sintezi proteina, od koje zavisi uvijanje proteina, asembliranje oligomera, strukturna stabilnost, specifična signalna transdukcija, itd^{135,136}. Kvasci i mnogi viši eukarioti koriste evolutivno konzervirani biosintetski put *N*-vezivanja oligosaharida za odgovarajuće asparaginske aminokiselinske ostatke na proteinu¹³⁷. Kod *P. pastoris* oligosaharidni lanac vezan za proteine je kraći i autentičniji nego kod *S. cerevisiae*¹³⁸. Prosečna dužina lanca oligosaharida kod glikoproteina eksprimiranih u *P. pastoris* je od 8 do 14 manoznih ostataka, dok je kod *S. cerevisiae* 40-150 ostataka¹⁰⁶. Analiza ugljenih hidrata prisutnih na

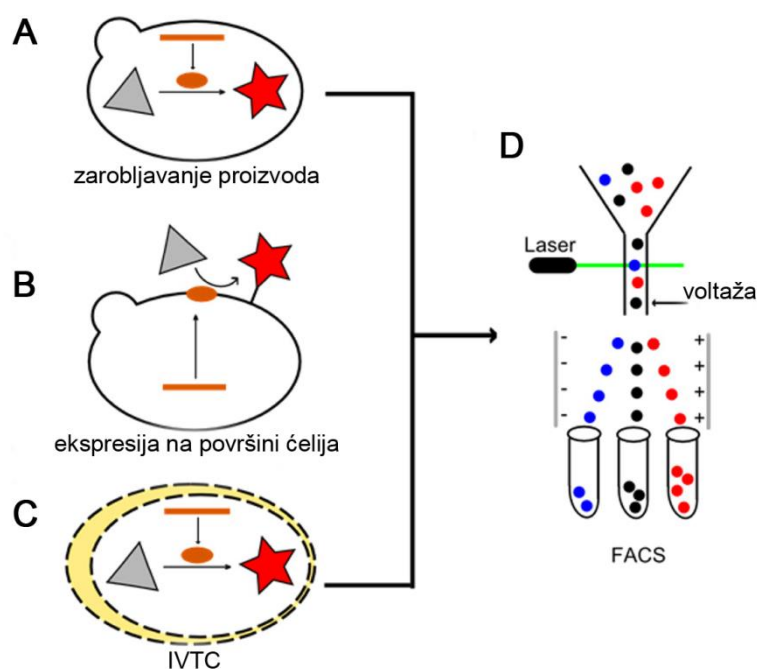
rekombinantnim enzimima ukazuje na dominantno prisustvo *N*-vezanih struktura sa velikom količinom manoznih ostataka, umesto kompleksnih ugljenohidratnih struktura. Oligosaharidi koje vezuje *S. cerevisiae* imaju terminalno vezani α -1,3 manozni ostatak, što povećava antigenost strukture. Oligosaharidi koje vezuje *P. pastoris* nemaju ovu terminalnu vezu, a mesto glikozilacije Asn-X-Ser/Thr je isto kao kod sisarskih ćelija¹³⁹. Iako su mnogi glikoproteini uspešno eksprimirani u *P. pastoris*, proizvodnja terapeutskih glikoproteina u ovom sistemu je otežana zbog razlike u humanom i kvašćevom biosintetskom putu ugljenih hidrata vezanih za proteine. Jedna od metoda da se prevaziđu ovi nedostaci je konverzija visoko-manoznih glikana kvašćevog-tipa u visoko-manozne glikane sisarskog-tipa¹⁴⁰, dok drugi metod predlaže genetičko inženjerstvo sekretornog puta *P. pastoris* tako da imitira glikozilacione reakcije viših sisara¹⁴¹.

Prinos eksprimiranih heterolognih proteina zavisi od mnogih genetičkih i fermentacionih faktora, kao što su temperatura¹⁴², pH¹⁴³, koncentracija rastvorenog kiseonika i dr. Jedan od glavnih nedostataka *P. pastoris* ekspresionog sistema je post-sekretorna proteolitička degradacija rekombinantnih proizvoda. Proteoliza je u velikoj meri protein-zavisna; dok neki eksprimirani proteini ostaju intaktni, drugi se ne mogu dobiti funkcionalni¹²⁶. U nekim slučajevima gajenje na niskim temperaturama i višim pH vrednostima može sprečiti proteaznu aktivnost¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Intracelularni i ekstracelularni nivoi proteaza i ćelijska smrtnost su veći prilikom gajenja na metanolu u poređenju sa gajenjem na glicerolu. Visoka smrtnost ćelija tokom indukcionne faze je u korelaciji sa intracelularnom akumulacijom reaktivnih vrsta kiseonika, prvenstveno formaldehida i vodonik-peroksida, koji su sporedni proizvodi metabolizma metanola¹⁴⁹.

2.4. Metode za pretraživanje biblioteka gena

Uspešnost eksperimenata dirigovane evolucije zavisi pored veličine genske raznolikosti i od visoko efikasnih metoda pretraživanja (eng. *high-throughput screening*, HTS) biblioteka. Pretraživanje i selekcija su neodvojivi segmenti analize biblioteka, gde se pretraživanje odnosi na analizu svake varijante proteina za željenu osobinu, a selekcija eliminiše nefunkcionalne varijante¹⁵⁰. Jedna od glavnih prepreka u proteinskom inženjeringu predstavlja povezivanje fenotipa sa genotipom, tako da se korisne mutacije mogu identifikovati. Ova veza se može postići prostornim odvajanjem varijanti biblioteke u mikrotitar pločama ili na agar pločama⁸⁸. Najkorišćenija metoda HTS za analizu enzimskih varijanti je pretraživanje upravo u mikrotitar pločama, u kojima se aktivnost enzima detektuje kolorimetrijskim ili fluorometrijskim esejima¹⁵¹. Proces pretraživanja može biti značajno ubrzan korišćenjem robotskih sistema⁹⁴. Međutim, enzimski eseji korišćeni u mikrotitar pločama zavise od strukture i dostupnosti nativnih supstrata i stoga nisu uvek primenljivi, i protok je limitiran na $10^3 - 10^4$ varijanti po pretraživanju.

Za pretraživanje velikih enzimskih biblioteka potrebno je pronaći platformu koja omogućava veći protok od mikrotitar ploča i zadržava vezu između fenotipa i genotipa, što je omogućeno pretraživanjem na FACS-u (eng. *fluorescent activated cell sorting*) tj protočnom citometru⁸⁸. Princip protočne citometrije se zasniva na prolazu pojedinih ćelija kroz tok tečnosti, tokom kog su one ekscitovane laserom. Nakon ekscitacije i prolaska kroz mernu optiku, ćelije odašilju brojne signale koji uključuju veličinu i strukturu povezani *forward* i *side scatter*, kao i fluorescentne signale koji zavise od korišćenog obeležavanja¹⁵². Sa protočnom citometrijom analiza 10^4 ćelija je standardna procedura, što je veoma značajno za primenu u biotehnologiji¹⁵³. Za pretraživanje i selekciju enzimske aktivnosti FACS-om najčešće se koriste metode zarobljavanje proizvoda (**Slika 8A**), ekspresija na površini (**Slika 8B**) i *in vitro* kompartmentalizacija (**Slika 8C**)¹⁵¹.



Slika 8. Šematski prikaz HTS metoda. **A)** Zarobljavanje proizvoda; pravougaonik, oval, trougao i zvezda predstavljaju gen, proizvod gena, supstrat i fluorescentni proizvod koji ostaje zarobljen u ćeliji nakon enzimske reakcije. **B)** Ekspresija na površini ćelija; fluorescentni proizvod je enzimski vezan za površinu ćelije. **C)** *In vitro* kompartmentalizacija (IVC); žuti oval predstavlja kap emulzije. **D)** FACS; ćelije ili emulzije sa različitom fluorescencijom mogu biti sortirane FACS-om velikom brzinom (modifikovano iz publikacije Xiao et al. 2015)¹⁵¹

In vitro kompartmentalizacija se bazira na pravljenju veštačkih odeljaka, kao na primer jednostruke emulzije vode u ulju (W/O) ili dvostruke emulzije voda-ulje-voda (W/O/W), da bi se izolovali individualni DNK molekuli, odnosno formirali nezavisni reaktori za bez-ćelijsku sintezu proteina i enzimsku reakciju¹⁵⁴. Odeljci predstavljaju kapljice vode veličine bakterije dispergovane u ulju, sa nekoliko osobina koje ih čine posebno pogodnim za *in vitro* evoluciju: eksterna faza je inertna, interna faza je biohemijski aktivna, nema difuzije gena ili proteina između kapljica, moguće je optimizovati veličinu kapljica¹⁵⁵.

Dvostruke emulzije W/O/W su uspešno korišćene za *in vitro* dirigovanu evoluciju β -galaktozidaze¹⁵⁶. Mikrofluidikom je IVC značajno unapređen, pravljenjem odeljaka u pikolitarskim zapreminama za kraće vreme, većom osetljivošću i većim protokom nego standardni eseji¹⁵⁷. Prednost IVC u odnosu na *in vivo* bazirane metode pretraživanja je u zaobilazanju regulatornih mehanizama ćelija, kao i odsustvo transformacije čime veličina biblioteke više nije limitirana efikasnošću transformacije¹⁵¹. IVC se pokazala kompatibilnom sa širokim spektrom enzima, a naročito je pogodna za enzime koji se ne ekspimiraju na površini ćelija ili nemaju supstrate koji prolaze ćelijsku membranu. Ograničavajuću primenu IVC predstavlja formiranje uniformnih odeljaka kao i njihova stabilnost na hemijske i fizičke uslove tokom selekcije⁸⁸.

2.4.1. *In vivo* kompartmentalizacija

Ćelije predstavljaju prirodan odeljak koji može omogućiti enzimsku reakciju i povezivanje genotipa sa fenotipom. Korišćenje ćelija za dirigovanu evoluciju enzima je veoma pogodno jer FACS tehnologija omogućava i pretraživanje i sortiranje. Izazov u korišćenju ćelija za selekciju je u razvoju strategije da signal enzimskog eseja ostane vezan za ili unutar ćelije⁸⁸. Za metode zarobljavanja proizvoda (**Slika 8A**) neophodno je imati fluorescentni supstrat koji može biti transportovan u i iz ćelije, tako da reaguje sa enzimom od interesa. Nakon enzimske reakcije fluorescentni proizvod ne može da izađe iz ćelije zbog svoje veličine, polarnosti i hemijskih osobina, što omogućava FACS pretraživanje odgovarajućeg fenotipa¹⁵⁸. Upravo potreba za permeabilnim supstratom, kuplovanje enzimske aktivnosti sa fluorescentnim signalom, kao i rigidni hemijski uslovi unutar ćelije limitiraju enzime i supstrate podložne inženjeringu unutar ćelija¹⁵⁵. Generalniji pristup koristi ćelije, viruse ili čestice za ekspresiju na njihovoj površini (**Slika 8B**) tako da enzim ima pristup većem broju supstrata. Da bi se održao odnos između fenotipa i

genotipa signal enzimskog eseja mora ostati vezan za površinu ćelije ili čestice koja eksprimira određenu varijantu¹⁵¹. Ukoliko ne postoji mogućnost vezivanja signala za samu ćeliju, korišćenjem IVC tehnologije dvostrukih emulzija (W/O/W) je moguće fluorescentni signal zatvoriti u vodenu kapljicu koja sadrži ćeliju koja eksprimira određenu varijantu enzima, i nakon sortiranja izolovati ćeliju i gen koji nose¹⁵⁹.

Ekspresija na površini ćelija kvasca (engl. *yeast surface display*, YSD) je postala jedna od glavnih platformi za proteinski inženjering zbog nekoliko prednosti: eukariotski ekspresioni sistem koji omogućava post-translacione modifikacije; jednostavni tehnički zahtevi i uslovi; postojanje epitopa, koji omogućavaju normalizaciju proteinske funkcije u odnosu na ekspresiju; kompatibilnost sa protočnom citometrijom¹⁶⁰. Najčešće YSD sistem čine protein od interesa fuzionisan sa C-terminusom Aga2 subjedinice koja je disulfidnim vezama povezana sa Aga1 subjedinicom ukotvljenom u ćelijski zid kvasaca. Na ovaj način su uključena i dva epitopa za kvantifikaciju ekspresije pomoću fluorescentnih antitela, HA i c-myc epitop, koji ipak ne daju informaciju o uvijanju i funkciji proteina od interesa¹⁶¹.

YSD je najpre korišćen za proteinski inženjering proteina u cilju povećanja afiniteta prema vezujućim partnerima, kao što je evolucija T-ćelijskih receptora¹⁶², epidermalnog faktora rasta, interleukina-2¹⁶³, leptina i mnogih antitela¹⁶⁴. Ono što je izdvojilo ovaj sistem za pretraživanje vezivanja liganada je mogućnost analize i upoređivanja konstante vezivanja proteinskih varijanti dok se još uvek nalaze vezane za ćelije kvasca, bez potrebe za dugotrajnom ekspresijom i prečišćavanjem¹⁶⁰. Za proteine je pored funkcije bitna i njihova stabilnost u različitim sredinama, što je dovelo do dirigovane evolucije u cilju poboljšanja stabilnosti različitih proteina, gde je YSD našao veliku primenu¹⁶⁵. Za razlikovanje između proteina različitih stabilnosti koriste se dve metode, jedna je bazirana na odnosu nivoa ekspresije i termalne stabilnosti¹⁶⁶, dok se u drugoj ekspimirana biblioteka izlaže temperaturnom stresu nakon čega se vrši

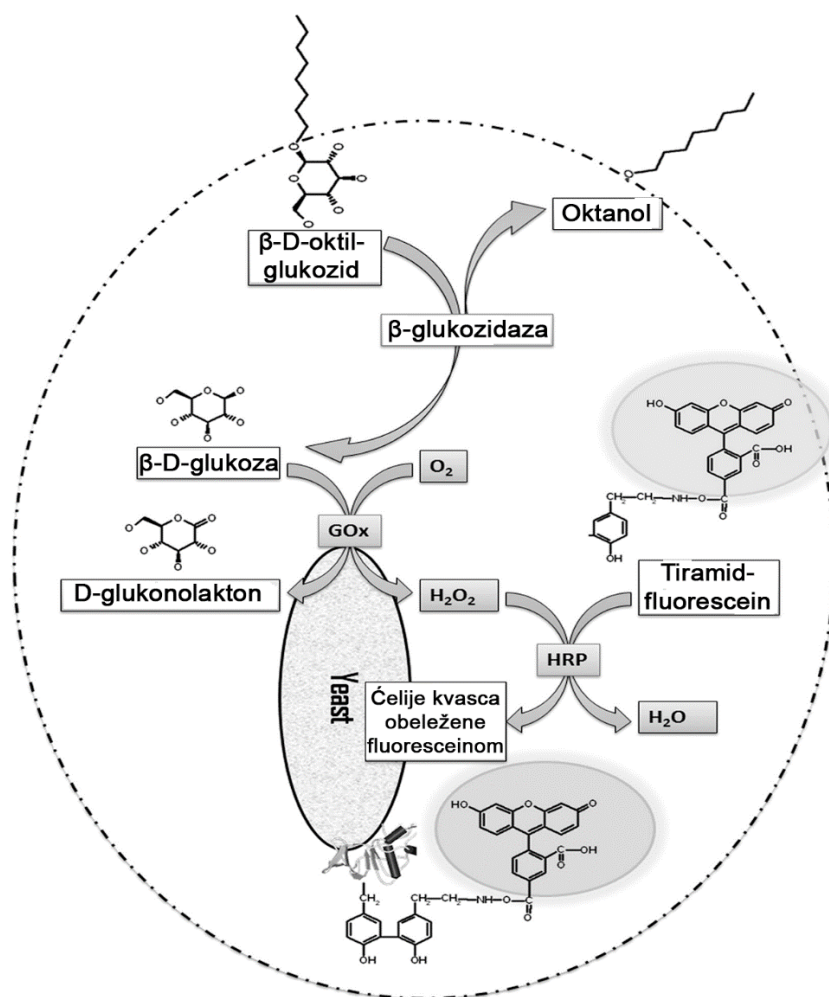
odabir onih varijanti koje su odolele termalnoj denaturaciji^{167,168}. Druga metoda se koristi za proteine koji već imaju određeni stepen temperaturne stabilnosti, ali ograničavajući faktor predstavlja vijabilnost ćelija kvasca koja se gubi već na 50°C, s tim što integritet same ćelije ostaje netaknut na višim temperaturama čime je moguća analiza na protočnom citometru¹⁶⁵.

Pored proteinskog inženjeringa, YSD se može koristiti u biotehnologiji i biomedicini za pravljenje biokatalizatora od celih ćelija za različite primene u industriji, na primer u pravljenju biogoriva ili elektrohemijske detekcije glukoze¹⁶⁰.

2.4.2. „High-throughput screening“ glukoza-oksidge

Cilj dirigovane evolucije GOx je u poboljšanju aktivnosti i stabilnosti za upotrebu u industriji. Pretraživanjem u mikrotitar pločama je moguće naći poboljšane varijante enzima u bibliotekama koje imaju visoki procenat aktivnih varijanti, tj. nisku stopu mutacija po genu, i koje nisu velike po veličini (1000 – 10000 varijanti)^{35,36}. Iz tih razloga se ukazala potreba za razvojem HTS metode da bi se ispitaio uticaj većeg broja mutacija na aktivnost GOx, kojim bi bilo moguće pre-sortirati 2000-3000 najaktivnijih varijanti (iz biblioteke koja ima 10⁶ istih) koje bi potom bile detaljno analizirane u mikrotitar pločama. Jedna od tih metoda kombinuje *in vitro* kompartmentalizaciju ćelija kvasca koje eksprimiraju GOx u dvostrukim emulzijama i fluorescentni esej na bazi amino-fenoksi-karboksi-kumarina (APCC) i vanadijum-bromo-peroksidaze (ViPer esej). Ovom metodom je veza između fenotipa i genotipa održana pravljenjem kompartmentata u kojima se nalazi po jedna ćelija kvasca sa eksprimiranom GOx, tako da nakon reakcije fluorescentni proizvod ostaje u vodenoj kapljici koja se sortira zajedno sa ćelijom¹⁰. Ovaj esej je upotrebljen i za HTS celulaza, čime je pokazano da se fluorescentni esej za oksidoreduktaze može uspešno koristiti i za pretraživanje hidrolitičkih enzima u kuplovanom eseju¹⁶⁹.

Napredak u pretraživanju GOx biblioteka napravljen je kovalentnim obeležavanjem ćelija koje eksprimiraju aktivnu GOx na površini, pomoću fluorescentnog tiramida koji se vezuje za tirozinske ostatke proteina, čime se postiže direktna povezanost fenotipa i genotipa⁹. Glavni izazov u sistemu pretraživanja baziranom na obeležavanju tiramidima u rastvoru je ograničavanje vezivanja tiramida za ćeliju koja eksprimira aktivnu varijantu enzima a ne i ostale ćelije u rastvoru. To je moguće za ćelije koje ekspimiraju HRP na svojoj površini¹⁷⁰ ali je teško postići u slučajevima kuplovanih reakcija kada je vodonik-peroksid proizveden od strane analiziranog proteina. Da ne bi dolazilo do ukrštene reakcije, IVC u jednostrukim emulzijama je omogućila separaciju pojedinačnih ćelija koje su potom izvučene iz emulzija i analizirane na protočnom citometru. Obeležavanjem ćelija fluorescein-tiramidom je moguće kvantitativno odrediti ćelije sa aktivnijom enzimskom varijantom, ali intenzitet fluorescencije takođe zavisi od količine ekspimiranog proteina na površini, što može dovesti do lažno pozitivne selekcije⁹. Dodatno unapređenje pretraživanja GOx postignuto je uvođenjem sistema dostave supstrata, koristeći β -oktil-glukozid i β -glukozidazu za preciznu kontrolu početka enzimske reakcije i koncentracije glukoze (**Slika 9**). Pored toga uvedena je i normalizacija intenziteta fluorescencije korišćenjem fluorescentnih antitela za c-myc epitop u cilju kvantifikacije ekspimiranog proteina na površini ćelije⁸. Iako je vezivanje antitela veoma specifično, njihova upotreba ima i svojih limita u vidu nekonzistentnih serija napravljenih od strane proizvođača kao i vremena potrebnog za obeležavanje.

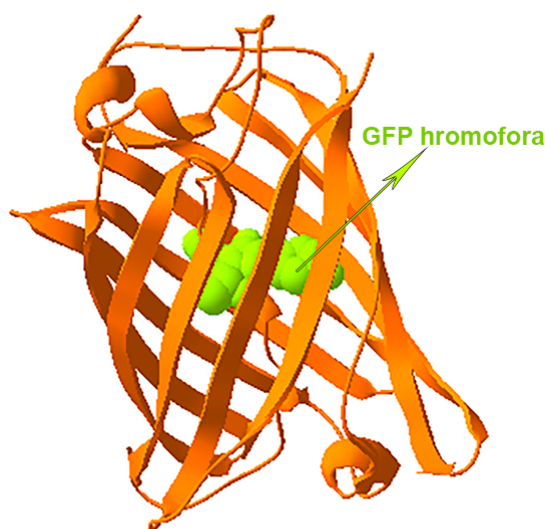


Slika 9. Šematski prikaz FACS sistema za pretraživanje baziranog na obeležavanju fluorescein-tiramidom ćelija kvasca koje na svojoj površini eksprimiraju GOx (modifikovano iz publikacije Ostafe et al)⁸

2.5. Zeleni fluorescentni protein (GFP)

Zeleni fluorescentni protein (eng. *green fluorescent protein*, GFP) je monomerni protein od 27 kDa prvi put izolovan iz meduze *Aequorea victoria*, a karakteriše ga jedna od najprepoznatljivijih trodimenzionalnih struktura u obliku β -burenceta sastavljenog od 11 β -lanaca koji okružuju jedan α -heliks (Slika 10)¹⁷¹. U visokim koncentracijama GFP ima sposobnost da formira slabe

dimere, što može da interferira sa funkcijom proteina sa kojim je fuzionisan¹⁷². Hromofora GFP je rezultat autokatalitičke ciklizacije polipeptidnog lanca između ostataka Ser⁶⁵ i Gly⁶⁷ i oksidacije α - β veze Tyr⁶⁶ u prisustvu vazduha^{173,174}. Poslednja istraživanja su pokazala da formiranje hromofore stvara slobodne radikale koji utiču na gensku ekspresiju i metaboličke puteve povezane sa oksidativnim stresom u sisarskim ćelijama¹⁷⁵. Divlji tip GFP apsorbuje svetlost na dve talasne dužine, 395 nm (maksimum ekscitacije) i 475 nm, što može biti objašnjeno postojanjem dve forme hromofore, neutralne i anjonske¹⁷⁶. Jedna od jedinstvenih osobina GFP je osetljivost njegove fluorescencije u odnosu na promene u okolini, što je korišćeno za pretraživanje inhibitora β -laktamaze jer se fluorescencija GFP smanjuje pri snižavanju pH vrednosti do koje dolazi hidrolizom β -laktamskog prstena¹⁷⁷. Vezivanje kalcijuma i inhibitora za protein kalmodulin, koji ima značajnu ulogu u regulaciji preuzimanja dopamina u živim ćelijama, je takođe praćeno promenom u fluorescenciji GFP^{178,179}.



Slika 10. Trodimenzionalna struktura zelenog fluorescentnog proteina (PDB kod 1EMA). Slika je kreirana korišćenjem programa Swiss-PdbViewer verzija 4.1.0 (Švajcarska)

Zbog male veličine GFP se lako eksprimira kao fuzioni partner bilo na N- ili C-kraju proteina, a sposobnost autofluorescencije omogućava široku upotrebu u biohemijским i biološkim istraživanjima, kao što su *in vivo* lokalizacija u ćelijama¹⁸⁰, praćenje ekspresije i prečišćavanja proteina¹⁸¹, praćenje sekretornih puteva u sisarskim ćelijama¹⁸² i dr. U radu sa fuzionim proteinima najvažnije je da oba proteina zadrže svoju funkciju kao i pravilno uvijanje. U svom radu Vu i saradnici su povezivali aktivnost organofosforne hidrolaze sa fluorescencijom GFP ekspimirane u *E. coli*, u cilju merenja količine aktivne hidrolaze koja je proizvedena. Mada su pokazali da je aktivnost enzima smanjena kada je on fuzionisan sa GFP, uspeli su da je povrate nakon razdvajanja ta dva proteina enterokinazom¹⁸¹. Pored upotrebe kao fuzionog markera, GFP se može koristiti i kao indikator uspešnog kloniranja u *E. coli*^{183,184}.

Da bi se proširila upotreba GFP u istraživanju, pronađen je GFP mutant (S65T, F64L, poznat kao EGFP) čiji je maksimum apsorpcije pomeren na 488 nm, što je jedna od uobičajenih talasnih dužina koje se koriste u protočnoj citometriji¹⁸⁵. Optimizacijom kodona i uvođenjem novih mutacija (S65G, S72A) napravljen je unapređeni GFP (yGFP) koji je korišćen kao efikasni reporter u *S. cerevisiae* i *Candida albicans*^{186,187}. Uprkos mnogim naporima i koristeći različite signalne peptide, i GFP i EGFP su pokazivali niske nivoe sekrecije u kvascima^{188,189}. Upotrebom sintetičke prepro signalne sekvence yGFP je uspešno sekretovan van ćelija kvasca, potvrđujući da je pored odgovarajuće sekvence i forma GFP bitna za transport i procesuiranje u kvascu. Huang i saradnici su ispitivali uticaj temperature na nivo sekretovanog GFP i pokazali da temperatura od 20°C dovodi do najvećeg nivoa ekspresije vanćelijskog GFP^{190,191}. Pored uspešne sekrecije van ćelija, yGFP fuzionisan sa Aga2 proteinom je ekspimiran na površini ćelija kvasca¹⁹¹, gde se može lako vizuelizovati koristeći fluorescentni mikroskop i kvantifikovati protočnom citometrijom¹⁹²⁻¹⁹⁴.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Predmet ovog istraživanja je dobijanje mutanata glukoza-oksidge iz *A. niger* sa poboljšanim karakteristikama za potencijalnu upotrebu u biosenzorima i biogorivnim ćelijama, kao i optimizacija novih metoda visoko efikasne pretrage biblioteke gena glukoza-oksidge zasnovanih na protočnoj citometriji i ekspresiji na površini ćelija kvasca.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su:

- razvoj metode za pronalaženje oksidativno stabilnijih varijanti oksido-reduktivnih enzima zasnovane na ekspresiji proteina na površini ćelija kvasca
- mutanti GOx otporniji na vodonik-peroksid u odnosu na divlji tip enzima
- mutanti GOx sa poboljšanom katalitičkom aktivnošću u odnosu na divlji tip enzima
- mutanti GOx sa poboljšanom aktivnošću ka redoks medijatorima u odnosu na divlji tip enzima
- ekspresija himere GOx i zelenog fluorescentnog proteina na površini ćelija kvasca
- unapređenje visoko efikasne metode pretraživanja biblioteka gena GOx zasnovane na protočnoj citometriji

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Izvor gena za glukoza-oksidadu

Sintetički gen za glukoza-oksidadu iz soja *Aspergillus niger* NRLL-3 je dobijen od kompanije GenScript USA na osnovu nukleotidne sekvence za zreo protein (P13006) u nukleotidnoj banci podataka EMBL-EBI pod brojem X16061.1. Gen za M12 mutant glukoza-oksidadu (N2Y, K13E, T30V, I94V, K152R) dobijen je dirigovanom evolucijom⁹.

4.1.2. Izvor gena za zeleni fluorescentni protein

Gen za zeleni fluorescentni protein prilagođen za ekspresiju u kvascima je dobijen od profesora Erik Šuste sa Univerziteta u Vinskonsinu, SAD. Ova verzija proteina sadrži tri mutacije (S65G, S72A, A206K) u odnosu na prirodni tip proteina iz meduze *Aequorea victoria* (P42212), koje omogućavaju bolju ekspresiju u kvascima, solubilnost i povećanu fluorescenciju¹⁸⁷.

4.1.3. Vektori i sojevi

Escherichia coli DH5 α i XL10gold sojevi su korišćeni kao domaćin za kloniranje gena i održavanje plazmida. Za ekspresiju gena glukoza-oksidadze na površini ćelija kvasca korišćen je soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 i vektor pCTCON2 (dobijeni od profesora Dejn Vitrapa sa MIT, SAD). Za ekstracelularnu ekspresiju glukoza-oksidadze korišćen je soj kvasca *Pichia pastoris* KM71H i vektor pPICZ α A naručeni od kompanije Invitrogen, Kalifornija, SAD.

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 suspendovanjem određene količine sastojaka u demineralizovanoj vodi i sterilisane u autoklavu na 121°C 20 minuta.

4.2.1. Podloge za rast bakterija

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

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

4.2.1.2. Luria-Bertani tečna podloga za rast bakterija koje imaju rezistenciju na zeocin (LB-zeocin)

U 1000 mL demineralizovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl i 10 g triptona, pH podešeno na 7,4. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi u sterilnoj zoni dodato je 250 µL sterilnog rastvora zeocina koncentracije 100 mg/mL tako da finalna koncentracija u rastvoru bude 25 µg/mL.

4.2.1.3. Luria-Bertani čvrsta podloga za rast bakterija koje imaju rezistenciju na zeocin (LA-zeocin)

U 1000 mL demineralizovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 10 g triptona i 20 g agara, pH podešeno na 7,4. Nakon sterilizacije, podlozi ohlađenoj na 40-50°C u sterilnoj zoni dodato je 250 µL sterilnog

rastvora zeocina koncentracije 100 mg/mL tako da finalna koncentracija u rastvoru bude 25 µg/mL.

4.2.1.4. Luria-Bertani tečna podloga za rast bakterija koje imaju rezistenciju na ampicilin (LB-ampicilin)

U 1000 mL demineralizovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl i 10 g triptona, pH podešeno na 7,4. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi u sterilnoj zoni dodato je 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 koje imaju rezistenciju na ampicilin (LA-ampicilin)

U 1000 mL demineralizovane vode rastvoreno je 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 10 g triptona i 20 g agara, pH podešeno na 7,4. Nakon sterilizacije, podlozi ohlađenoj na 40-50°C u sterilnoj zoni dodato je 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 demineralizovane 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 demineralizovane vode rastvoreno je 10 g ekstrakta kvasca i 20 g triptona. Nakon sterilizacije, ohlađenoj podlozi dodato je 100 mL 20% (w/v) glukoze koja je prethodno sterilisana.

4.2.2.2. Čvrsta podloga za rast kvasaca (YPD agar)

U 900 mL demineralizovane 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) glukoze koja je prethodno sterilisana.

4.2.2.3. Čvrsta podloga za rast kvasaca koji imaju rezistenciju na zeocin (YPD+zeocin agar)

U 900 mL demineralizovane vode rastvoreno je 10 g ekstrakta kvasca, 20 g triptona i 20 g agara, pH podešeno 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 demineralizovane 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) glukoze koja je prethodno sterilisana.

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

U 900 mL demineralizovane 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) glukoze koja je prethodno sterilisana.

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

U 900 mL demineralizovane 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, podlozi ohlađenoj na 40-50°C dodato je 100 mL 20% (w/v) glukoze koja je prethodno sterilisana.

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

U 900 mL demineralizovane 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) galaktoze koja je prethodno sterilisana.

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

U 900 mL demineralizovane 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, podlozi ohlađenoj na 40-50°C dodato je 100 mL 20% (w/v) galaktoze koja je prethodno sterilisana.

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

U 900 mL demineralizovane vode rastvoreno je 13,6 g kalijum-dihidrogen-fosfata, 3,4 g azotne baze kvasca bez amonijum sulfata i aminokiselina (YNB) i 10 g amonijum sulfata, pH podešeno 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.

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

U 990 mL demineralizovane vode rastvoreno je 13,6 g kalijum-dihidrogen-fosfata, 3,4 g azotne baze kvasca bez amonijum sulfata i aminokiselina (YNB) i 10 g amonijum sulfata, pH podešeno 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 i XL10gold

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 *S. cerevisiae* EBY100

Sa YPD agar ploče jedna kolonija *S. cerevisiae* 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 obrtaja/min. Finalno su ćelije resuspendovane u 500 µL sterilnog FCC rastvora (5% glicerol, 10% DMSO), podeljene u alikvote po 50 µL i zamrznute na -80°C.

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

Sa YPD agar ploče jedna kolonija *P. pastoris* KM71H je inokulirana u 3 mL YPD tečne podloge koja sadrži 12,5 µg/mL hloramfenikola i gajena u šejkeru (250 obrtaja/min) preko noći na 30°C. Prebaciti 100 µL prekonoćne 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 µL ledenog 1 M sorbitola, dodato je 60 µL 100% glicerola i podeljene u alikvote po 50 µL i zamrznute na -80°C.

4.3. Molekularno-biološke metode

Reagensi korišćeni za molekularno-biološke metode su naručeni od kompanije Thermo Fisher Scientific, SAD, osim ako nije drugačije naglašeno.

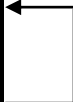
4.3.1. Kloniranje gena za zeleni fluorescentni protein u pCTCON2 vektor

4.3.1.1. Umnožavanje gena za zeleni fluorescentni protein

Gen za zeleni fluorescentni protein (GFP) umnožen je PCR (*polymerase chain reaction*) reakcijom koristeći prajmere iz priloga 1. Smeša za PCR reakciju sadrži sledeće komponente:

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

Program za PCR reakciju:

Inicijalna denaturacija	94°C	4 min	 30 ciklusa
Denaturacija	94°C	1 min	
<i>Annealing</i>	50°C	1 min	
Elongacija	72°C	1 min	
Terminalna elongacija	72°C	10 min	

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 restrikcionim enzimima

Prečišćeni PCR proizvod gena za zeleni fluorescentni protein i pCTCON2 vektor podvrgnuti su dvostrukoj restrikciji sa *BamHI* i *XhoI* restrikcionim enzimima. Smeša za dvostruku restrikciju sadrži sledeće komponente:

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

Restrikciona 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 ligiran sa pCTCON2 vektorom pomoću T4 DNK ligaze. Ligaciona smeša sadrži sledeće komponente:

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

Smeša je inkubirana 16 sati na 14°C. Nakon 16 sati reakcija je prekinuta inkubiranjem 5 minuta na 70°C. Sa 5 µL ligacione smeše transformisane su kompetentne ćelije *E.coli*.

4.3.2. Kloniranje glukoza-oksidaznog gena u pCTCON2 i GFP-pCTCON2 vektor

4.3.2.1. Umnožavanje gena za glukoza-oksidazu

Sintetički gen za wild-type glukoza-oksidazu i A2 mutant (dobijen eksperimentima dirigovane evolucije) 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 60°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.

4.3.2.2. Dvostruka digestija restrikcionim enzimima

Prečišćeni PCR proizvodi gena za glukoza-oksidazu (WT, A2) i pCTCON2 i GFP-pCTCON2 vektor podvrgnuti su dvostrukoj restrikciji sa *BamHI* i *NheI* restrikcionim enzimima na sledeći način:

Komponenta	PCR proizvodi	Vektor
10X <i>Tango</i> 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	11 µL	11 µL
<i>MiliQ</i> voda	5 µL	5 µL
Ukupna zapremina	20 µL	20 µL

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.

4.3.2.3. Ligacija umnoženog gena i vektora

Svaki digestovan PCR proizvod je ligiran sa pCTCON2 odnosno GFP-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/ μ L)	5 μ L
Digestovan PCR proizvod (12 ng/ μ L)	5 μ L
T4 DNK ligaza (5 U/ μ L)	0,3 μ L
Ukupna zapremina	20 μL

Smeša je inkubirana 16 sati na 14°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*.

4.3.3. Kloniranje glukoza-oksidadnog gena u pPICZaA vektor

4.3.3.1. Umnožavanje gena za glukoza-oksidadzu

Sintetički gen za wild-type glukoza-oksidadzu i M12 mutant 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

MATERIJAL I METODE

elongacije 2,15 minut, a kao templat za M12 gen je korišćen M12-pYES2 plazmid.

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 restrikcionim enzimima

Prečišćeni PCR proizvodi gena za glukoza-oksidadzu (WT, M12) i pPICZ α A vektor podvrgnuti su dvostrukoj restrikciji sa *XhoI* i *XbaI* restrikcionim enzimima. Smeša za dvostruku restrikciju sadrži sledeće komponente:

Komponenta	PCR proizvodi	Vektor
10X <i>Tango</i> pufer	4 μ L	4 μ L
<i>XhoI</i> restrikcioni enzim (10 U/ μ L)	1,5 μ L	1,5 μ L
<i>XbaI</i> restrikcioni enzim (10 U/ μ L)	3 μ L	3 μ L
Uzorak	10 μ L	10 μ L
<i>MiliQ</i> voda	1,5 μ L	1,5 μ L
Ukupna zapremina	20 μL	20 μL

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 vektor 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

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

Smeša je inkubirana 16 sati na 14°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 saturacionih biblioteka glukoza-oksidade u pCTCON2 vektoru

Za pravljenje saturacionih biblioteka glukoza-oksidade korišćeni su odgovarajući prajmeri iz priloga 1, na pozicijama metionina 190, 214, 305, 480, 523, 524, 528, 556, 561, 567 i 582. Biblioteke su napravljene pomoću *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* kita (Agilent Technologies, SAD) po uputstvu proizvođača koristeći 12,5 ng wtGOx-pCTCON2 plazmida kao templat. Program za PCR:

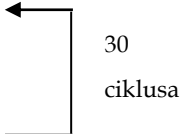
Inicijalna denaturacija	95°C	30 s
Denaturacija	95°C	30 s
Annealing	55°C	1 min
Elongacija	68°C	8 min

← 16 ciklusa

Nakon transformacije bakterija, svi transformanti jedne biblioteke su spojeni i plazmidi izolovani zajedno. Sa izolovanim plazmidom su transformisane kompetentne *S.cerevisiae* EBY100 ćelije koje su činile jednu saturacionu biblioteku na odgovarajućoj poziciji.

4.3.5. Pravljenje kombinovanih mutanata glukoza-oksidge u pCTCON2 i pPICZ α A vektoru

Za pravljenje kombinovanih mutanata glukoza-oksidge korišćeni su odgovarajući prajmeri iz priloga 1, na pozicijama metionina 214, 556, 561 i 567. Biblioteke su napravljene pomoću *QuikChange Lightning MultiSite-Directed Mutagenesis* kita (Agilent Technologies, SAD) po uputstvu proizvođača koristeći 50 ng wtGOx-pCTCON2 i wtGOx-pPICZ α A plazmida kao templat. Program za PCR:

Inicijalna denaturacija	95°C	2 min	
Denaturacija	95°C	20 s	
<i>Annealing</i>	55°C	30 s	
Elongacija	65°C	4,5 min za pCTCON2 3 min za pPICZ α A	
Terminalna elongacija	65°C	5 min	

Nakon transformacije bakterija, sa izolovanim plazmidima kombinovanih mutanta transformisane su kompetentne ćelije *S. cerevisiae* EBY100 i *P. pastoris* KM71H.

4.3.6. Pravljenje biblioteke glukoza-oksidge u GFP-pCTCON2 vektoru

Za pravljenje biblioteke glukoza-oksidge korišćeni su prajmeri iz priloga 1, koristeći *GeneMorph II Random Mutagenesis* kit (Agilent Technologies, SAD) po uputstvu proizvođača i 45 ng/ μ L templata wtGOx-GFP-pCTCON2. PCR program za pravljenje biblioteke:

MATERIJAL I METODE

Inicijalna denaturacija	95°C	2 min
Denaturacija	95°C	30 s
<i>Annealing</i>	60°C	30 s
Elongacija	72°C	2 min
Terminalna elongacija	72°C	10 min

← 30 ciklusa

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 korišćen kao megaprajmer za PCR sa *Phusion High-Fidelity Polymerase* (New England Biolabs, Nemačka), a smeša je sadržala 450 ng megaprajmera, 50 ng templata wtGOx-GFP-pCTCON2, 3% DMSO i ostale komponente po uputstvu proizvođača. Program za PCR:

Inicijalna denaturacija	98°C	1 min
Denaturacija	98°C	30 s
<i>Annealing</i>	60°C	1 min
Elongacija	72°C	4 min
Terminalna elongacija	72°C	10 min

← 25 ciklusa

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.

4.3.7. 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 podvrgnuta 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 transformisnih ćelija je zasejano na LA agar podlogu sa odgovarajućim antibiotikom. LA podloge su inkubirane preko noći na 37°C.

4.3.8. Izolovanje plazmida

4.3.8.1. Izolovanje plazmida iz bakterija

Kolonija sa LA čvrste podloge sa odgovarajućim antibiotikom je inokulisana u 3 mL LB tečne podloge sa odgovarajućim antibiotikom i gajena u šejkeru (250 obrtaja/min) na 37°C preko noći. Prekonoćna kultura je prebačena u ependorf od 1,5 mL i centrifugirana 1 minut na 13000 obrtaja/min. Supernatant je odbačen a ćelije resuspendovane u 150 µL hladnog rastvora GTE+ (25 mM TRIS, 10 mM EDTA, 50 mM glukoza, 100 µg/mL ribonukleaze, pH 8,0). Potom je dodato 300 µL svežeg P2 rastvora (200 mM NaOH, 1% SDS) i polako mešano dok se sadržaj nije izbistrio. Zatim je dodato 450 µL 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 µL 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.

4.3.8.2. 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 -merkaptoetanol) i na kraju suspendovane u 30 μL istog pufera. Suspenziji ćelija je dodato 10 μL litikaze 5 U/ μL , 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.

4.3.9. 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 μL
Plazmid	4 μL
10X pufer za <i>EcoRI</i>	1 μL
<i>EcoRI</i> (10 IU/ μL)	0,5 μL
Ukupna zapremina	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 glukoza-oksidaze na površini ćelija kvasca

4.4.1. 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 μL 50% rastvora PEG3350, 36 μL 1M litijum-acetata, 50 μL prokuvane jednolančane DNK (2 mg/mL), 14 μL plazmidne DNK (pCTCON2 sa ili bez ukloniranog gena za glukoza oksidazu). 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, i 200 µL ćelija je zasejano na YNB-CAA+Glc agar ploču. Ćelije su inkubirane 2 dana na 30°C.

4.4.2. Ekspresija glukoza-oksidaze u *S. cerevisiae* EBY100 u mikrotitar ploči

Sa YNB-CAA+Glc agar ploče kolonije transformisanog kvasca *S. cerevisiae* EBY100 su presejane u bunare mikrotitar ploče (F tipa) koji sadrže 150 µL YNB-CAA+Glc tečnog medijuma sa hloramfenikolom i gajene 2 dana na 30°C (odnosno 25°C ukoliko je eksprimirana himera GOx-GFP) 700 obrtaja/min u eliza sejkeru PST-60HL (Biosan, Riga, Letonija). Iz saturacione kulture 5 µL je prebačeno u bunare nove mikrotitar ploče koji sadrže 30 µL YNB-CAA+Glc tečnog medijuma, i ćelije su gajene pod istim uslovima još 24 sata. Ekspresija gena je indukovana dodavanjem 80 µL YNB-CAA+Gal tečnog medijuma, i gajenjem ćelija pod istim uslovima u narednih 16 sati. Nakon šesneastočasovne indukcije, merena je aktivnost glukoza-oksidaze u ćelijskoj suspenziji. Svaka mikrotitar ploča je imala zasejanih 5 kolonija kvasca koje eksprimiraju wtGOx zbog standardizacije merenja.

4.4.3. Ekspresija himere glukoza-oksidaze i zelenog fluorescentnog proteina u *S. cerevisiae* EBY100

Sa YNB-CAA+Glc agar ploče kolonija transformisanog kvasca *S. cerevisiae* EBY100 je zasejana u 5 mL YNB-CAA+Glc tečnog medijuma i gajena 2 dana na 27°C 160 obrtaja/min. Ekspresija himere glukoza-oksidaze i zelenog fluorescentnog proteina je indukovana dodavanjem YNB-CAA+Gal tečnog medijuma tako da optička gustina na 600 nm bude ~1. Ćelije su eksprimirale protein 18 sati pod istim uslovima.

4.5. Sinteza fluorescentnog tiramida

Sinteza fluorescentnog tiramida za kovalentno obeležavanje ćelija je rađena po modifikovanoj prethodno objavljenoj proceduri. N-hidroksisukcinimid estar-DyLight650 (Thermo Fisher Scientific, SAD) je rastvoren u dimetilformamidu u koncentraciji 10 mg/mL. Tiramin-hidrohlorid (5 mg) je rastvoren u 500 μ L dimetilformamida i 5 μ L trietilamina je dodato u rastvor. U 100 μ L rastvora DyLight650 je dodato 14,8 μ L rastvora tiramina, nakon čega je smeša mešana 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Rastvor je razblažen sa 309 μ L etanola do finalne koncentracije DyLight650-tiramida od 2 mM.

4.6. Protočna citometrija

4.6.1. Obeležavanje ćelija kvasaca sa tiramidom i glukozom kao supstratom

Ćelije kvasca koje eksprimiraju konstrukt GOx-GFP na svojoj površini su isprane 3 puta sa PBS-om i koncentracija ćelija je podešena na 2×10^8 ćelija/mL ($OD_{600}=1$ odgovara koncentraciji ćelija od 2×10^7 ćelija/mL). U 12,5 μ L ćelija dodato je 12,5 μ L reakcione smeše (1,25 μ L 1 M glukoze, 5 μ L 50 IU/mL HRP, 0,25 μ L 2 mM DyLight650-tiramida, 6 μ L PBS). Odmah nakon mešanja suspenzija je prebačena u 500 μ L 1,5% ABIL EM 90 u mineralnom ulju, i emulzifikovana 3 minuta na ledu koristeći MICCRA D-1 emulzifikator na 8000 obrtaja/min. Negativna kontrola reakcije je pripremana na identičan način ali bez prisustva glukoze. Reakciona smeša je držana 30 minuta na ledu, a reakcija zaustavljena dodavanjem 100 μ L 0,5 M askorbinske kiseline i 100 μ L 1% BSA u PBS-u i vorteksovanjem. Ćelije su izvučene iz emulzije ispiranjem 3 puta sa 1 mL 3% SPAN80 u mineralnom ulju, zatim ispiranjem 2 puta 1 mL 0,5%

TRITON X-100 u PBS-u, i na kraju ispiranjem 1 put sa 1 mL PBS-om. Čelije su na kraju resuspendovane u 1 mL PBS.

Čelije su analizirane na protočnom citometru BD Influx (BD Biosciences, SAD). Brzina analiziranja ćelija je 1000-5000 događaja/sec a sortiranja 10-100 događaja/sec. Za ekscitaciju su korišćeni laseri na 488 nm i 642 nm, a za detekciju emisije su korišćeni filteri na 530 nm i 670 nm. Pozitivne ćelije su označene na grafiku sa dvostrukom fluorescencijom i sortirane na YNB-CAA+Glc agarozne ploče sa hloramfenikolom. Sortirane ćelije su rasle 3 dana na 27°C.

4.6.2. Obeležavanje ćelija kvasaca sa tiramidom i β-oktil-glukozidom kao supstratom

Čelije kvasca koje eksprimiraju konstrukt GOx-GFP na svojoj površini su isprane 3 puta sa PBS-om i koncentracija ćelija je podešena na 2×10^8 ćelija/mL ($OD_{600}=1$ odgovara koncentraciji ćelija od 2×10^7 ćelija/mL). U 12,5 μL ćelija dodato je 12,5 μL reakcione smeše (5 μL 50 IU/mL HRP, 0,25 μL 2 mM DyLight650-tiramida, 3,5 μL β-glukozidaze 38 IU/mL, 3,75 μL PBS). Odmah nakon mešanja suspenzija je prebačena u 500 μL 1,5% ABIL EM 90 u mineralnom ulju, i emulzifikovana 3 minuta na ledu koristeći MICCRA D-1 emulzifikator na 8000 obrtaja/min. Nakon emulzifikacije u smešu je dodato 5 μL 37 mM β-oktil-glukozida. Negativna kontrola reakcije je pripremana na identičan način ali bez prisustva β-oktil-glukozida. Reakciona smeša je držana 30 minuta na ledu, a reakcija zaustavljena dodavanjem 100 μL 0,5 M askorbinske kiseline i 100 μL 1% BSA u PBS-u i vorteksovanjem. Čelije su izvučene iz emulzije ispiranjem 3 puta sa 1 mL 3% SPAN80 u mineralnom ulju, zatim ispiranjem 2 puta 1 mL 0,5% TRITON X-100 u PBS-u, i na kraju ispiranjem 1 put sa 1 mL PBS-om. Čelije su na kraju resuspendovane u 1 mL

PBS. Analiza ćelija protočnom citometrijom je rađena na način opisan u prethodnom pasusu.

4.7. Ekspresija i prečišćavanje glukoza-oksidaze

4.7.1. Transformacija *P. pastoris* KM71H

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

Komponenta	Zapremina
<i>MiliQ</i> voda	7 μL
Linearizovani plazmid	10 μL
10X <i>B</i> puffer	2 μL
<i>PmeI</i> (5 U/ μL)	1 μL
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 prečišćeni *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* kitom (Macherey-Nagel, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

Kompetentne ćelije *P. pastoris* KM71H su pomešane sa 10 μL 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 glukoza-oksidadze

Sa YPD zeocinske agar ploče jedna kolonija transformisane *P. pastoris* KM71H je inokulisana u 20 mL BMGH medijuma i gajena 24 sata na 30°C, 200 obrtaja/min. Po 10 mL inicijalne kulture je prebačeno u 2 erlenmajera koji su sadržali 0,5 L BMGH medijuma i ćelije su gajene pod istim uslovima još 24 sata. Ćelije su centrifugirane 15 minuta na 3000 obrtaja/min, i nakon toga resuspendovane u 200 mL BMMH medijuma i gajene pod istim uslovima naredna 4 dana. Svakog dana 2 mL 50% metanola je dodavano ćelijama tako da finalna koncentracija metanola bude 0,5%.

4.7.3. Prečišćavanje glukoza-oksidadze

Nakon fermentacije, ćelije su centrifugirane 30 minuta na 3000 obrtaja/min. Supernatant je filtriran kroz 0,22 μ m PTFE filter (Karl Rot, Nemačka) i filtrat je skoncentrovan do 10 mL koristeći *Viva Flow 50* sistem sa ultrafiltracionom membranom od 10 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). Glukoza-oksidadza je eluirana linearnim gradijentom od 10 do 500 mM natrijum-fosfatnog pufera pH 6,0 sa 10 zapremina kolone u frakcijama od 1 mL pri protoku od 0,5 mL/min. Frakcije koje su pokazale glukoza-oksidadznu aktivnost su spojene. U svakom koraku prečišćavanja određivani su aktivnost glukoza-

oksidaze i koncentracija proteina, a stepen prečišćenosti je analiziran SDS poliakrilamidnom elektroforezom.

4.8. Imobilizacija glukoza-oksidge na makroporoznom polimeru

Suvi aminovani poli-glicidil-metakrilatni polimer (0,1 g) je suspendovan u 1 mL 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 8,0 i dezaerisan 10 minuta. Polimer je ispran dva puta sa istim puferom i potom inkubiran 2 sata, uz povremeno mešanje, na sobnoj temperaturi u 2 mL 2,5% (v/v) glutaraldehida u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 8,0. Zatim je polimer ispran 3 puta sa po 5 mL 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 7,0, resuspendovan u 1 mL rastvora prečišćene GOx (0,1 mg/mL) i inkubiran 2 dana na 4°C uz povremeno mešanje. Nevezana glukoza-oksidge je isprana 2 puta sa po 5 mL 1 M NaCl u 50 mM natrijum-acetatnom puferu pH 5,5. Polimer sa imobilizovanom GOx je inkubiran 2 sata na sobnoj temperaturi u 2 mL 0,1 M etanolamina u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0. Imobilizovana glukoza-oksidge je na kraju isprana 2 puta sa 5 mL 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 7,0, 2 puta sa 5 mL 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,5 u kome je na kraju čuvana na 4°C.

4.9. Određivanje oksidativne stabilnosti glukoza-oksidge

4.9.1. Određivanje oksidativne stabilnosti glukoza-oksidge eksprimirane na površini ćelija kvasca

U ćelije kvasca koje eksprimiraju glukoza-oksidge (100 µL) dodato je 100 µL rastvora koja sadrži 100 mM vodonik-peroksid i 200 mM glukozu u 0,1 M natrijum-acetatnom puferu pH 5,5. Ćelije su u peroksidu inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije ćelije su centrifugirane, isprane 3 puta sa

200 μL 0,1 M natrijum-acetatnog pufera pH 5,5 i finalno resuspendovane u 100 μL istog pufera. Aktivnost glukoza-oksidadze je merena pre i nakon inkubiranja sa peroksidom, na način opisan u ovom radu. Rezidualna aktivnost enzima je definisana kao odnos aktivnosti posle i pre tretiranja peroksidom.

4.9.2. Određivanje oksidativne stabilnosti glukoza-oksidadze imobilizovane na makroporoznom polimeru

Imobilizovana glukoza-oksidadza (20 mg) je suspendovana u 250 μL 0,1 M natrijum-acetatnog pufera pH 5,5 i mešana na magnetnoj mešalici. Enzimaska reakcija je započeta dodavanjem 250 μL 500 mM glukoze. Na svakih 60 sekundi, u periodu od 5 minuta, uzimani su alikvoti od 20 μL i stavljeni u bunare mikrotitar ploče prethodno napunjenih sa 180 μL smeše koja sadrži 2 mM ABTS i 1 IU/mL HRP. Deset minuta nakon uzimanja poslednjeg alikvota, snimljena je apsorbanca na 405 nm. Količina nastalog vodonik-peroksida se određuje preko koncentracije oksidovanog ABTS-a čiji ekstinkcioni koeficijent na 405 nm iznosi 36,8 mL μmol^{-1} cm⁻¹. Aktivnost imobilizovane glukoza-oksidadze je definisana kao količina enzima koji oksiduje 1 μmol glukoze u 1 minutu po gramu polimera.

Za određivanje oksidativne stabilnosti, 20 mg imobilizovane glukoza-oksidadze je suspendovano u 500 μL 0,1 M natrijum-acetatnog pufera pH 5,5 koji sadrži 50 mM vodonik-peroksid i 100 mM glukoze. Polimer je mešan na magnetnoj mešalici 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije polimer je ispran 3 puta sa po 500 μL 0,1 M natrijum-acetatnog pufera pH 5,5. Aktivnost glukoza-oksidadze je merena pre i nakon inkubiranja sa peroksidom, na način opisan u prethodnom pasusu. Rezidualna aktivnost enzima je definisana kao odnos aktivnosti posle i pre tretiranja peroksidom.

4.10. Karakterizacija glukoza-oksidge

4.10.1. *Određivanje aktivnosti glukoza-oksidge*

U bunar mikrotitar pločice koja sadrži 95 μL 100 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,5 dodato je 5 μL uzorka enzima. Po dodatku 100 μL rastvora koji sadrži 500 mM glukoze, 2 mM ABTS, 2 IU/mL HRP merena je promena apsorbance u vremenu na 405 nm na eliza čitaču LKB 5060-006 (Beč, Austrija). 1 IU glukoza-oksidge predstavlja onu količinu enzima koja za 1 minut proizvede 1 μmol vodonik-peroksida. Količina vodonik-peroksida se određuje preko koncentracije oksidovanog ABTS-a čiji ekstinkcioni koeficijent na 405 nm iznosi 36,8 mL μmol^{-1} cm⁻¹.

4.10.2. *Određivanje kinetičkih parametara glukoza-oksidge*

Kinetički parametri glukoza-oksidge su određivani u finalno prečišćenom uzorku glukoza-oksidge, merenjem početne brzine reakcije na prethodno opisan način za koncentracije glukoze u rasponu od 5 do 500 mM, koristeći 100 mM natrijum-acetatni pufer pH 5,5 i PBS pH 7,4. Dobijeni eksperimentalni podaci su fitovani u Mihaelis-Mentenovu hiperbolu (OriginLab 8,0).

4.10.3. *Određivanje temperaturne stabilnosti glukoza-oksidge*

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

4.10.4. Određivanje šećerne specifičnosti glukoza-oksidge

Merenje aktivnosti glukoza-oksidge sa drugim šećerima rađena je koristeći PBS pufer pH 7,4. Kao supstrati korišćeni su galaktoza, manosa i maltoza u koncentraciji od 5 mM i 250 mM.

4.10.5. Određivanje pH optimuma glukoza-oksidge

Aktivnost glukoza-oksidge je određivana u 20 mM natrijum-fosfatno-citratnom puferu sa 137 mM natrijum hloridom u opsegu pH od 3 do 9.

4.10.6. Određivanje aktivnosti glukoza-oksidge sa N,N-dimetil-nitrozoanilinom

Aktivnost glukoza-oksidge sa redoks medijatorom određena je praćenjem promene apsorbance na 770 nm u reakcionoj smeši koja sadrži 10 mM N,N-dimetil-nitrozoanilin, 0,25% fosfomolibdensku kiselinu i 5 odnosno 200 mM glukoze u 10 mL 0,2 M kalijum-fosfatnog pufera pH 7,0. Promena apsorbance je praćena u prvih nekoliko minuta reakcije i relativna aktivnost je izraćunata po miligramu glukoza-oksidge u reakcionoj smeši.

4.10.7. Određivanje aktivnosti glukoza-oksidge sa ferocen-metanolom

Ferocen-metanol (redukovani) je delimićno rastvoren u 100 mM kalijum-fosfatnom puferu pH 3,0 u koncentraciji od 6 mM. Ferocen-metanol je enzimski oksidovan dodavanjem lakaze iz *Trametes versicolor* rastvorene u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu pH 3,0, tako da finalna koncentracija bude 7,2 mU/mL reakcije. Reakcija oksidacije je trajala 1h, i ferocen-metanol je postao

potpuno rastvoren. Oksidovani ferocen-metanol je na pH 3,0 plavo obojen. Oksidacija je prekinuta podešavanjem pH na 8,0 0,2 M natrijum-hidroksidom. Lakaza je uklonjena iz rastvora ultrafiltracijom, koristeći centrifugalne membranske filtere od 10 kDa.

Određivanje aktivnosti glukoza-oksidade sa ferocen-metanolom je rađeno u mikrotitar ploči, a reakciona smeša sadrži 100 μL oksidovanog ferocen-metanola, 10 μL uzorka prečišćenog enzima ($\sim 0,01$ mg/mL), glukoze u koncentraciji od 5 i 333 mM, i destilovanu vodu do finalne zapremine od 300 μL . Reakciona kinetika je snimana na 625 nm na eliza čitaču LKB 5060-006 (Beč, Austrija), a aktivnost enzima izračunata na osnovu ekstinkcionog koeficijenta ferocen-metanola na 625 nm od $0,413 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.10.8. Karakterizacija glukoza-oksidade cikličnom voltametrijom

Uzorci glukoza-oksidade su karakterisani *linear sweep* voltametrijom koristeći *CH Instruments Electrochemical Analyzer*. Kao radna elektroda korišćena je elektroda od staklastog ugljenika (*glassy carbon*), platinska žica je služila kao pomoćna elektroda, i Ag/AgCl elektroda je bila referentna elektroda. Uzorci glukoza-oksidade (0,5 mg/mL) i ferocen-metanola (0,5 mM) su rastvoreni u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 i snimani brzinom od 5 mV/s. Nakon snimanja, rastvoru je dodata glukoza u finalnoj koncentraciji od 5 mM i nakon 1 minuta snimanje je ponovljeno na identičan način. Rastvor je dezaerisan strujom azota pre svakog merenja, i azot je korišćen za nadslojavanje rastvora u toku merenja.

4.11. Analitičke metode

4.11.1. Određivanje kolonija kvasaca koje eksprimiraju glukoza-oksidadu

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 250 mM glukozu, 2 IU/mL HRP i 2 mM ABTS. Nakon 30 minuta, zeleno obojenje oko poraslih kolonija je naznaka aktivnosti glukoza-oksidadze.

4.11.2. 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. Teorijski ekstinkcioni koeficijent je izračunat koristeći program ProtParam, i koji iznosi 1,5 za koncentraciju 1 mg/mL glukoza-oksidadze.

4.11.3. 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 µL uzorka DNK pomešanog sa 1 µL komercijalne boje. Marker za DNK elektroforezu 1 kb Gene Ruler (Thermo Fisher Scientific, SAD) su nanošeni u količini od 2 µL. 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 µg/mL i snimljen pod UV lampom.

4.11.4. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

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

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
Ukupna zapremina	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 ispirava vodom i naliva se gel za koncentrovanje u koji se uranja češalj 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).

MATERIJAL I METODE

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

5. REZULTATI I DISKUSIJA

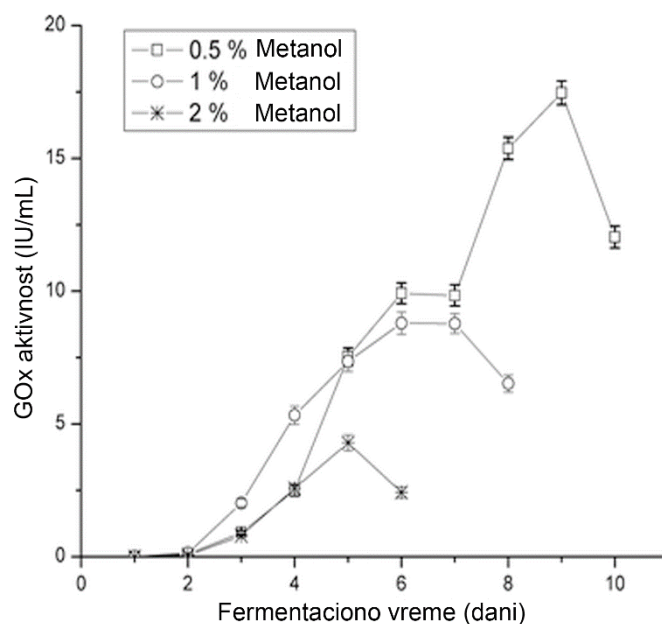
5.1. Ekspresija i karakterizacija M12 mutanta glukoza-oksidadze u *Pichia pastoris* KM71H

Divlji tip GOx (eng. *wild-type*, WT) i mutant M12 su prethodno eksprimirani u *S. cerevisiae* InvSc1 soju⁹. U cilju prevazilaženja problema niskog prinosa i niske specifične aktivnosti prečišćenih enzima dobijenih u ovom soju, testirana je ekspresija GOx u kvascu *P. pastoris* KM71H. Da bi ispitali podobnost ovog kvasca za proizvodnju GOx, divlji tip i M12 mutant GOx su klonirani u metanol-inducibilni vektor pPICZ α A. Sekvence za zreli gen GOx bez native pro-peptidne sekvence umnožene su PCR reakcijom koristeći prajmere koji sadrže *Xho*I i *Xba*I restrikciono mesto, čime je omogućeno kloniranje u pPICZ α A vektor posle sekvence proalfa faktora za ekstracelularnu ekspresiju proteina. Iz transformisanih bakterija izolovani su plazmidi i analizirani na prisustvo GOx gena, nakon čega su linearizovani i transformisani u elektrokompetentne *P. pastoris* KM71H ćelije.

5.1.1. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantne glukoza-oksidadze

Uslovi fermentacije u *P. pastoris* KM71H su optimizovani za divlji tip GOx da bi se odredili dužina fermentacije kao i koncentracija metanola za ekspresiju. Prvi korak je gajenje ćelija u glicerolnom medijumu BMGH dva dana, dok ćelije ne dostignu OD₆₀₀ između 2 i 3. Nakon rasta, ćelije su centrifugirane i resuspendovane u 5 puta manjoj zapremini BMMH medijuma. Fermentacija je radjena sa tri različite koncentracije metanola: 0,5%, 1% i 2% (v/v). U toku fermentacije merena je aktivnost GOx u fermentacionoj tečnosti dokle god je bila u porastu (**Slika 11**).

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 11. Aktivnost divljeg tipa GOx u toku fermentacije u BMMY medijumu sa različitim koncentracijama metanola (v/v)

Fermentacija u 2% metanolu je dostigla maksimum GOx aktivnosti petog dana, u 1% metanolu sedmog dana, u 0,5% metanolu devetog dana. Aktivnost GOx dobijena fermentacijom u *P. pastoris* je dva puta veća nego aktivnost dobijena u *S. cerevisiae* InvSc1 soju^{9,36}.

Nakon optimizacije uslova, uradjena je fermentacija na velikoj skali i divlji tip i M12 mutant GOx su prečišćeni DEAE jonoizmenjivačkom hromatografijom na pH 6.0. Prinos prečišćene GOx bio je oko 100 mg/L fermentacione tečnosti, a SDS elektroforeza je pokazala jednu traku približne molekulske mase od 85 kDa. Molekulska masa GOx proizvedene u *P.pastoris* je niža od molekulske mase enzima proizvedenog u *S. cerevisiae* (90-120 kDa)¹⁹⁵ što potvrđuje prethodne obzervacije da *Pichia* ima niži nivo glikozilacije rekombinantnih proteina u odnosu na *Saccharomyces*¹²⁸. Pored toga, postojanje izražene jedne trake na elektroforezi kod GOx proizvedene u *P. pastoris* pokazuje odsustvo mikroheterogenosti koja se javlja u *S. cerevisiae*, gde

REZULTATI I DISKUSIJA

ekstracelularno proizvedena GOx pokazuje veoma široku traku na elektroforezi kao posledica različitog stepena glikozilacije proteina¹⁹⁶. Sve ovo može da ima uticaj na specifičnu aktivnost enzima proizvedenog u ova dva kvasca¹⁹⁷.

5.1.2. Karakterizacija rekombinantne glukoza-oksidade

Da bi detaljnije okarakterisali M12 mutant proizveden u *P. pastoris* i proverili njegov potencijal za primenu u biokatalizi, biosensorima i biogorivnim ćelijama, određivani su kinetički parametri, pH optimum, šećerna specifičnost i aktivnost sa *N,N*-dimetil-nitrosoanilinom, redoks medijatorom koji se koristi u proizvodnji tračica za merenje glukoze¹⁹⁸.

5.1.2.1. Kinetička karakterizacija

Prečišćeni divlji tip i M12 mutant GOx su korišćeni za određivanje kinetičkih parametara kao što su K_m i k_{cat} na pH 5,5 i 7,4 i upoređeni sa rezultatima dobijenim za iste enzime eksprimirane u *S. cerevisiae* InvSc1⁹ (Tabela 2).

Tabela 2. Kinetičke konstante divljeg tipa i M12 mutanta GOx eksprimiranih u *P. pastoris* KM71H na pH 5,5 i 7,4 i u *S. cerevisiae* InvSc1 na pH 5,5

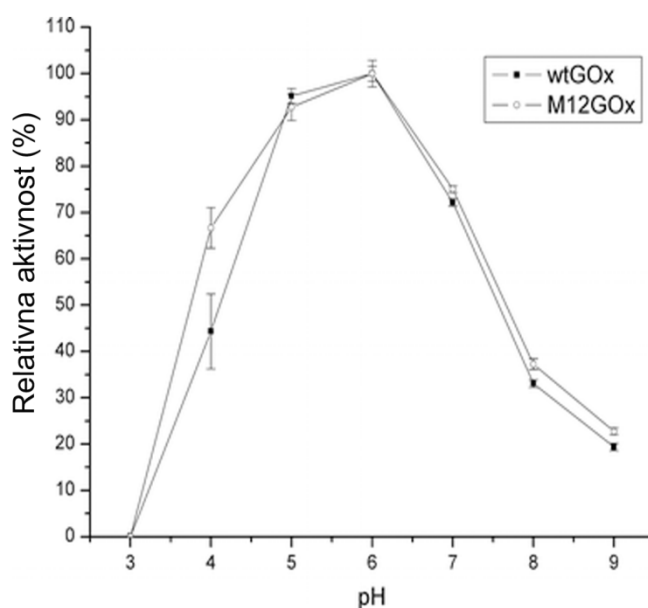
	<i>P. pastoris</i> (pH 5,5)		<i>P. pastoris</i> (pH 7,4)		<i>S. cerevisiae</i> (pH 5,5) ⁹	
	wt	M12	Wt	M12	wt	M12
K_m (mM)	28,3 ± 0,4	13,3 ± 0,5	23,2 ± 0,5	11,4 ± 0,2	22,0	18,1
k_{cat} (s ⁻¹)	189,4 ± 1,3	352,0 ± 4,1	130,2 ± 0,9	257,1 ± 1,4	54,8	150
k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	6,7 ± 0,1	26,4 ± 0,9	5,6 ± 0,1	22,5 ± 0,5	2,5	8,29

REZULTATI I DISKUSIJA

Na osnovu rezultata može se videti da divlji tip i M12 mutant GOx eksprimirani u *P. pastoris* KM71H pokazuju oko tri puta veće konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) nego isti enzimi eksprimirani u *S. cerevisiae* InvSc1. Mutant M12 je i dalje značajno poboljššan u odnosu na divlji tip i ima oko četiri puta veću konstantu specifičnosti, čime pokazuje mnogo veći potencijal za primenu u biokatalizi nego što je prethodno pokazano⁹.

5.1.2.2. Određivanje pH optimuma

pH optimum je određivan u natrijum-citrat-fosfatnom puferu u opsegu 3-9. Na osnovu rezultata može se zaključiti da se pH optimum M12 mutanta ne razlikuje od pH optimuma divljeg tipa GOx (Slika 12).



Slika 12. Aktivnost divljeg tipa i M12 mutanta GOx proizvedenih u *P. pastoris* KM71H na različitim pH vrednostima

REZULTATI I DISKUSIJA

5.1.2.3. Određivanje šećerne specifičnosti

Povećana aktivnost je bitna za veću izlaznu snagu biogorivnih ćelija i veću osetljivost biosenzora. Za neke primene kao što je praćenje glukoze u krvi, važno je imati visoku specifičnost prema glukozi u odnosu na druge šećere. Da bi ispitali specifičnost M12 mutanta GOx merena je njegova aktivnost sa drugim šećerima kao što su maltoza, manoza i galaktoza (**Tabela 3**).

Tabela 3. Relativna aktivnost GOx sa različitim šećerima u poređenju sa glukozom (100%) u PBS puferu pH 7,4

5 mM Gal/Glc		5 mM Man/Glc		5 mM Mal/Glc	
wt GOx	M12 GOx	wt GOx	M12 GOx	wt GOx	M12 GOx
0,18 ± 0,03 %	0,52 ± 0,06 %	0,59 ± 0,08 %	0,52 ± 0,05 %	ND	ND
250 mM Gal/Glc		250 mM Man/Glc		250 mM Mal/Glc	
wt GOx	M12 GOx	wt GOx	M12 GOx	wt GOx	M12 GOx
10 ± 1 %	29 ± 2 %	3,8 ± 0,5 %	6,2 ± 0,4 %	ND	ND

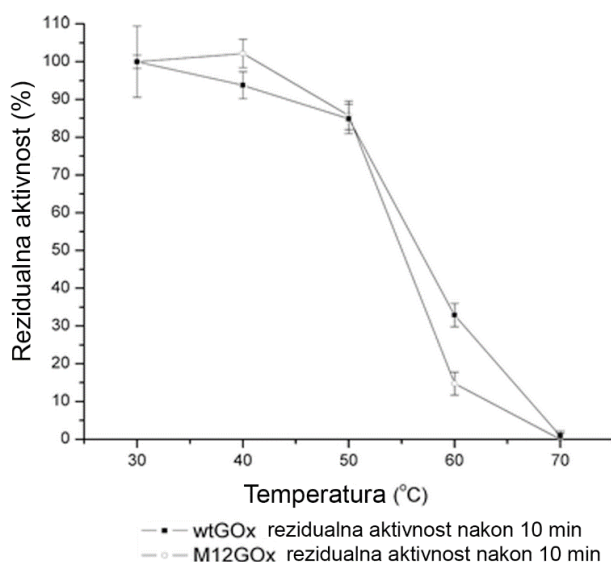
ND Not detected

Mutant M12 je zadržao visoku specifičnost ka glukozi ali ima veću aktivnost sa galaktozom, kao i B11 mutant GOx koji je korišćen kao roditeljski gen u eksperimentu dirigovane evolucije¹⁹⁹. Aktivnost sa manozom je slična aktivnosti divljeg tipa GOx sa manjom koncentracijom šećera (5 mM), dok pri većim koncentracijama manoze (250 mM) M12 mutant ima veću aktivnost u poređenju sa divljim tipom GOx. Ova razlika u aktivnosti može biti pogodna za primenu u biogorivnim ćelijama zbog povećane izlazne snage u prisustvu različitih šećera koji nisu glukoza. U prisustvu maltoze, ni divlji tip ni M12 mutant GOx nisu pokazali aktivnost. Pošto je maltoza jedna od najčešćih ometajućih supstanci u glukoznim biosenzorima, visoka specifičnost M12

mutanta GOx prema glukozi u prisustvu manoze je veoma važna za potencijalnu primenu u takvim uređajima.

5.1.2.4. Određivanje termostabilnosti

Za primenu GOx na elektrodama jedan od najvažnijih parametara posle aktivnosti predstavlja termostabilnost. Veoma često u eksperimentima dirigovane evolucije povećanje enzimske aktivnosti prati smanjenje temperaturne stabilnosti. Da bi proverili da li je termostabilnost M12 mutanta kompromitovana, izmerena je rezidualna aktivnost divljeg tipa i M12 mutanta GOx nakon inkubiranja 10 minuta na različitim temperaturama (**Slika 13**).



Slika 13. Rezidualna aktivnost GOx nakon 10 minuta inkubacije na različitim temperaturama u 0,1 M natrijum-acetatnom puferu pH 5,5

Iz rezultata se vidi da je rezidualna aktivnost na 60°C nakon 10 minuta za divlji tip GOx $32,9 \pm 3,0$ % a za M12 mutant $14,7 \pm 3,1$ %. Ovo smanjenje termostabilnosti M12 mutanta GOx nije toliko izraženo i ne toliko veliko kao povećanje aktivnosti.

REZULTATI I DISKUSIJA

5.1.2.5. Određivanje aktivnosti sa redoks medijatorom *N,N*-dimetil-nitrozoanilinom

U biosenzorima i biogorivnim ćelijama elektroni se sa redukovanoj GOx enzima transferuju na elektrodu ili redoks medijator umesto na kiseonik, stoga je sposobnost GOx da redukuje redoks medijatore umesto kiseonika od kritične važnosti. Sa tim ciljem, upoređene su aktivnosti divljeg tipa i M12 mutanta GOx koristeći *N,N*-dimetil-nitrozoanilin kao redoks medijator, zbog njegove česte upotrebe u tračicama za merenje glukoze u toku praćenja dijabetesa¹⁹⁸.

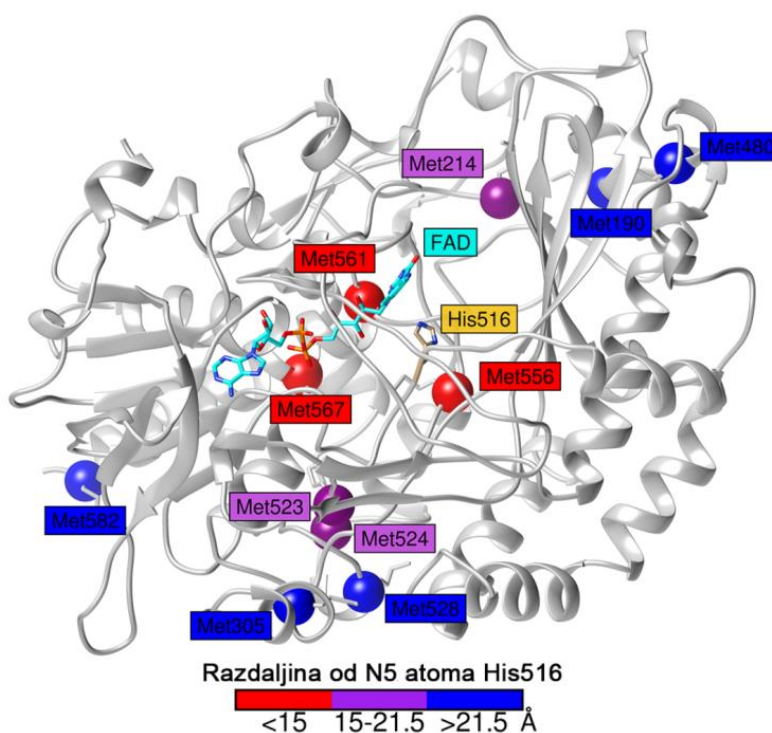
Tabela 4. Relativna aktivnost M12 mutanta u odnosu na divlji tip GOx sa *N,N*-dimetil-nitrozoanilinom kao elektron akceptorom u 0,2 M kalijum-fosfatnom puferu pH 7,0

Koncentracija glukoze	5 mM Glc		200 mM Glc	
	wt GOx	M12 GOx	wt GOx	M12 GOx
Varijanta enzima				
Relativna aktivnost ($\Delta O.D_{.700}/\text{min} \times \text{mg}$)	0,48 ± 0,05	1,50 ± 0,06	3,29 ± 0,08	5,87 ± 0,12

Mutant M12 je pokazao oko tri puta veću aktivnost u poređenju sa divljim tipom GOx pri 5 mM koncentraciji glukoze i dva puta veću aktivnost pri 200 mM koncentraciji glukoze (Tabela 4). Ovi rezultati su potvrdili da M12 mutant GOx ima mnogo veći potencijal od divljeg tipa enzima za upotrebu u tračicama za određivanje glukoze i na elektrodama.

5.2. Povećanje oksidativne stabilnosti glukoza-oksidge

Oksidacija enzima, praćena inaktivacijom ili denaturacijom, predstavlja jedan od glavnih razloga njihove nestabilnosti. Posebno osetljivi na oksidaciju su metioninski aminokiselinski ostaci koji se konvertuju u metionin sulfoksid čak i pod blagim uslovima. Glukoza-oksidge poseduje 11 metioninskih ostataka po subjedinici, od kojih se 5 nalazi na površini proteina (Met190, Met305, Met480, Met528, Met582), 3 u unutrašnjosti proteina ali udaljeni od aktivnog mesta (Met214, Met523, Met524), i 3 koja se nalaze u blizini aktivnog mesta (Met556, Met561, Met567) (Slika 14).



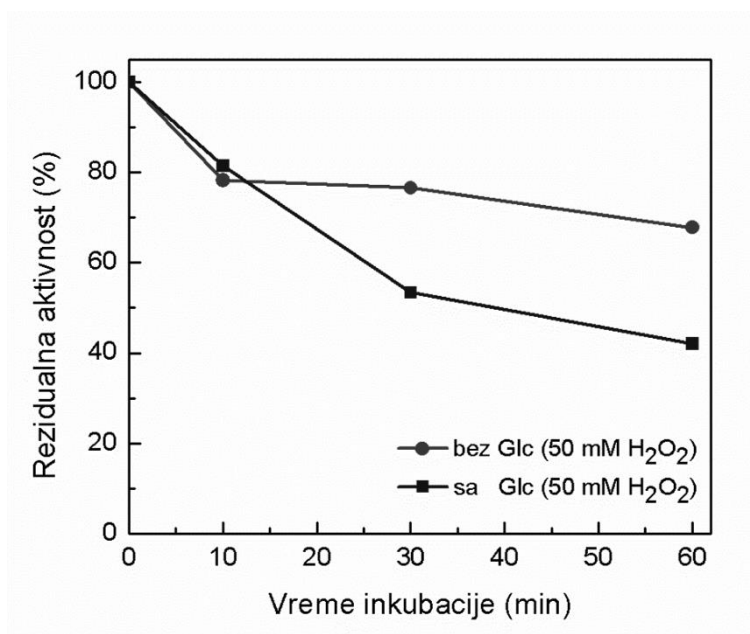
Slika 14. Pozicije metioninskih aminokiselinskih ostataka prikazanih na trodimenzionalnoj strukturi glukoza-oksidge (PDB kod 1CF3). Metioninski ostaci su obojeni u zavisnosti od udaljenosti od N5 atoma His516: crveno <15 Å, ljubičasto 15 – 21,5 Å, i plavo > 21,5 Å udaljenosti. Slika je kreirana korišćenjem programa Swiss-PdbViewer verzija 4.1.0 (Švajcarska)

Aktivna mesta GOx su u dubokoj unutrašnjosti proteina, i svako je orijentisano na suprotnu stranu od dodirne površine dve subjedinice. Da bi utvrdili uticaj pozicije metioninskog aminokiselinskog ostatka na oksidativnu stabilnost GOx, svih 11 metionina je razmatrano za mesto specifičnu mutagenezu.

5.2.1. Razvoj metode za pronalaženje oksidativno stabilnijih mutanata glukoza-oksidade

Za pretraživanje biblioteka mutanata razvijene su različite metode, ali se među njima posebno istakla metoda ekspresije na površini ćelija kvasca, zbog brze i jeftine selekcije eukariotskih proteina²⁰⁰. Prednost ovog sistema predstavlja povezanost genotipa i fenotipa eksprimiranog proteina. S obzirom da fuzionisani proteini mogu da utiču na enzimsku aktivnost, pokazano je da je odnos kinetičkih parametra divljeg tipa i B11 mutanta GOx u rastvoru, sačuvan i kada su oni eksprimirani na površini ćelija kvasca¹⁹⁶. Pošto ćelije kvasca imobilizuju enzim na površini, ovaj sistem omogućava uklanjanje egzogenog vodonik-peroksida korišćenog za destabilizaciju i oksidaciju GOx što je neophodno da bi se izmerila rezidualna aktivnost enzima.

Da bi testirali ovaj sistem za pretraživanje oksidativno stabilnih mutanata, ćelije kvasca koje na svojoj površini imaju eksprimiran divlji tip GOx su inkubirane u 50 mM vodonik-peroksidu, i u određenim vremenskim intervalima merena je rezidualna aktivnost enzima (**Slika 15**).



Slika 15. Inaktivacija divljeg tipa GOx eksprimirane na površini ćelija kvasca *S.cerevisiae* EBY100 koristeći 50 mM vodonik-peroksid: (●) bez prisustva glukoze, (■) u prisustvu 100 mM glukoze

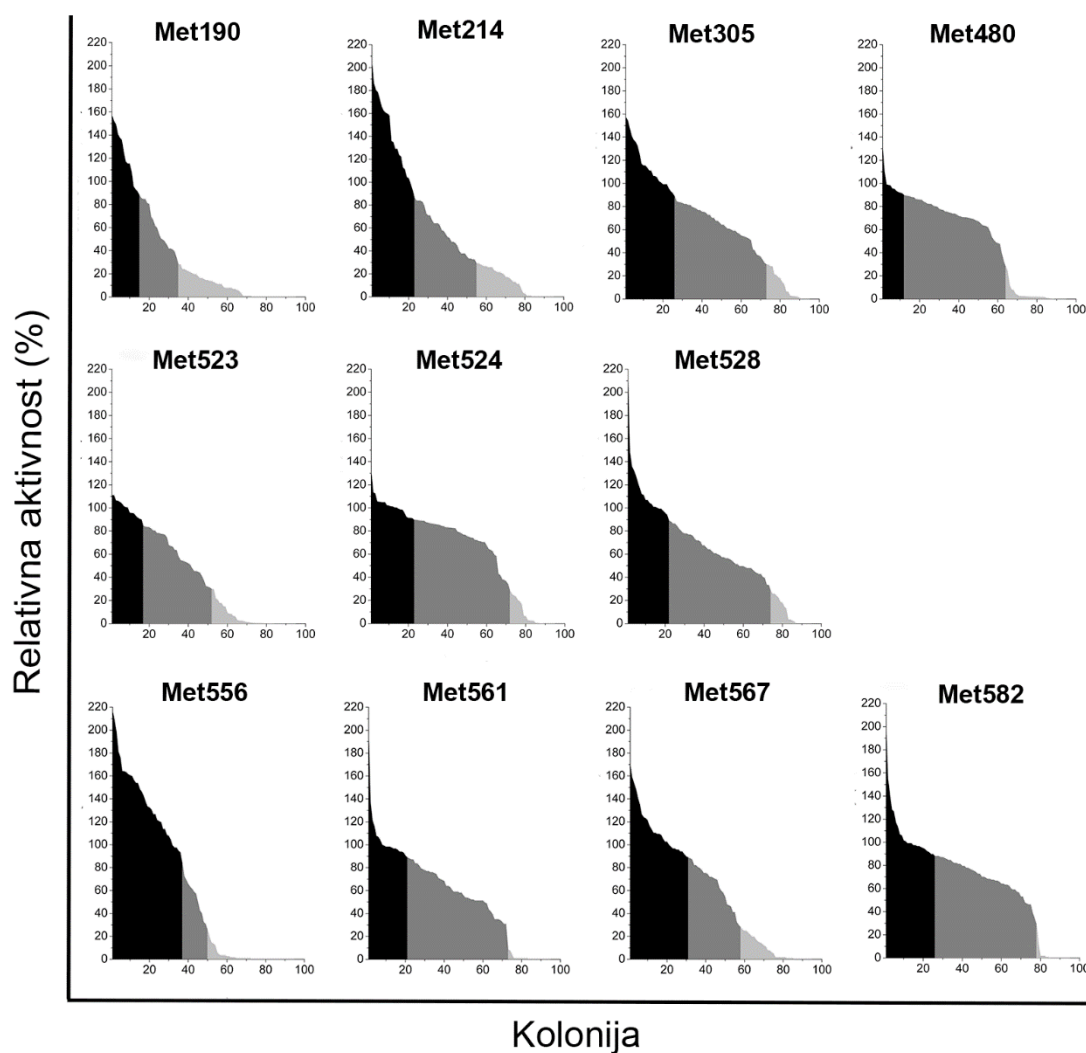
Merenjem rezidualne aktivnosti uočeno je da bez prisustva glukoze ne dolazi do značajne inaktivacije GOx kada je tretirana 50 mM vodonik-peroksidom u periodu od 60 minuta. Dodavanjem glukoze u reakcionu smešu sa vodonik-peroksidom GOx aktivnost se znatno smanjuje, što se poklapa sa prethodno objavljenim rezultatima da se oksidativna inaktivacija enzima dešava nakon reduktivne polu-reakcije tj kada se FAD nalazi u redukovanoj formi⁶³.

5.2.2. Pretraživanje saturacionih biblioteka glukoza-oksidade

Nakon uspostavljanja metode za pretraživanje oksidativno stabilnijih mutanta GOx, napravljeno je 11 saturacionih biblioteka na pozicijama 11 metioninskih aminokiselinskih ostataka u kvascu *S. cerevisiae* EBY100. Analiza saturacionih biblioteka je rađena u mikrotitar pločama, inokulacijom pojedinačnih kolonija kvasca iz jedne biblioteke u bunare mikrotitar ploče sa 96

REZULTATI I DISKUSIJA

bunara, i tako za svih jedanaest biblioteka. Nakon ekspresije GOx na površini kvasca, izmerena je aktivnost enzima koristeći ABTS esej, i kolonije koje su pokazivale minimum 30% aktivnosti divljeg tipa GOx su izabrane za merenje oksidativne stabilnosti (Slika 16).



Slika 16. Analiza jedanaest saturacionih biblioteka na jedanaest metioninskih pozicija. Kolonije su sortirane u opadajućem maniru zasnovanom na relativnoj aktivnosti u odnosu na aktivnost divljeg tipa GOx (100%), i dodeljene jednoj od tri grupe: aktivnost $\geq 90\%$ (crno), $90\% < \text{aktivnost} \geq 30\%$ (tamno siva), i aktivnost $< 30\%$ (svetlo siva) u odnosu na divlji tip GOx

REZULTATI I DISKUSIJA

Nakon selekcije, kolonije su tretirane 50 mM vodonik-peroksidom u prisustvu 100 mM glukoze jedan sat. Izmerene su rezidualne aktivnosti enzima, i kolonije koje su imale najbolji odnos aktivnosti i oksidativne stabilnosti su sekvencirane. Metioninski ostaci koji se nalaze na površini enzima kao i oni koji se nalaze u unutrašnjosti udaljeni od aktivnog mesta, imaju ili manji uticaj na oksidativnu stabilnost ili ako su stabilniji imaju smanjenu aktivnost (obeleženi kosim slovima u **Tabela 5**). Izuzetak predstavlja Met214 koji je pokazao značajno veću aktivnost i blago poboljšanu oksidativnu stabilnost (**Tabela 6**).

Tabela 5. Rezidualne aktivnosti mutanata GOx otkrivenih u bibliotekama na metioninskim pozicijama udaljenim od aktivnog mesta. Aktivnost enzima je merena pre (ne-oksidovana) i nakon (oksidovana) tretmana vodonik-peroksidom. Rezidualna aktivnost predstavlja odnos oksidovane i ne-oksidovane aktivnosti.

GOx varijanta			Aktivnost		
Met pozicija	Oznaka biblioteke	Mutacija	Ne-oksidovana (U mL ⁻¹)	Oksidovana (U mL ⁻¹)	Rezidualna (%)
WT	–	–	0.117 ± 0.020	0.053 ± 0.008	46.3 ± 6.8
190	C5	M190I	0.074 ± 0.006	0.048 ± 0.006	64.8 ± 8.1
305	B3	M305C	0.127 ± 0.004	0.061 ± 0.012	48.2 ± 9.4
	F10	M305R	0.132 ± 0.002	0.063 ± 0.008	47.8 ± 6.1
480	D2	M480L	0.139 ± 0.005	0.059 ± 0.022	42.6 ± 15.8
524	H6	M524C	0.073 ± 0.001	0.040 ± 0.002	55.3 ± 2.7
528	C10	M528A	0.081 ± 0.013	0.053 ± 0.004	65.4 ± 4.9
	E11	M528I	0.102 ± 0.020	0.046 ± 0.003	45.1 ± 2.9
582	C6	M582A	0.081 ± 0.006	0.052 ± 0.001	64.2 ± 1.2
	F6	M582T	0.094 ± 0.006	0.048 ± 0.001	51.1 ± 1.1

REZULTATI I DISKUSIJA

Mutacije na metioninskim ostacima koji se nalaze u blizini aktivnog mesta najviše doprinose oksidativnoj stabilnosti GOx, uz zadržavanje sličnog nivoa aktivnosti kao divlji tip GOx (**Tabela 6**). Ovi rezultati su u skladu sa observacijom da do inaktivacije GOx dolazi kada je FAD u redukovanom stanju, što implicira da su najpodložniji oksidaciji metioninski ostaci koji se nalaze u njegovoj blizini.

Tabela 6. Rezidualne aktivnosti mutanata GOx otkrivenih u saturacionim bibliotekama na metioninskim pozicijama u blizini aktivnog mesta. Aktivnost enzima je merena pre (ne-oksidovana) i nakon (oksidovana) tretmana vodonik-peroksidom. Rezidualna aktivnost predstavlja odnos oksidovane i ne-oksidovane aktivnosti

GOx varijanta			Aktivnost		
Met pozicija	Oznaka biblioteke	Mutacija	Ne-oksidovana (U mL ⁻¹)	Oksidovana (U mL ⁻¹)	Rezidualna (%)
WT	–	–	0.117 ± 0.020	0.053 ± 0.008	46.3 ± 6.8
214	A3, B7, E4 ^a	M214T	0.166 ± 0.011	0.091 ± 0.007	54.8 ± 4.2
	D10	M214C	0.185 ± 0.011	0.075 ± 0.005	40.5 ± 2.7
556	D4	M556L	0.126 ± 0.005	0.075 ± 0.005	59.4 ± 4.0
	A5	M556T	0.110 ± 0.001	0.054 ± 0.002	49.0 ± 1.8
	B8, C2 ^b	M556I	0.153 ± 0.007	0.074 ± 0.005	48.3 ± 3.2
561	F4	M561A	0.070 ± 0.007	0.051 ± 0.005	72.8 ± 7.1
	G1	M561T	0.081 ± 0.008	0.057 ± 0.006	70.4 ± 7.4
	B2, F7, H4 ^a	M561S	0.101 ± 0.007	0.071 ± 0.002	70.2 ± 2.0
	B9, E12, H11 ^a	M561G	0.117 ± 0.007	0.078 ± 0.004	66.7 ± 3.4
567	E6, E12 ^b	M567F	0.066 ± 0.004	0.043 ± 0.003	65.1 ± 4.5
	C3	M567T	0.075 ± 0.004	0.045 ± 0.007	59.5 ± 9.3

^a Prosečna aktivnost tri uzorka koji imaju istu mutaciju

^b Prosečna aktivnost dva uzorka koji imaju istu mutaciju

U inženjeringu oksidativno stabilnih enzima, uobičajen pristup je izmena metioninskih osatataka malim, ne-oksidabilnim, hidrofobnim aminokiselinskim ostacima kao što su alanin⁶⁰, leucin⁶¹ ili izoleucin⁵⁷. Međutim, pokazano je i da mutacije u serin mogu povećati oksidativnu stabilnost⁵⁶. Koristeći saturacionu mutagenezu za pretraživanje naših biblioteka, izbegnuto je ograničenje na samo jedan tip mutacija. Mutanti koji su pokazali najbolje rezultate, imali su širok spektar mutacija, uključujući i neke koje nisu do sada objavljene (**Tabela 6**).

5.2.3. *Analiziranje kombinovanih mutanata glukoza-oksidade*

Da bi dodatno poboljšali oksidativnu stabilnost, testirali smo aditivni efekat prethodno uočenih mutacija. U odnosu na frekvenciju određene mutacije u biblioteci i povećane rezidualne aktivnosti, četiri najbolja jednostruka mutanta (obeleženi tamno crnom bojom u **Tabela 6**) iskorišćena su za pravljenje kombinovanih mutanata u *S. cerevisiae* EBY100, uključujući dvostruke i trostruke mutacije. Kombinovani mutanti su tretirani na identičan način kao i jednostruki mutanti GOx eksprimirani u *S. cerevisiae* EBY100, i izmerena im je rezidualna aktivnost (**Tabela 7**). Dvostruki mutanti M214T/M561S i M561S/M556L pokazuju veću oksidativnu stabilnost u odnosu na divlji tip GOx, ali je ona manja od rezidualne aktivnosti roditeljskog M561S. Dvostruki mutant M214T/M556L ima skoro dvostruko veću aktivnost od divljeg tipa GOx, ali je njegova oksidativna stabilnost slična divljem tipu GOx. Svi ostali dvostruki mutanti su pokazali nižu oksidativnu stabilnost u odnosu na divlji tip. Trostruki mutanti imaju nižu aktivnost u poređenju sa divljim tipom GOx (jedan od mutanata uopšte ne pokazuje aktivnost), i oksidativnu stabilnost sličnu dvostrukim mutantima.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 7. Rezidualne aktivnosti kombinovanih GOx mutanata. Aktivnost enzima je merena pre (ne-oksidovana) i nakon (oksidovana) tretmana vodonik-peroksidom. Rezidualna aktivnost predstavlja odnos oksidovane i ne-oksidovane aktivnosti

GOx varijanta	Aktivnost		
	Ne-oksidovana (U mL ⁻¹)	Oksidovana (U mL ⁻¹)	Rezidualna (%)
WT	0.488±0.005	0.199±0.023	40.8±4.7
M214T/M556L	0.747±0.030	0.292±0.034	39.1±4.6
M214T/M561S	0.373±0.026	0.218±0.007	58.6±1.9
M214T/M567F	0.188±0.010	0.055±0.001	29.1±0.7
M561S/M556L	0.570±0.018	0.371±0.035	65.0±6.2
M561S/M567F	0.574±0.010	0.265±0.019	46.2±3.2
M567F/M556L	0.448±0.025	0.142±0.045	31.6±10.1
M214T/M561S/M556L	0.214±0.024	0.110±0.003	51.5±1.6
M214T/M561S/M567F	ND	ND	ND
M214T/M556L/M567F	0.229±0.017	0.155±0.017	67.7±7.3
M561S/M556L/M567F	0.439±0.092	0.263±0.038	59.9±8.7

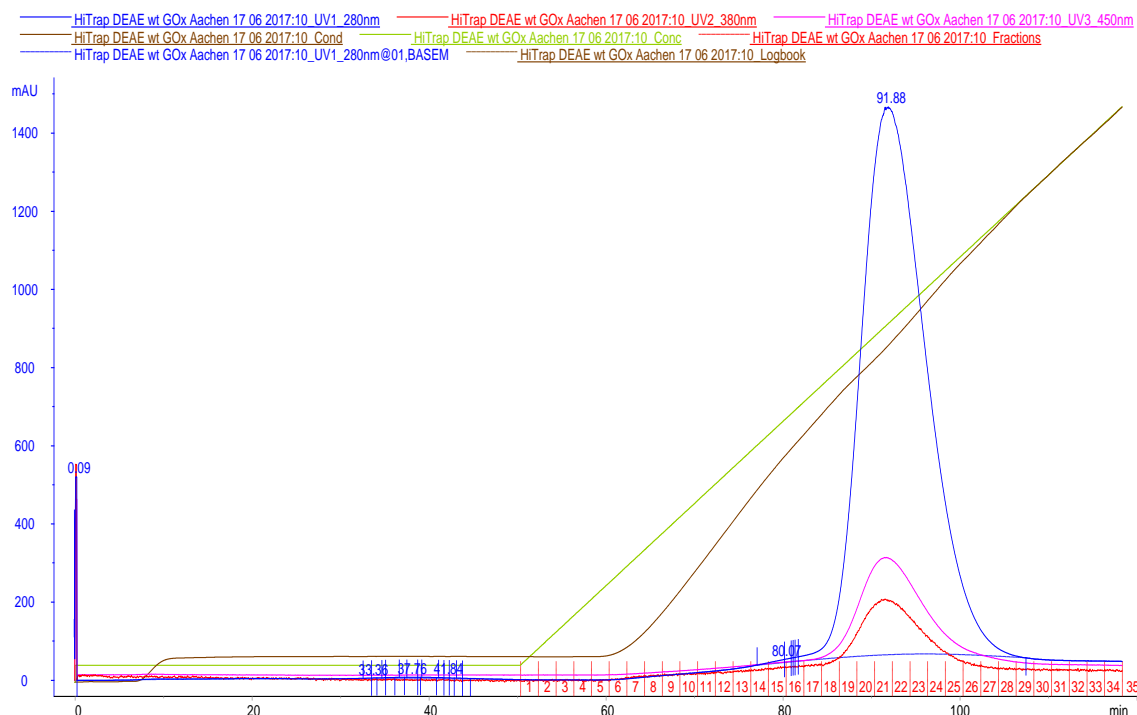
ND nije detektovana

5.2.4. Ekspresija i prečišćavanje mutanata glukoza-oksidaze iz *P. pastoris*

Za detaljniju kinetičku karakterizaciju izabrana su dva jednostruka i dva dvostruka mutanta (M214T, M561S, M214T/M556L i M561S/M556L), koji pokazuju najveću aktivnost i oksidativnu stabilnost u poređenju sa divljim tipom GOx. Oni su klonirani u pPICZαA vektor za ekstracelularnu ekspresiju proteina u *P. pastoris* KM71H. Nakon 4 dana fermentacije u 0,5% metanolu,

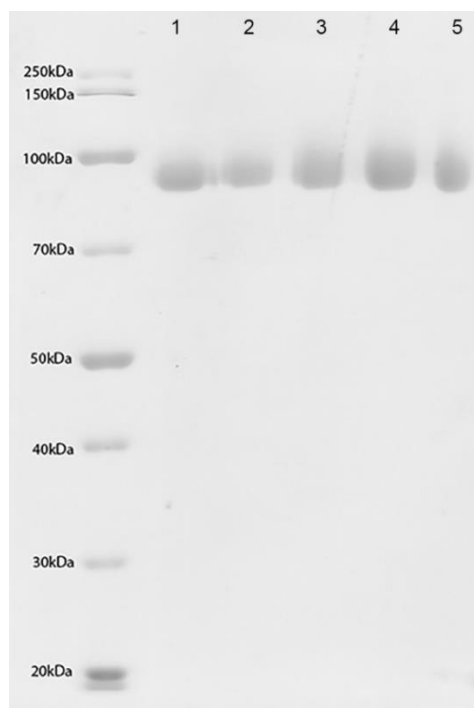
REZULTATI I DISKUSIJA

GOx varijante su prečišćene koristeći ultra-filtracionu membranu i DEAE jonoizmenjivačku hromatografiju (Slika 17).



Slika 17. Hromatogram DEAE jonoizmenjivačke hromatografije divljeg tipa GOx. GOx je eluirana linearnim gradijentom od 10 do 500 mM natrijum-fosfatnog pufera pH 6,0

Frakcije pod pikom na 280 nm su testirane na GOx aktivnost, i pozitivne frakcije su skupljene i analizirane SDS elektroforezom. Na elektroforezi se uočava jedna traka prečišćenog GOx proteina za svaku eksprimiranu varijantu. U prvom delu ove disertacije pokazano je da je molekulska masa rekombinantne GOx eksprimirane u *P. pastoris* veća od mase komercijalnog enzima, zbog povećane glikozilacije u kvascima što se može uočiti na elektroforezi.



Slika 18. SDS elektroforeza prečišćenih GOx varijanti: 1) divlji tip GOx; 2) M214T-GOx; 3) M561S-GOx; 4) M214T/M556L-GOx; 5) M561S/M556L-GOx

5.2.5. Karakterizacija mutanata glukoza-oksidge

Prečišćene GOx varijante su korišćene za određivanje kinetičkih parametara, oksidativne stabilnosti, aktivnosti sa redoks medijatorom ferocen-metanolom, i elektrohemijske karakterizacije cikličnom voltametrijom.

5.2.5.1. Kinetička karakterizacija

Kinetički parametri (K_m i k_{cat}) mutanata M214T, M561S, M214T/M556L i M561S/M556L GOx su određivani na pH 5,5. Jednostruki mutant M214T i dvostruki mutant M214T/M556L imaju oko 2,8 i 3,0 puta povećanje u katalitičkoj konstanti, dok je konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_M) povećana oko 3,0 i 2,2 puta u odnosu na divlji tip GOx (Tabela 8).

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 8. Kinetički parametri prečišćenih GOx oksidativnih mutanata na pH 5,5

GOx varijanta	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
WT	28.9±0.4	190.3±1.5	6.6±0.1
M214T	26.6±0.9	526.5±6.3	19.8±0.2
M561S	45.0±0.8	238.5±2.2	5.3±0.1
M214T/M556L	39.7±0.7	580.8±5.7	14.6±0.1
M561S/M556L	70.3±1.8	477.1±6.7	6.8±0.1

Dvostruki mutant M561S/M556L pokazuje 2,5 puta povećanje u katalitičkoj konstanti, ali je vezivanje glukoze veoma kompromitovano (što se ogleda u povećanoj K_m vrednosti). Najstabilniji oksidativni mutant M561S ima blago povećanu katalitičku konstantu i konstantu specifičnosti ne značajno nižu od divljeg tipa GOx. Celokupna kinetika mutanta M214T je uporediva sa višestrukim mutantom GOx koji je dobijen u eksperimentu dirigovane evolucije⁸, što ga čini veoma dobrim kandidatom za primenu u industriji.

5.2.5.2. Oksidativna stabilnost

Da bi potvrdili rezultate oksidativne stabilnosti dobijene na površini ćelija kvasca, prečišćene varijante GOx su imobilizovane pomoću glutaraldehida na aminovani makroporozni poli-glicidil-metakrilat²⁰¹. Enzimi su očuvali aktivnost nakon imobilizacije, stoga je moguće odrediti oksidativnu stabilnost. Imobilizovana GOx je tretirana pod istim uslovima, 50 mM vodonik-peroksid i 100 mM glukoza, kao i ćelije *S. cerevisiae* koje eksprimiraju GOx. Rezidualne aktivnosti se veoma dobro slažu sa rezultatima dobijenim na kvascima (Tabela 9).

REZULTATI I DISKUSIJA

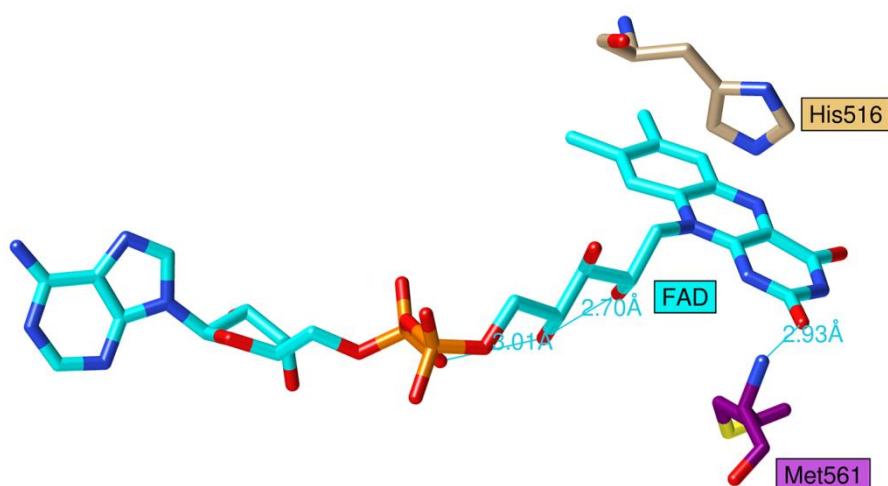
Tabela 9. Rezidualne aktivnosti nakon tretiranja 50 mM vodonik-peroksidom u prisustvu 100 mM glukoze GOx eksprimirane na površini ćelija kvasca i imobilizovanih na makroporoznom polimeru. Poluživot GOx varijanti je izračunat iz rezidualnih aktivnosti imobilizovanog enzima

GOx varijanta	Rezidualna aktivnost (%)		$t_{1/2}$ (min)
	Kvasci	Imobilizovani	
WT	46.3 ± 6.8	43.7 ± 5.5	50
M214T	54.2 ± 7.8	57.5 ± 4.2	75
M561S	70.3 ± 10.9	71.3 ± 8.5	123
M214T/M556L	39.1 ± 4.6	42.8 ± 0.6	49
M561S/M556L	65.0 ± 6.2	63.8 ± 6.8	92

Na osnovu dobijenih rezultata rezidualne aktivnosti, pokazano je da se kvasci koji eksprimiraju enzime na svojoj površini mogu koristiti za pretraživanje oksidativno stabilnih mutanata, naročito za enzime čije određivanje aktivnosti se zasniva na endogeno proizvedenom vodonik-peroksidu. Ova postavka omogućava pogodno uklanjanje egzogenog vodonik-peroksida kroz taloženje ćelija, i bez dodavanja katalaze. Pored toga, ova metoda omogućava i direktnu vezu između genotipa i fenotipa eksprimiranog enzima.

Obe metode su pokazale da je oksidativno najstabilniji jednostruki mutant M561S sa 2,5 puta povećanom stabilnosti u odnosu na divlji tip enzima, i da kombinovanjem različitih pozicija ne dolazi do aditivnog efekta u stabilnosti. Klepe je u svom istraživanju pokazao da kada se GOx tretira vodonik-peroksidom u prisustvu glukoze dolazi do pojave 2 metioninska ostatka više koji su oksidovani do metionin-sulfoksida (9 oksidovanih metioninskih ostataka) na nivou dimernog proteina, nego bez prisustva glukoze (7 oksidovanih metioninskih ostataka)⁶³. Pretpostavka je da je upravo M561 taj

metionin koji se oksiduje kada se FAD nalazi u redukovanoj formi, zato što gradi vodonične veze sa oksidovanim FAD molekulom (Slika 19) i promena mikrostrukture u blizini aktivnog mesta u toku GOx reakcije ga čini lako dostupnim za oksidaciju vodonik-peroksidom.



Slika 19. Šematski prikaz aktivnog mesta GOx sa prikazom vodonične veze između M561 i oksidovanog FAD molekula. Slika je kreirana korišćenjem programa Swiss-PdbViewer verzija 4.1.0 (Švajcarska)

5.2.5.3. Aktivnost mutanata glukoza-oksidade sa redoks medijatorom ferocen-metanolom

U prvom koraku merenja aktivnosti GOx sa ferocen-metanolom je njegova oksidacija lakazom iz *Trametes versicolor*. GOx redukuje oksidovani ferocen nakon konvertovanja glukoze do glukono-laktone. Na pH 8 ferocen-metanol je u kompeticiji sa prirodnim supstratom, molekulskim kiseonikom³⁶. U **Tabela 10** se mogu videti aktivnosti divljeg tipa GOx i oksidativnih mutanata, sa dve različite koncentracije glukoze i ferocen-metanolom kao redoks medijatorom.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 10. Specifična aktivnost oksidativnih mutanta u odnosu na divlji tip GOx sa ferocen-metanolom kao elektron akceptorom u kalijum-fosfatnom puferu pH 8,0

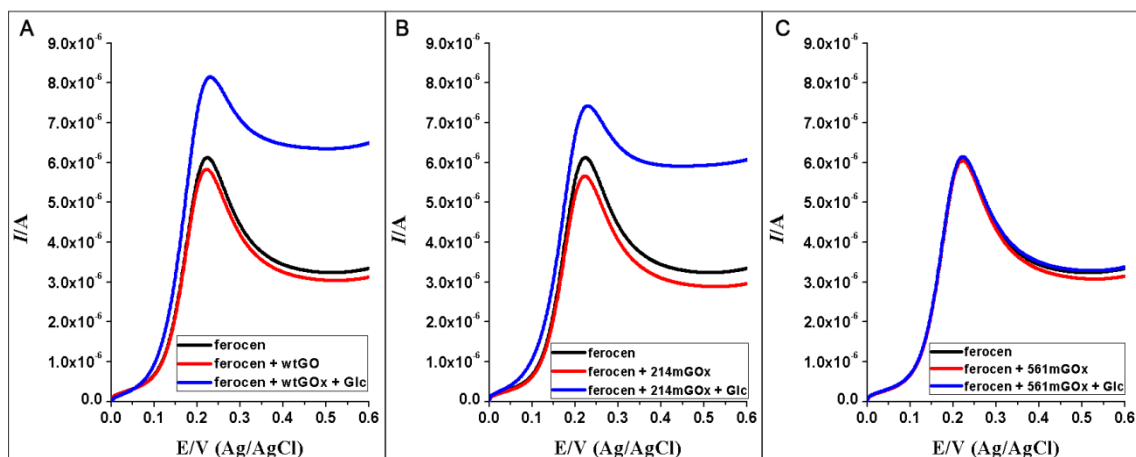
GOx varijanta	Aktivnost (IU/mg)	
	5 mM glukoza	333 mM glukoza
WT	7,1 ± 1,1	53,6 ± 0,9
M214T	22,9 ± 1,2	164,0 ± 6,2
M561S	3,7 ± 0,5	33,9 ± 1,4
M214T/M556L	18,4 ± 1,4	178,0 ± 5,9
M561S/M556L	2,8 ± 0,6	42,8 ± 1,1

Mutanti M214T i M214T/M556L pokazuju 3,0 i 3,3 puta povećanu aktivnost sa ferocen metanolom kao redoks medijatorom u odnosu na divlji tip GOx pri većoj koncentraciji glukoze; povećanje aktivnosti je veće sa nižom koncentracijom glukoze u slučaju M214T mutanta, što se može objasniti većom K_m vrednošću za mutant M214T/M556L (**Tabela 8**). Druga dva mutanta, M561S i M561S/M556L, pokazuju smanjenu aktivnosti sa ferocen-metanolom, naročito pri nižim koncentracijama glukoze što je opet posledica veoma visokih K_m vrednosti za ova dva mutanta (**Tabela 8**).

5.2.5.4. Poređenje aktivnosti jednostrukih oksidativnih mutanata sa ferocen metanolom primenom ciklične voltametrije

Da bismo testirali mogućnost korišćenja oksidativnih mutanata za konstrukciju biosenzora, snimili smo aktivnost jednostrukih oksidativnih mutanata u prisustvu ferocen-metanola kao redoks medijatora i fiziološke koncentracije glukoze (5 mM) metodom *linear sweep* voltametrije i uporedili ih sa divljim tipom GOx (**Slika 20**).

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 20. Linear sweep voltamogramski uzorci GOx (0,5 mg/mL) snimljeni u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 sa i bez 5 mM glukoze u prisustvu 0,5 mM ferocen-metanola; crna linija – 0,5 mM ferocen u puferu, crvena linija – uzorak GOx u puferu sa 0,5 mM ferocenom bez glukoze, plava linija – uzorak GOx u puferu sa 0,5 mM ferocenom i 5 mM glukozom. **A)** Uzorak divljeg tipa GOx; **B)** uzorak M214T mutanta GOx; **C)** uzorak M561S mutanta GOx

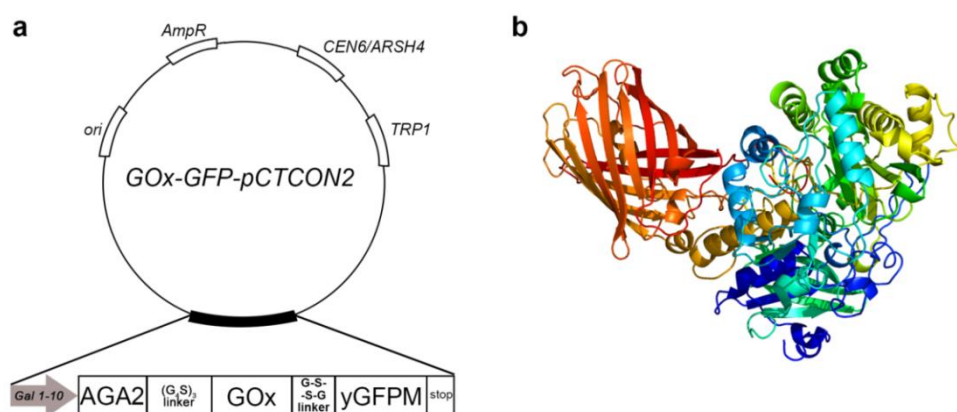
Na voltamogramskim graficima se uočava da divlji tip GOx kao i M214T mutant daju povećan signal struje u prisustvu glukoze kao supstrata u odnosu na uzorak bez glukoze, što pokazuje da dolazi do prenosa elektrona sa GOx preko ferocena do radne elektrode omogućavajući detekciju glukoze u rastvoru. Mutant M561S pokazuje jako malu promenu struje u uzorku sa i bez glukoze, što je najverovatnije posledica visoke K_m vrednosti za glukozu, čime je onemogućena detekcija niske koncentracije glukoze koja je korišćena u eksperimentu. Da bi pokazali da oksidativni mutanti imaju primenu u biosenzorima neophodno je dodatno ispitati njihovu aktivnost i stabilnost cikličnom voltametrijom pri konstantnoj koncentraciji glukoze.

5.3. Razvoj visoko efikasnih metoda pretraživanja biblioteka gena glukoza-oksidge

Pronalaženje mutanata GOx koji su aktivniji i stabilniji može biti veoma dugotrajno ukoliko ne postoje visoko efikasne metode pretraživanja. Do sada je razvijeno nekoliko metoda za pretraživanje biblioteka GOx baziranih na protočnoj citometriji^{9,10}, a najefikasnijom se do sada pokazala metoda obeležavanja fluorescentnim tiramidom ćelija kvasca koje eksprimiraju na svojoj površini GOx⁸. Ovom metodom je moguće kvantitativno odrediti ćelije sa enzimskom varijantom povećane aktivnosti, ali intenzitet fluorescencije zavisi i od količine proteina eksprimirane na površini ćelija, što može dovesti do lažne selekcije. Jedan od načina normalizacije intenziteta fluorescencije predstavlja obeležavanje c-myc epitopa fluorescentnim antitelima, za kvantifikaciju eksprimiranog proteina na površini kvasca⁸. Iako je vezivanje antitela veoma specifično, obeležavanje ćelija može biti veoma dugotrajno kao i nekonzistentno²⁰². Da bi uprostiti kvantifikaciju eksprimiranog enzima na površini kvasca, testirana je upotreba zelenog fluorescentnog proteina (yGFP) kao fuzionog partnera sa GOx gde bi intenzitet fluorescencije GFP bio mera količine eksprimiranog proteina.

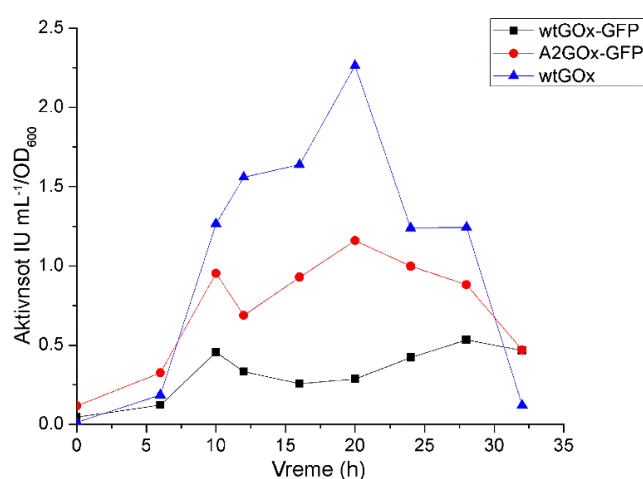
5.3.1. Ekspresija GOx-yGFP konstrukta

Kloniranjem yGFP u pCTCON2 vektor uklonjen je c-myc epitop (**Slika 21**), koji je korišćen za vezivanje primarnog i fluorescentnog sekundarnog antitela za kvantifikaciju proteina eksprimiranog na površini kvasca.



Slika 21. a) Šematski prikaz GOx-yGFPM-pCTCON2 plazmida. **b)** Trodimenzionalna struktura GOx-GFP fuzionog proteina modelovanog na Phyre2 serveru²⁰³

Kada se radi sa himerom enzima i GFP, jedan od najbitnijih aspekata je očuvanje funkcije oba proteina. Pokazano je da GFP može da smanji enzimsku aktivnost kada je eksprimiran u *E. coli*, ali ju je moguće povratiti nakon razdvajanja dva proteina¹⁸¹. Da bi ostvarili uspješano pretraživanje za poboljšanu specifičnu aktivnost GOx, prvo su testirane aktivnosti divljeg tipa i A2 mutanta⁸ GOx eksprimiranih kao himere sa yGFP na površini ćelija kvasca (Slika 22).

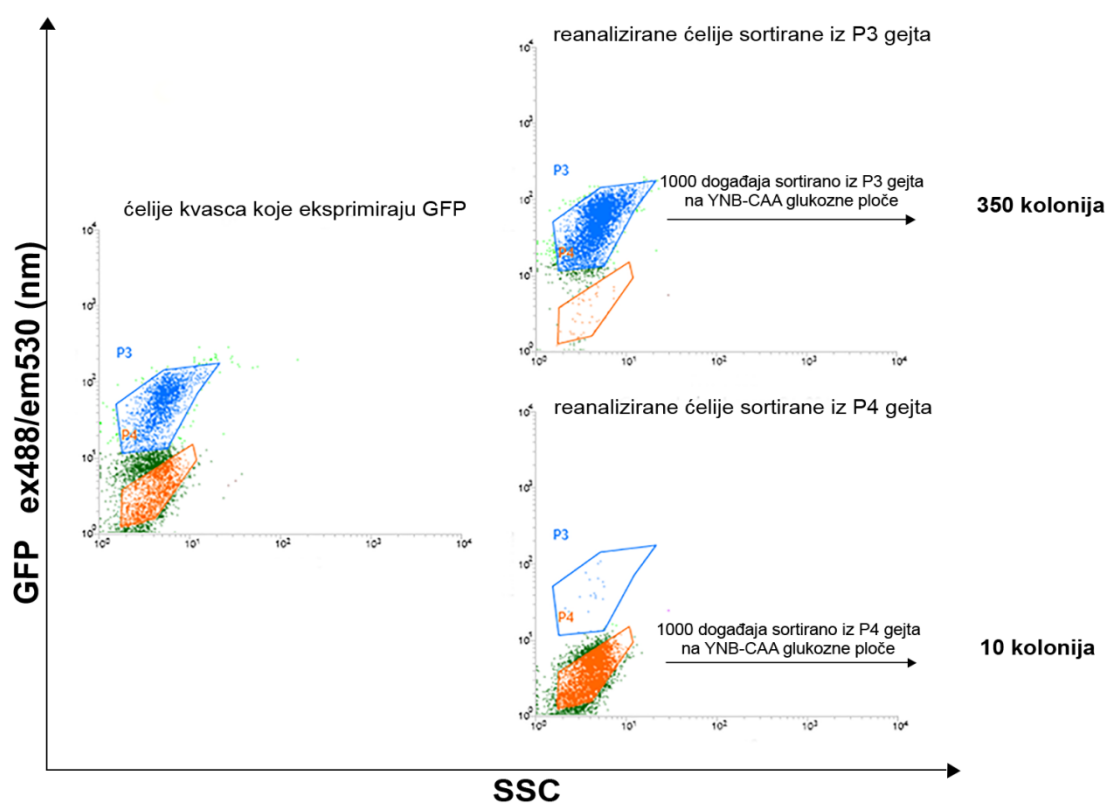


Slika 22. Aktivnosti divljeg tipa GOx sa i bez GFP i A2 mutanta sa GFP eksprimiranih na površini *S. cerevisiae* EBY100 u toku fermentacije

REZULTATI I DISKUSIJA

Upoređujući aktivnosti divljeg tipa i A2 mutanta GOx eksprimiranih kao himere sa yGFP na površini kvasca, vidi se da je održana razlika u enzimskoj aktivnosti između dve varijante, ali je aktivnost smanjena u odnosu na aktivnost istih varijanti eksprimiranih bez GFP. Ovi rezultati su konzistentni sa rezultatima dobijenim upoređivanjem aktivnosti divljeg tipa GOx i B11 mutanta eksprimiranih i prečišćenih kao himere sa Aga2 proteinom¹⁹⁶.

Tokom FACS analize ćelija kvasaca koje eksprimiraju na svojoj površini yGFP, uočene su dve populacije ćelija, jedna koja pokazuje fluorescenciju odgovarajuću yGFP i druga populacija ne-fluorescentnih ćelija (**Slika 23**).



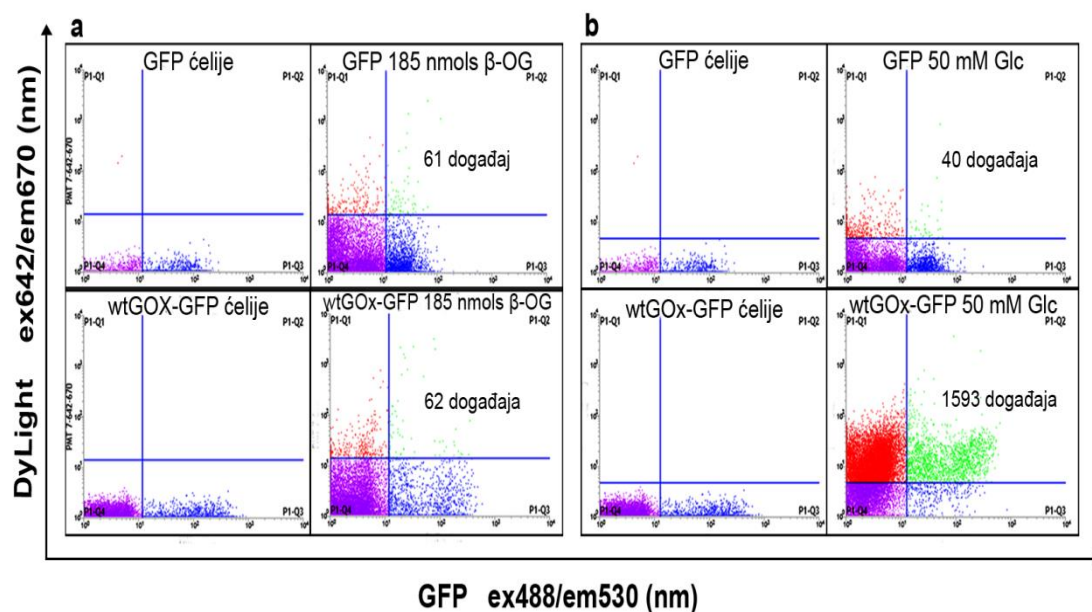
Slika 23. FACS analiza i stopa preživljavanja dve ćelijske populacije koje se pojavljuju tokom ekspresije yGFP na površini *S. cerevisie* EBY100; P3 gejt – sortirane fluorescentne ćelije, P4 gejt – sortirane ne-fluorescentne ćelije

U pokušaju da utvrdimo da li odsustvo fluorescencije u drugoj populaciji ćelija potiče od pogrešnog uvijanja GFP ili ćelijske smrti, obe populacije ćelija su sortirane u zasebne tube. Sortirane ćelije su reanalizirane da bi se potvrdila čistoća populacije, i iz svake populacije 1000 događaja je sortirano direktno na YNB-CAA glukoze agar ploče. Nakon dva dana rasta na selektivnom medijumu, uočeno je da je stepen preživljavanja oko 35% za fluorescentne ćelije i samo 1% za ne-fluorescentne ćelije, što upućuje da je nedostatak fluorescencije u drugoj populaciji posledica ćelijske smrti a ne loše uvijenog GFP.

5.3.2. Optimizacija eseja

U prethodno razvijenim sistemima za pretraživanje^{8,9} fluorescein-tiramid je korišćen kao reagens za obeležavanje aktivnih varijanti GOx, a pošto se njegova ekscitaciona i emisiona talasna dužina poklapaju sa yGFP, sintetisan je novi fluorescentni tiramid. Testirana su dva fluorescentna tiramida, CC-tiramid (3-karboksi-kumarin-tiramid, ekscitacija 355 nm, emisija 460 nm) i DyLight650-tiramid (ekscitacija 642 nm, emisija 670 nm), u reakciji sa ćelijama koje eksprimiraju wtGOx-yGFP konstrukt i glukozom kao supstratom. Na osnovu ovog inicijalnog testa, odlučeno je da se pretraživanje GOx biblioteka radi sa DyLight650-tiramidom, zbog većeg stepena osetljivosti i stabilnosti fluorescencije u odnosu na CC-tiramid. Koristeći DyLight650-tiramid, postavljene su enzimske reakcije u emulzijama sa yGFP i wtGOx-GFP eksprimiranim na površini ćelija kvasca. Jedan set reakcija je postavljen sa β -oktil-glukozidom/ β -glukozidazom⁸, a drugi sa glukozom⁹ (Slika 24).

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 24. FACS analiza (10^4 snimljenih događaja) yGFP i wtGOx-GFP u različitim esejima; dvostruki grafik yGFP fluorescencije koji predstavlja količinu GOx-GFP molekula na ćelijskoj površini prema DyLight 642 fluorescenciji koja odgovara GOx aktivnosti. **a)** yGFP i wtGOx-yGFP u reakciji sa β -oktil-glukozidom/ β -glukozidazom. **b)** yGFP i wtGOx-yGFP u reakciji sa glukozom

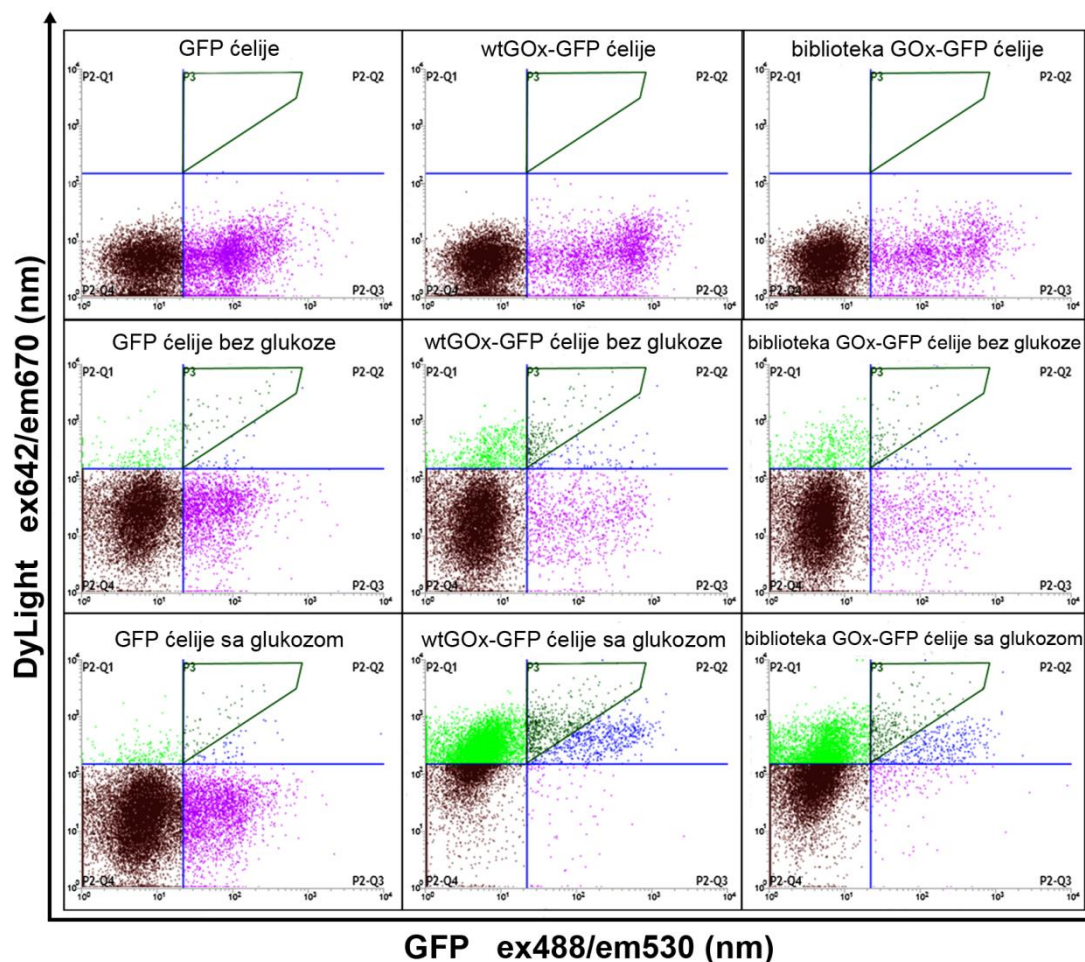
Analizirajući ćelije na FACS nije uočena razlika u broju obojenih ćelija između ćelija koje eksprimiraju yGFP (negativna kontrola) i wtGOx-GFP (pozitivna kontrola) kada je korišćen sistem β -oktil-glukozid/ β -glukozidaza (**Slika 24a**). Kada je glukoza korišćena kao supstrat moguće je jasno identifikovati ćelije sa aktivnom GOx u P1Q2 polju (**Slika 24b**). Jedan od razloga zašto je sistem β -oktil-glukozid/ β -glukozidaza ne-adekvatan za pretraživanje GOx fuzionisanog sa yGFP, može biti smanjena aktivnost GOx kada je eksprimiran kao fuzionisan protein sa yGFP. Stoga, količina dostavljene glukoze od β -oktil-glukozida⁸ koja je korišćena, nije optimalna za određivanje GOx-yGFP aktivnosti u odnosu na to kada se glukoza dodaje direktno⁹.

Prilikom analize ćelija u reakciji sa DyLight650-tiramidom, primećeno je da populacija mrtvih ne-zelene fluorescentnih ćelija biva fluorescentno obojena DyLight650-tiramidom zbog permeabilnosti ćelijske membrane koja omogućava unos boje u ćeliju. Ova zapažanja ukazuju da korišćenje yGFP kao markera nivoa ekspresije enzima takođe omogućava i isključivanje populacije mrtvih ćelija iz sortiranja, što povećava brzinu i efikasnost sortiranja.

5.3.3. Pretraživanje biblioteke GOx

Sa uspostavljenim parametrima za pretraživanje GOx, napravljena je biblioteka mutanata sa niskom frekvencijom mutacija koristeći enzim *Mutazyme II*. Ćelije kvasca koje ekspimiraju mutante GOx-yGFP su analizirane na FACS nakon enzimske reakcije u emulziji, a pored reakcije sa glukozom uključena je i reakcija bez glukoze kao negativna kontrola. Iz analize ćelija, označen je P3 gejt za sortiranje ćelija iz GOx biblioteke (**Slika 25**). Izabrani gejt izoluje GOx mutante sa najvećim odnosom crvene fluorescencije (koja je rezultat enzimske aktivnosti GOx) prema zelenoj fluorescenciji (koja odgovara količini ekspimiranog GOx-yGFP proteina). Sortiranje ćelija iz ovog gejta bi trebalo da dovede do selekcije najaktivnijih mutanata GOx iz biblioteke.

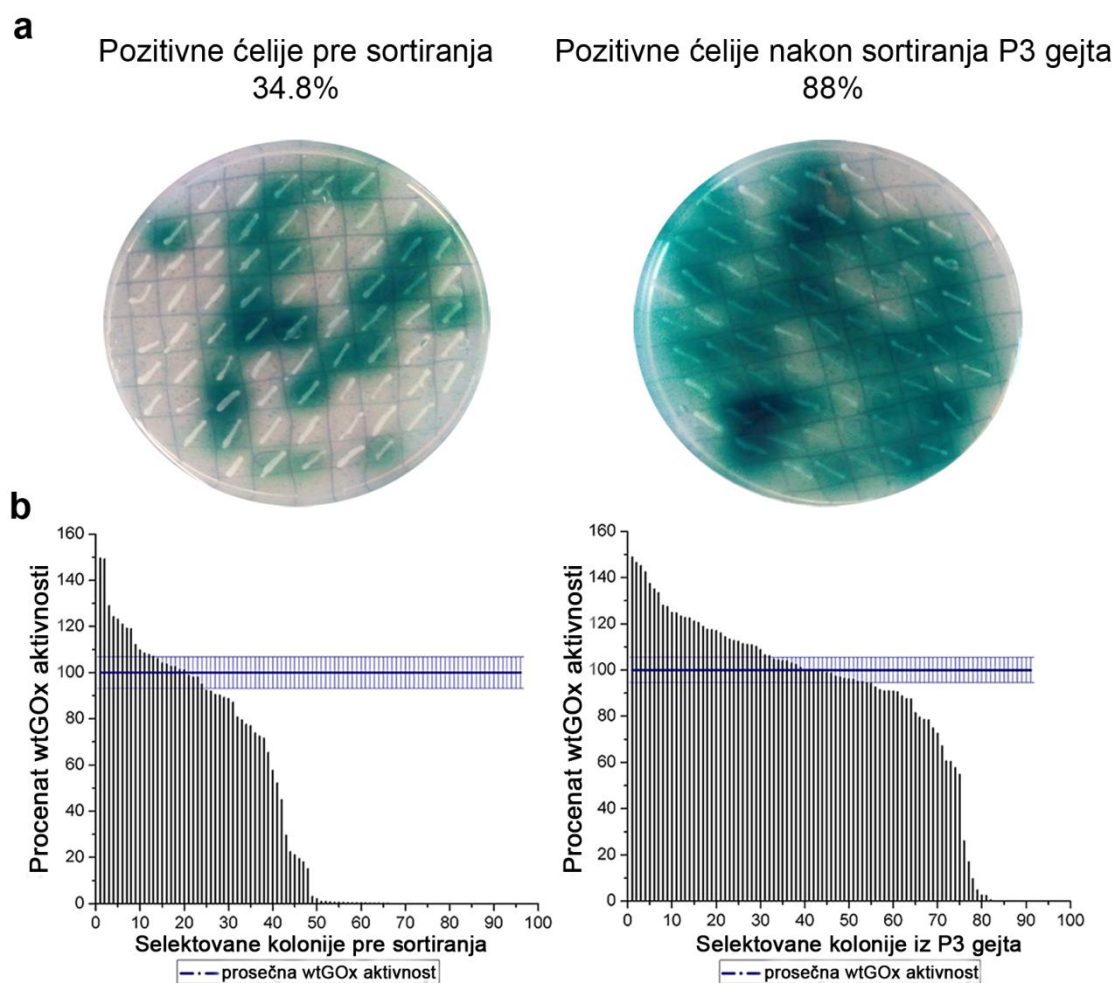
REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 25. FACS analiza (10^4 snimljenih događaja) ćelija kvasca koje eksprimiraju yGFP, wtGOx-yGFP i biblioteku GOx-yGFP u reakcionom esej sa i bez glukoze. Dvostruki grafik yGFP fluorescencije koji predstavlja količinu GOx-GFP molekula na ćelijskoj površini prema DyLight 642 fluorescenciji koja odgovara GOx aktivnosti. P3 – region za sortiranje GOx biblioteke

Ćelije su direktno sortirane na YNB-CAA+Glc+Chl agar ploče i gajene 48h na 30°C. Nakon toga, 69 kolonija je presejano na YNB-CAA+Gal agar ploče i gajene dodatnih 24h. Ćelije na galaktoznoj ploči su testirane na GOx aktivnost koristeći ABTS agar esej (**Slika 26a**). Esej je pokazao 2,5 puta obogaćenje u broju pozitivnih ćelija nakon jedne runde sortiranja.

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 26. a) ABTS agar esej biblioteke GOx koji pokazuje procenat aktivnih kolonija pre sortiranja i nakon sortiranja P3 gejta. **b)** Analiza u mikrotitar pločama aktivnosti mutanata GOx u poređenju sa wtGOx pre sortiranja i nakon sortiranja P3 gejta

Da bi kvantifikovali broj sortiranih GOx varijanti koje su aktivnije od wtGOx, nasumično je izabrano 100 kolonija i testirano u mikrotitar pločama na GOx aktivnost (**Slika 26b**). U jednoj rundi sortiranja, populacija enzimskih varijanti sa većom srednjom vrednosti aktivnosti od srednje vrednosti aktivnosti wtGOx je povećana na 44% nakon sortiranja, što je bolji rezultat u poređenju sa 36% dobijenih u prethodnom istraživanju⁸.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tri najaktivnije varijante iz populacije sortiranih ćelija su sekvencirane, i upoređene su kinetičke konstante V_{\max} i K_m između wtGOx, wtGOx-yGFP i mutanata eksprimiranih na površini ćelija kvasca kao i prečišćenih mutanata bez yGFP taga (Tabela 11). Kao što je bilo očekivano, wtGOx eksprimiran na površini kvasca pokazuje 2,1 puta veću relativnu V_{\max} od wtGOX-yGFP, što potvrđuje prvobitni zaključak da je aktivnost GOx smanjena kada je eksprimiran kao fuzioni protein sa yGFP.

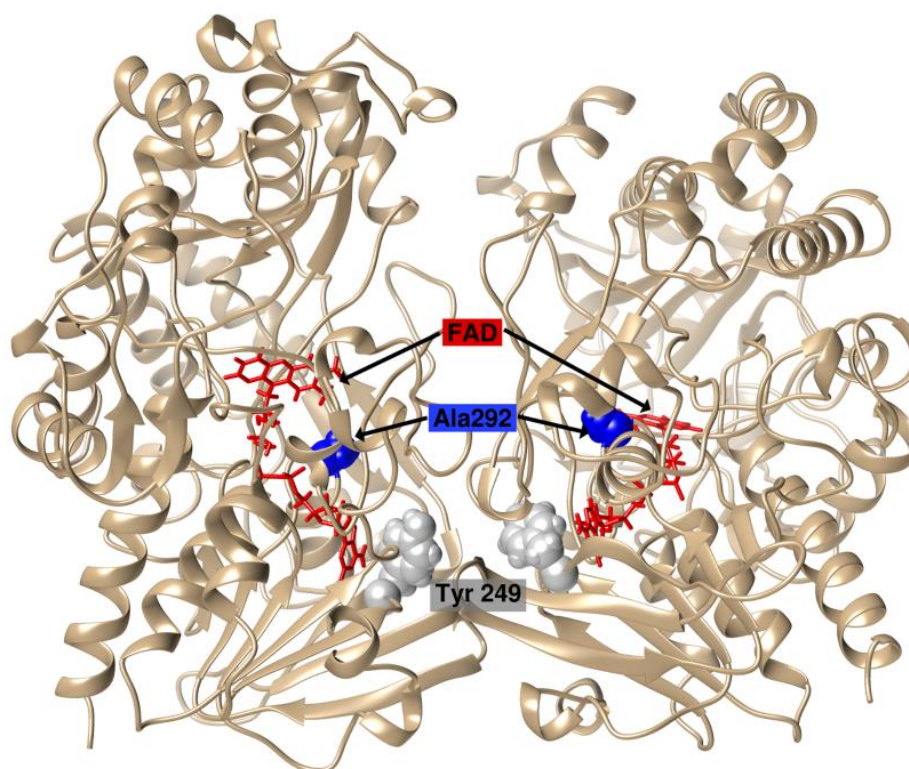
Tabela 11. Aktivnost na pH 7,4 najaktivnijih mutanata sortiranih iz GOx biblioteke u poređenju sa wtGOx-yGFP i wtGOx eksprimirani na površini ćelija kvasca i prečišćeni iz *P. pastoris* KM71H bez yGFP taga

GOx varijanta	Protein na površini kvasca		Prečišćen protein	
	Relativno V_{\max}	Relativno K_m	V_{\max}	K_m
	(IU mL ⁻¹ /OD ₆₀₀)	(mM)	(IU mg ⁻¹)	(mM)
wtGOx-yGFP	1.55 ± 0.02	18.4 ± 0.6	/	/
E6 (A292T) GOx-yGFP	1.98 ± 0.01	23.5 ± 1.0	56.32 ± 0.27	14.6 ± 0.1
A11 (A292T) GOx-yGFP	2.13 ± 0.07	21.2 ± 1.6	55.08 ± 0.58	16.4 ± 1.0
H8 (Y249H) GOx-yGFP	1.16 ± 0.06	17.5 ± 2.0	98.45 ± 1.07	15.8 ± 0.5
wtGOx	3.29 ± 0.09	16.2 ± 0.8	42.60 ± 0.48	16.2 ± 0.5

Dva od tri mutanta imaju mutaciju na istoj poziciji (A292T), i imaju 1,3 puta veću aktivnost u poređenju sa wtGOx-yGFP varijantom kada su eksprimirani na površini ćelija kvasca kao i kada su eksprimirani solubilni bez yGFP taga i upoređeni sa wtGOx. Treći mutant (Y249H) kada je eksprimiran solubilno bez yGFP taga pokazuje 2,3 puta veću aktivnost u odnosu na wtGOx. Razlika u aktivnosti ovog mutanta kada je eksprimiran solubilno u odnosu na to kada je eksprimiran sa yGFP tagom na površini kvasca verovatno leži u

REZULTATI I DISKUSIJA

poziciji mutacije. Ova mutacija se nalazi na dodirnoj površini dve monomerne jedinice GOx (**Slika 27**), i s obzirom da je hidrofobna aminokiselina zamenjena polarnom naelektrisanom, moguće je da yGFP tag utiče na dimerizaciju i da mutacija ima pozitivan efekat na aktivnost solubilnog dimera. Iz ovih rezultata se može zaključiti da se yGFP kao marker nivoa ekspresije proteina i DyLight650-tiramid obeležavanje za detekciju enzimske aktivnosti mogu primeniti u sistemima visoko efikasne pretrage za pronalaženje enzimskih varijanti sa povećanom aktivnosti u jednoj rundi sortiranja.



Slika 27. Trodimenzionalna struktura dimera GOx (PDB kod 1CF3) na kojoj su prikazane pozicije aminokiselinskih ostataka A292 i Y249. Slika je kreirana korišćenjem programa Swiss-PdbViewer verzija 4.1.0 (Švajcarska)

6. ZAKLJUČCI

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su mutanti glukoza-oksidge i optimizovane visoko efikasne metode pretrage biblioteke gena glukoza-oksidge, i uočeno je da:

- M12 mutant GOx proizveden u *P. pastoris* pokazuje oko dva puta veću aktivnost u odnosu na divlji tip enzima na fiziološkom pH, dok su pH optimum i šećerna specifičnost nepromenjeni u odnosu na divlji tip enzima
- aktivnost M12 mutanta sa redoks medijatorom *N,N*-dimetil-nitrozoanilinom pri niskim koncentracijama glukoze je tri puta veća u odnosu na divlji tip enzima, što ga čini dobrim kandidatom za primenu u biosenzorima i biogorivnim ćelijama
- mutant GOx M561S ima 2,5 puta povećan poluživot (123 min) u prisustvu vodonik-peroksida u poređenju sa divljim tipom enzima (50 min)
- jedna mutacija u blizini aktivnog mesta (M214T) dovodi do trostrukog povećanja specifične aktivnosti u odnosu na divlji tip enzima
- uvođenjem zelenog fluorescentnog proteina kao markera nivoa ekspresije GOx na površini ćelija kvasca dobijeno je obogaćenje pozitivnih ćelija od 2,5 puta nakon sortiranja protočnom citometrijom
- istom metodom pretraživanje procenat mutanata GOx koji su aktivniji od divljeg tipa enzima je povećan sa 20% pre sortiranja na 44% nakon jedne runde sortiranja
- razvijena je metoda za pronalaženje oksidativno stabilnijih varijanti glukoza-oksidge zasnovana na ekspresiji proteina na površini ćelija kvasca.

ZAKLJUČCI

- pronađeni su i okarakterisani mutanti GOx povećane aktivnosti i stabilnosti u odnosu na divlji tip enzima.
- razvijena je nova metoda za pretraživanje biblioteka gena GOx zasnovana na protočnoj citometriji i ekspresiji proteina u vidu himere sa yGFP na površini ćelija kvasca.

7. LITERATURA

1. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. & Mehta, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* **6**, 174 (2016).
2. Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. & Wang, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2**, e201209017 (2012).
3. Liu, L. *et al.* How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives. *Bioengineered* **4**, 212–223 (2013).
4. Gilbert, J. A. & Dupont, C. L. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **3**, 347–371 (2011).
5. Lutz, S. Beyond directed evolution - semi-rational protein engineering and design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 734–743 (2011).
6. Bankar, S. B., Bule, M. V, Singhal, R. S. & Ananthanarayan, L. Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances* **27**, 489–501 (2009).
7. Vashist, S. K., Zheng, D., Al-Rubeaan, K., Luong, J. H. T. & Sheu, F. S. Technology behind commercial devices for blood glucose monitoring in diabetes management: A review. *Anal. Chim. Acta* **703**, 124–136 (2011).
8. Ostafe, R., Prodanovic, R., Nazor, J. & Fischer, R. Ultra-high-throughput screening method for the directed evolution of glucose oxidase. *Chem. Biol.* **21**, 414–421 (2014).
9. Prodanovic, R., Ostafe, R., Scacioc, A. & Schwaneberg, U. Ultrahigh-throughput screening system for directed glucose oxidase evolution in yeast cells. *Comb Chem High Throughput Screen* **14**, 55–60 (2011).
10. Prodanovic, R., Ostafe, R., Blanusa, M. & Schwaneberg, U. Vanadium bromoperoxidase-coupled fluorescent assay for flow cytometry sorting of glucose oxidase gene libraries in double emulsions. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 1439–1447 (2012).
11. Arango Gutierrez, E. *et al.* Reengineered glucose oxidase for amperometric glucose determination in diabetes analytics. *Biosens. Bioelectron.* **50**, 84–90 (2013).
12. Horaguchi, Y. *et al.* Construction of mutant glucose oxidases with increased dye-mediated dehydrogenase activity. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 14149–14157 (2012).
13. Zhu, Z., Momeu, C., Zakhartsev, M. & Schwaneberg, U. Making glucose

- oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 2046–2051 (2006).
14. Courjean, O., Gao, F. & Mano, N. Deglycosylation of glucose oxidase for direct and efficient glucose electrooxidation on a glassy carbon electrode. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 5897–5899 (2009).
 15. Kim, M. *et al.* Characterization of a Novel Allele of Glucose Oxidase from a Korean Wild Type Strain of *Aspergillus niger*. *Mol. Cells* **11**, 281–286 (2001).
 16. Hatzinikolaou, D. G. *et al.* A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: Characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 371–381 (1996).
 17. Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S. & Ananthanarayan, L. Glucose oxidase - An overview. *Biotechnol. Adv.* **27**, 489–501 (2009).
 18. Hatzinikolaou, D. G., Mamma, D., Christakopoulos, P. & Kekos, D. Cell bound and extracellular glucose oxidases from *Aspergillus niger* BTL: Evidence for a secondary glycosylation mechanism. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **142**, 29–43 (2007).
 19. Clarke, K. G., Johnstone-Robertson, M., Price, B. & Harrison, S. T. L. Location of glucose oxidase during production by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 72–77 (2006).
 20. Witteveen, C. F. B., Veenhuis, M. & Visser, J. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1190–1194 (1992).
 21. Wong, C. M., Wong, K. H. & Chen, X. D. Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 927–938 (2008).
 22. Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrak, J. & Pericin, D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 731–750 (2005).
 23. Gibson, Q. H., Swoboda, B. E. P. & Massey, V. Kinetics of Action of Glucose. *J Biol Chem* **239**, 3927–3934 (1964).
 24. Hecht, H. J., Kalisz, H. M., Hendle, J., Schmid, R. D. & Schomburg, D. Crystal Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **229**, 153–172 (1993).
 25. Haouz, A., Twist, C., Zentz, C., Tauc, P. & Alpert, B. Dynamic and structural properties of glucose oxidase enzyme. *Eur. Biophys. J.* 19–25

- (1998). doi:10.1007/s002490050106
26. Jones, M. N., Manley, P. & Wilkinson, A. The dissociation of glucose oxidase by sodium n-dodecyl sulphate. *Biochem. J.* **203**, 285–91 (1982).
 27. Gouda, M. D., Singh, S. A., Rao, A. G. A., Thakur, M. S. & Karanth, N. G. Thermal inactivation of glucose oxidase: Mechanism and stabilization using additives. *J. Biol. Chem.* **278**, 24324–24333 (2003).
 28. Pazur, J. H. & Kleppe, K. The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* **3**, 578–583 (1964).
 29. Takegawa, K. *et al.* Novel oligomannose-type sugar chains derived from glucose oxidase of *Aspergillus niger*. *Biochem.Int.* **25**, 181–190 (1991).
 30. Takegawa, K., Fujiwara, K., Iwahara, S., Yamamoto, K. & Tochikura, T. Effect of deglycosylation of N-linked sugar chains on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochem. Cell Biol.* **67**, 460–4 (1989).
 31. Pazur, J. H., Kleppe, K. & Cepure, A. A glycoprotein structure for glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 351–357 (1965).
 32. Kalisz, H. M., Hecht, H. J., Schomburg, D. & Schmid, R. D. Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1080**, 138–142 (1991).
 33. Kalisz, H. M., Hendle, J. & Schmid, R. D. Structural and biochemical properties of glycosylated and deglycosylated glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 502–507 (1997).
 34. Wilson, R. & Turner, A. P. F. Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics* **7**, 165–185 (1992).
 35. Zhu, Z., Momeu, C., Zakhartsev, M. & Schwaneberg, U. Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 2046–2051 (2006).
 36. Zhu, Z. *et al.* Directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for ferrocenemethanol-mediated electron transfer. *Biotechnol. J.* **2**, 241–248 (2007).
 37. Trivić, S., Leskovac, V., Zeremski, J., Vrvić, M. & Winston, G. W. Bioorganic mechanisms of the formation of free radicals catalyzed by glucose oxidase. *Bioorg. Chem.* **30**, 95–106 (2002).
 38. Mirón, J., González, M. P., Vázquez, J. A., Pastrana, L. & Murado, M. A. A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory,

- deactivant and diffusional effects, and their interactions. *Enzyme Microb. Technol.* **34**, 513–522 (2004).
39. Bao, J., Furumoto, K., Yoshimoto, M., Fukunaga, K. & Nakao, K. Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase. *Biochem. Eng. J.* **13**, 69–72 (2003).
 40. Keilin, D. and Hartree, E. F. Specificity of glucose oxidase (notatin). *Biochem. J.* **50**, 331 (1952).
 41. Adams, E. C., Mast, R. L. & Free, a H. Specificity of glucose oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 230–234 (1960).
 42. Wohlfahrt, G., Trivić, S. & Zeremski, J. The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Mol. Cell. ...* **260**, 69–83 (2004).
 43. Forrow, N. J., Sanghera, G. S. & Walters, S. J. The influence of structure in the reaction of electrochemically generated ferrocenium derivatives with reduced glucose oxidase. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **0**, 3187–3194 (2002).
 44. Wohlfahrt, G. *et al.* 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **55**, 969–977 (1999).
 45. Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrač, J. & Peričin, D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: The mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 731–750 (2005).
 46. Weibel, M. K. & Bright, H. J. The glucose oxidase mechanism. Interpretation of the pH dependence. *J. Biol. Chem.* **246**, 2734–2744 (1971).
 47. Meyer, M., Wohlfahrt, G., Knäblein, J. & Schomburg, D. Aspects of the mechanism of catalysis of glucose oxidase: a docking, molecular mechanics and quantum chemical study. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **12**, 425–440 (1998).
 48. Sanner, C., Macheroux, P., Rüterjans, H., Müller, F. & Bacher, A. 15N- and 13C-NMR investigations of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* **196**, 663–672 (1991).
 49. Su, Q. & Klinman, J. P. Nature of oxygen activation in glucose oxidase from *Aspergillus niger*: The importance of electrostatic stabilization in superoxide formation. *Biochemistry* **38**, 8572–8581 (1999).
 50. Prabhakar, R., Siegbahn, P. E. M. & Minaev, B. F. A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase and copper amine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1647**, 173–178 (2003).

51. Roth, J. P. & Klinman, J. P. Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 62–7 (2003).
52. Zoldák, G., Zubrik, A., Musatov, A., Stupák, M. & Sedlák, E. Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure. *J. Biol. Chem.* **279**, 47601–47609 (2004).
53. Ye, W. N. & Combes, D. The relationship between the glucose oxidase subunit structure and its thermostability. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **999**, 86–93 (1989).
54. Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W. & Katayama, D. S. Stability of protein pharmaceuticals: An update. *Pharmaceutical Research* **27**, 544–575 (2010).
55. Ghesquière, B. *et al.* Redox Proteomics of Protein-bound Methionine Oxidation. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.006866 (2011).
56. Estell, D. A., Graycar, T. P. & Wells, J. A. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J. Biol. Chem.* **260**, 6518–6521 (1985).
57. Kim, Y. H., Berry, A. H., Spencer, D. S. & Stites, W. E. Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins. *Protein Eng.* **14**, 343–347 (2001).
58. Griffiths, S. W. & Cooney, C. L. Relationship between protein structure and methionine oxidation in recombinant human α 1-antitrypsin. *Biochemistry* **41**, 6245–6252 (2002).
59. Bertolotti-Ciarlet, A. *et al.* Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to FcRn and Fc γ receptors. *Mol. Immunol.* **46**, 1878–1882 (2009).
60. Ozturk, H., Ece, S., Gundeger, E. & Evran, S. Site-directed mutagenesis of methionine residues for improving the oxidative stability of α -amylase from *Thermotoga maritima*. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 449–451 (2013).
61. Quecine, M. C. *et al.* Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7511–7518 (2012).
62. Greenfield, P. F., Kittrell, J. R. & Laurence, R. L. Inactivation of immobilized glucose oxidase by hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* **65**, 109–124 (1975).

63. Kleppe, K. The Effect of Hydrogen Peroxide on Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* **5**, 139–143 (1966).
64. Yoshimoto, M. *et al.* Mechanism for high stability of liposomal glucose oxidase to inhibitor hydrogen peroxide produced in prolonged glucose oxidation. *Bioconjug. Chem.* **15**, 1055–1061 (2004).
65. Yoshimoto, M., Sato, M., Wang, S., Fukunaga, K. & Nakao, K. Structural stability of glucose oxidase encapsulated in liposomes to inhibition by hydrogen peroxide produced during glucose oxidation. *Biochem. Eng. J.* **30**, 158–163 (2006).
66. Tzanov, T., Costa, S. A., Gübitz, G. M. & Cavaco-Paulo, A. Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching. *J. Biotechnol.* **93**, 87–94 (2002).
67. Isaksen, A. & Adlernissen, J. Antioxidative Effect of Glucose Oxidase and Catalase in Mayonnaises of Different Oxidative Susceptibility .2. Mathematical Modelling. *Food Sci. Technol. Technol.* **30**, 847–852 (1997).
68. Labuza, T. P. & Breene, W. M. Applications of 'active packaging' for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *J. Food Process. Preserv.* **13**, 1–69 (1989).
69. Pickering, G. J., Heatherbell, D. A. & Barnes, M. F. Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. *Food Res. Int.* **31**, 685–692 (1998).
70. Malherbe, D. F., Toit, M., Cordero Otero, R. R., Rensburg, P. & Pretorius, I. S. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 502–511 (2003).
71. D'Auria, S., Herman, P., Rossi, M. & Lakowicz, J. R. The fluorescence emission of the apo-glucose oxidase from *Aspergillus niger* as probe to estimate glucose concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 550–553 (1999).
72. Vodopivec, M., Berovič, M., Jančar, J., Podgornik, A. & Štrancar, A. Application of Convective Interaction Media disks with immobilised glucose oxidase for on-line glucose measurements. *Anal. Chim. Acta* **407**, 105–110 (2000).
73. Chudobová, I., Vrbová, E., Kodíček, M., Janovcová, J. & Káš, J. Fibre optic biosensor for the determination of D-glucose based on absorption changes of immobilized glucose oxidase. *Anal. Chim. Acta* **319**, 103–110 (1996).

74. Cui, G. *et al.* Disposable amperometric glucose sensor electrode with enzyme-immobilized nitrocellulose strip. *Talanta* **54**, 1105–1111 (2001).
75. Harborn, U., Xie, B., Venkatesh, R. & Danielsson, B. Evaluation of a miniaturized thermal biosensor for the determination of glucose in whole blood. *Clin. Chim. Acta* **267**, 225–237 (1997).
76. Zhu, J. *et al.* Planar Amperometric Glucose Sensor Based on Glucose Oxidase Immobilized by Chitosan Film on Prussian Blue Layer. *Sensors* **2**, 127–136 (2002).
77. Zaccolo, M., Williams, D. M., Brown, D. M. & Gherardi, E. An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *J. Mol. Biol.* **255**, 589–603 (1996).
78. Malcolm, B. a *et al.* Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 133–137 (1989).
79. Turner, N. J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **21**, 474–478 (2003).
80. Farinas, E. T., Bulter, T. & Arnold, F. H. Directed enzyme evolution. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 545–551 (2001).
81. Jennewein, S. *et al.* Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-d-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol. J.* **1**, 537–548 (2006).
82. Dror, A. & Fishman, A. Engineering Non-Heme Mono- and Dioxygenases for Biocatalysis. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2**, e201209011 (2012).
83. Eijsink, V. G. H., GÅseidnes, S., Borchert, T. V. & Van Den Burg, B. Directed evolution of enzyme stability. *Biomol. Eng.* **22**, 21–30 (2005).
84. Miyazaki-Imamura, C. *et al.* Improvement of H₂O₂ stability of manganese peroxidase by combinatorial mutagenesis and high-throughput screening using in vitro expression with protein disulfide isomerase. *Protein Eng. Des. Sel.* **16**, 423–428 (2003).
85. Cherry, J. R. *et al.* Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.* **17**, 379–384 (1999).
86. Hibbert, E. G. *et al.* Directed evolution of biocatalytic processes. *Biomol Eng* **22**, 11–19 (2005).
87. Bloom, J. D. *et al.* Evolving strategies for enzyme engineering. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 447–452 (2005).
88. Longwell, C. K., Labanieh, L. & Cochran, J. R. High-throughput screening

- technologies for enzyme engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **48**, 196–202 (2017).
89. Hibbert, E. G. & Dalby, P. A. Directed evolution strategies for improved enzymatic performance. *Microb. Cell Fact.* **4**, 1–6 (2005).
 90. Hogrefe, H. H., Cline, J., Youngblood, G. L. & Allen, R. M. Creating randomized amino acid libraries with the Quikchange® multi site-directed mutagenesis kit. *Biotechniques* **33**, 1158–1165 (2002).
 91. Greener, A., Callahan, M. & Jerpseth, B. An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Mol. Biotechnol.* **7**, 189–195 (1997).
 92. Stemmer, W. P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10747–10751 (1994).
 93. Abecassis, V., Pompon, D. & Truan, G. High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Res.* **28**, E88 (2000).
 94. Gonzalez-Perez, D., Garcia-Ruiz, E. & Alcalde, M. *Saccharomyces cerevisiae* in directed evolution: An efficient tool to improve enzymes. *Bioeng. Bugs* **3**, 172–177 (2012).
 95. Blagodatski, A. & Katanaev, V. L. Technologies of directed protein evolution in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1207–1214 (2011).
 96. Patrick, W. M., Firth, A. E. & Blackburn, J. M. User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein Eng. Des. Sel.* **16**, 451–457 (2003).
 97. Sygmund, C. *et al.* Semi-rational engineering of cellobiose dehydrogenase for improved hydrogen peroxide production. *Microb. Cell Fact.* **12**, 1–10 (2013).
 98. Koga, Y., Kato, K., Nakano, H. & Yamane, T. Inverting enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* KWI-56 lipase by combinatorial mutation and high-throughput screening using single-molecule PCR and *in vitro* expression. *J. Mol. Biol.* **331**, 585–592 (2003).
 99. Hill, C. M., Li, W. S., Thoden, J. B., Holden, H. M. & Raushel, F. M. Enhanced degradation of chemical warfare agents through molecular engineering of the phosphotriesterase active site. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8990–8991 (2003).
 100. Lutz, S. Beyond directed evolution-semi-rational protein engineering and

- design. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 734–743 (2010).
101. Luetz, S., Giver, L. & Lalonde, J. Engineered enzymes for chemical production. *Biotechnology and Bioengineering* **101**, 647–653 (2008).
 102. Bommarius, A. S., Blum, J. K. & Abrahamson, M. J. Status of protein engineering for biocatalysts: How to design an industrially useful biocatalyst. *Current Opinion in Chemical Biology* **15**, 194–200 (2011).
 103. Holland, J. T. *et al.* Rational redesign of Glucose oxidase for improved catalytic function and stability. *PLoS One* **7**, e37924 (2012).
 104. Yu, E. H., Prodanovic, R., Güven, G., Ostafe, R. & Schwaneberg, U. Electrochemical oxidation of glucose using mutant glucose oxidase from directed protein evolution for biosensor and biofuel cell applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **165**, 1448–1457 (2011).
 105. Gellissen, G. *et al.* New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - A comparison. *FEMS Yeast Research* **5**, 1079–1096 (2005).
 106. Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. & Gellissen, G. Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 513–523 (2007).
 107. Gellissen, G., Strasser, A. W. M. & Suckow, M. in *Production of Recombinant Proteins 1–5* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005). doi:10.1002/3527603670.ch1
 108. Li, J. *et al.* Green fluorescent protein in i: Real-time studies of the GAL 1 promoter. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 187–196 (2000).
 109. Goffeau, A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science* (80-.). **274**, 546–567 (1996).
 110. Bitter, G. A. *et al.* Expression and Secretion Vectors for Yeast. *Methods Enzymol.* **153**, 516–544 (1987).
 111. Bitter, G. a, Chen, K. K., Banks, a R. & Lai, P. H. Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by alpha-factor gene fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 5330–5334 (1984).
 112. Kurjan, J. & Herskowitz, I. Structure of a yeast pheromone gene (MFa): A putative α -factor precursor contains four tandem copies of mature α -factor. *Cell* **30**, 933–943 (1982).
 113. Julius, D., Schekman, R. & Thorner, J. Glycosylation and processing of prepro- α -factor through the yeast secretory pathway. *Cell* **36**, 309–318 (1984).

LITERATURA

114. Liu, Z., Tyo, K. E. J., Martinez, J.L., Petranovic, D. & Nielsen, J. Different Expression Systems for Production of Recombinant Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 1259–1268 (2012).
115. Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. & Gorwa-Grauslund, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 937–953 (2007).
116. De Baetselier, A. *et al.* A new production method for glucose oxidase. *J. Biotechnol.* **24**, 141–148 (1992).
117. Kapat, A., Jung, J. K. & Park, Y. H. Improvement of extracellular recombinant glucose oxidase production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of different feeding strategies. *Biotechnol. Lett.* **20**, 319–323 (1998).
118. De-Baetselier, A. *et al.* Fermentation of a yeast producing *A. Niger* Glucose Oxidase: Scale-up, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/Technology* **9**, 559–561 (1991).
119. Park, E. H. *et al.* Expression of glucose oxidase by using recombinant yeast. *J Biotechnol* **81**, 35–44 (2000).
120. Kapat, A., Jung, J. K. & Park, Y. H. Enhancement of glucose oxidase production in batch cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Optimization of oxygen transfer condition. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 216–222 (2001).
121. Frederick, K. R. *et al.* Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* **265**, 3793–3802 (1990).
122. Ko, J. H., Hahm, M. S., Kang, H. A., Nam, S. W. & Chung, B. H. Secretory expression and purification of *Aspergillus niger* glucose oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in PMR1 gene. *Protein Expr. Purif.* **25**, 488–493 (2002).
123. Yamaguchi, M., Tahara, Y., Nakano, A. & Taniyama, T. Secretory and continuous expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **55**, 273–278 (2007).
124. Guo, Y., Lu, F., Zhao, H., Tang, Y. & Lu, Z. Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* Z-25 in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* **162**, 498–509 (2010).
125. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. & Harvey, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249–270 (2005).

LITERATURA

126. Potvin, G., Ahmad, A. & Zhang, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem. Eng. J.* doi:10.1016/j.bej.2010.07.017
127. Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. & Valero, F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb. Cell Fact.* **5**, 17 (2006).
128. Li, P. *et al.* Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* **142**, 105–124 (2007).
129. Sreekrishna, K. *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. in *Gene* **190**, 55–62 (1997).
130. Higgins, D. R. & Cregg, J. M. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol. Biol.* **103**, 1–15 (1998).
131. Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 45–66 (2000).
132. Clare, J. J. *et al.* Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **105**, 205–212 (1991).
133. Tolner, B., Smith, L., Begent, R. H. J. & Chester, K. A. Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *Nat. Protoc.* **1**, 1006–1021 (2006).
134. Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. & Grinna, L. High-Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylotrophic Yeast, *Pichia Pastoris*. *Nat. Biotechnol.* **5**, 1305–1308 (1987).
135. Jenkins, N., Parekh, R. B. & James, D. C. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotechnol.* **14**, 975–981 (1996).
136. Wright, A. & Morrison, S. L. Effect of glycosylation on antibody function: Implications for genetic engineering. *Trends in Biotechnology* **15**, 26–32 (1997).
137. Gemmill, T. R. & Trimble, R. B. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1426**, 227–237 (1999).
138. Grinna, L. S. & Tschopp, J. F. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia*

- pastoris*. *Yeast* **5**, 107–115 (1989).
139. Trimble, R. B., Atkinson, P. H., Tschopp, J. F., Townsend, R. R. & Maley, F. Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces* SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* **266**, 22807–17 (1991).
 140. Callewaert, N. *et al.* Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1,2- α -D-mannosidase for N-glycan engineering in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **503**, 173–178 (2001).
 141. Choi, B.-K. *et al.* Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5022–7 (2003).
 142. Wu, D., Hao, Y. Y., Chu, J., Zhuang, Y. P. & Zhang, S. L. Inhibition of degradation and aggregation of recombinant human consensus interferon- α mutant expressed in *Pichia pastoris* with complex medium in bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 1063–1071 (2008).
 143. Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. & Higgins, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16**, 23–52 (2000).
 144. Kobayashi, K. *et al.* High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 55–61 (2000).
 145. Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P. & Enfors, S.-O. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microb. Cell Fact.* **2**, 6 (2003).
 146. Li, Z. *et al.* Low-Temperature Increases the Yield of Biologically Active Herring Antifreeze Protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **21**, 438–445 (2001).
 147. Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A. K., Martinelle, M. & Enfors, S. O. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *J. Biotechnol.* **102**, 45–53 (2003).
 148. Sirén, N. *et al.* Production of recombinant HIV-1 Nef (negative factor) protein using *Pichia pastoris* and a low-temperature fed-batch strategy. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **44**, 151–158 (2006).
 149. Xiao, A., Zhou, X., Zhou, L. & Zhang, Y. Improvement of cell viability and hirudin production by ascorbic acid in *Pichia pastoris* fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 837–844 (2006).
 150. Leemhuis, H., Kelly, R. M. & Dijkhuizen, L. Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. *IUBMB Life* **61**, 222–228 (2009).

151. Xiao, H., Bao, Z. & Zhao, H. High throughput screening and selection methods for directed enzyme evolution. *Ind. Eng. Chem. Res.* **54**, 4011–4020 (2015).
152. Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. F. & Scheper, T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 350–360 (2001).
153. Mattanovich, D. & Borth, N. Applications of cell sorting in biotechnology. *Microbial Cell Factories* **5**, 12 (2006).
154. Catherine, C., Lee, K. H., Oh, S. J. & Kim, D. M. Cell-free platforms for flexible expression and screening of enzymes. *Biotechnology Advances* **31**, 797–803 (2013).
155. Griffiths, A. D. & Tawfik, D. S. Man-made enzymes - From design to in vitro compartmentalisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 338–353 (2000).
156. Mastrobattista, E. *et al.* High-throughput screening of enzyme libraries: In vitro evolution of a β -galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. *Chem. Biol.* **12**, 1291–1300 (2005).
157. Guo, M. T., Rotem, A., Heyman, J. A. & Weitz, D. A. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab Chip* **12**, 2146 (2012).
158. Aharoni, A. *et al.* High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nat. Methods* **3**, 609–614 (2006).
159. Aharoni, A., Amitai, G., Bernath, K., Magdassi, S. & Tawfik, D. S. High-throughput screening of enzyme libraries: Thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments. *Chem. Biol.* **12**, 1281–1289 (2005).
160. Cherf, G. M. & Cochran, J. R. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1319**, 155–175 (2015).
161. Boder, E. T. & Wittrup, K. D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* **15**, 553–557 (1997).
162. Holler, P. D. *et al.* In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5387–5392 (2000).
163. Rao, B. M., Girvin, A. T., Ciardelli, T., Lauffenburger, D. A. & Wittrup, K. D. Interleukin-2 mutants with enhanced α -receptor subunit binding affinity. *Protein Eng. Des. Sel.* **16**, 1081–1087 (2003).
164. Boder, E. T., Raeeszadeh-Sarmazdeh, M. & Price, J. V. Engineering antibodies by yeast display. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **526**, 99–106 (2012).

LITERATURA

165. Traxlmayr, M. W. & Obinger, C. Directed evolution of proteins for increased stability and expression using yeast display. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **526**, 174–180 (2012).
166. Shusta, E. V, Holler, P. D., Kieke, M. C., Kranz, D. M. & Wittrup, K. D. Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nat. Biotechnol.* **18**, 754–9 (2000).
167. Traxlmayr, M. W. *et al.* Directed evolution of stabilized IgG1-Fc scaffolds by application of strong heat shock to libraries displayed on yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 542–549 (2012).
168. Orr, B. A., Carr, L. M., Wittrup, K. D., Roy, E. J. & Kranz, D. M. Rapid method for measuring scFv thermal stability by yeast surface display. *Biotechnol. Prog.* **19**, 631–638 (2003).
169. Ostafe, R., Prodanovic, R., Commandeur, U. & Fischer, R. Flow cytometry-based ultra-high-throughput screening assay for cellulase activity. *Anal. Biochem.* **435**, 93–98 (2013).
170. Antipov, E., Cho, A. E., Wittrup, K. D. & Klivanov, A. M. Highly L and D enantioselective variants of horseradish peroxidase discovered by an ultrahigh-throughput selection method. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 17694–17699 (2008).
171. Ormo, M. *et al.* Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science (80-.)*. **273**, 1392–1395 (1996).
172. Miyawaki, A. Proteins on the move: insights gained from fluorescent protein technologies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 656–668 (2011).
173. Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12501–4 (1994).
174. Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212–1218 (1993).
175. Ganini, D. *et al.* Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. *Redox Biol.* **12**, 462–468 (2017).
176. Remington, S. J. Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science* **20**, 1509–1519 (2011).
177. Puckett, L. G., Lewis, J. C., Bachas, L. G. & Daunert, S. Development of an assay for beta-lactam hydrolysis using the pH-dependence of enhanced green fluorescent protein. *Anal. Biochem.* **309**, 224–231 (2002).

178. Dikici, E., Deo, S. K. & Daunert, S. Drug detection based on the conformational changes of calmodulin and the fluorescence of its enhanced green fluorescent protein fusion partner. *Anal. Chim. Acta* **500**, 237–245 (2003).
179. Romoser, V. A., Hinkle, P. M. & Persechini, A. Detection in living cells of Ca²⁺ dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin binding sequence - A new class of fluorescent indicators. *J. Biol. Chem.* **272**, 13270–13274 (1997).
180. Kitamura, A., Nakayama, Y. & Kinjo, M. Efficient and dynamic nuclear localization of green fluorescent protein via RNA binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 401–406 (2015).
181. Wu, C.-F., Cha, H. J., Rao, G., Valdes, J. J. & Bentley, W. E. A green fluorescent protein fusion strategy for monitoring the expression, cellular location, and separation of biologically active organophosphorus hydrolase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 78–83 (2000).
182. Kaether, C. & Gerdes, H. H. Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Lett.* **369**, 267–271 (1995).
183. Tang, J., Liang, S., Zhang, J., Gao, Z. & Zhang, S. pGreen-S: A clone vector bearing absence of enhanced green fluorescent protein for screening recombinants. *Anal. Biochem.* **388**, 173–174 (2009).
184. Tsuchida, S., Tamura, M., Hamaue, N. & Aoki, T. Screening of recombinant *Escherichia coli* using activation of green fluorescent protein as an indicator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**, 32–35 (2014).
185. Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–38 (1996).
186. Cormack, B. P. *et al.* Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 303–311 (1997).
187. Pavoov, T. V, Cho, Y. K. & Shusta, E. V. Development of {GFP-based} biosensors possessing the binding properties of antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. {U.S.A.}* **106**, 11895–11900 (2009).
188. Li, J., Xu, H., Bentley, W. E. & Rao, G. Impediments to secretion of green fluorescent protein and its fusion from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **18**, 831–838 (2002).
189. Li, J., Xu, H., Herber, W. K., Bentley, W. E. & Rao, G. Integrated

LITERATURA

- bioprocessing in *Saccharomyces cerevisiae* using green fluorescent protein as a fusion partner. *Biotechnol. Bioeng.* **79**, 682–693 (2002).
190. Huang, D., Gore, P. R. & Shusta, E. V. Increasing yeast secretion of heterologous proteins by regulating expression rates and post-secretory loss. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 1264–1275 (2008).
 191. Huang, D. & Shusta, E. V. Secretion and surface display of green fluorescent protein using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **21**, 349–357 (2005).
 192. Shibasaki, S. *et al.* Quantitative evaluation of the enhanced green fluorescent protein displayed on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* by fluorometric and confocal laser scanning microscopic analyses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 471–475 (2001).
 193. Shimojyo, R., Furukawa, H., Fukuda, H. & Kondo, A. Preparation of Yeast Strains Displaying IgG Binding Domain ZZ and Enhanced Green Fluorescent Protein for Novel Antigen Detection Systems. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 493–495 (2003).
 194. Ye, K. *et al.* Construction of an engineered yeast with glucose-inducible emission of green fluorescence from the cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 90–96 (2000).
 195. Zhou, Y. F., Zhang, X. E., Liu, H., Zhang, C. G. & Cass, A. E. Cloning and expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in methylotrophic yeast. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology* **17**, 400–5 (2001).
 196. Blazic, M. *et al.* Yeast surface display for the expression, purification and characterization of wild-type and B11 mutant glucose oxidases. *Protein Expr. Purif.* **89**, 175–180 (2013).
 197. Courjean, O. & Mano, N. Recombinant glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* for efficient bioelectrochemical applications in physiological conditions. *J Biotechnol* **151**, 122–129 (2011).
 198. Hönes, J., Müller, P. & SurrIDGE, N. The Technology Behind Glucose Meters: Test Strips. *Diabetes Technol. Ther.* **10**, S-10-S-26 (2008).
 199. Momeu, C. Improving glucose oxidase properties by directed evolution. (Jacobs University Bremen, 2007).
 200. Traxlmayr, M. W. & Obinger, C. Directed evolution of proteins for increased stability and expression using yeast display. *Arch. Biochem. Biophys.* **526**, 174–180 (2012).
 201. Prodanović, R. M. *et al.* Stabilization of alpha-glucosidase in organic

LITERATURA

- solvents by immobilization on macroporous poly(GMA-co-EGDMA) with different surface characteristics. *J. Serbian Chem. Soc.* **71**, 339–347 (2006).
202. Bradbury, A. & Plückthun, A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature* **518**, 27–29 (2015).
203. Kelly, L. A., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M. & Sternberg, M. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 845–858 (2015).

8. PRILOG 1: prajmeri za kloniranje

Prajmeri za kloniranje zelenog fluorescentnog proteina u pCTCON2 (4.3.1.1)

FP ATTGGATCCTCTGGTATGTCTAAAGGTGAAGAATT

RP AATCTCGAGTCATTTGTACAATTCATCCATAC

Prajmeri za kloniranje glukoza-oksidaze u pCTCON2 i GFP-pCTCON2 i pravljenje biblioteka glukoza-oksidaze u GFP-pCTCON2 vektoru (4.3.2.1, 4.3.6)

FP ATCGCTAGCAGCAATGGCATTGAAGC

RP ATCGGATCCTCCCTGCATGGAAGC

Prajmeri za kloniranje glukoza-oksidaze u pPICZ α A vector (4.3.3.1)

FP ATCTCTCGAGAAAAGAAGCAATGGCATTGAAG

RP GAAGCTCTAGAGCTCACTGCATGG

Prajmeri za pravljenje saturacionih biblioteka glukoza-oksidaze u pCTCON2 vektoru (NNN predstavlja svaki od 64 kodona) (4.3.4)

Met190 FP CGTCAAGGCTCTC NNN AGCGCTGTCGAAG
 RP CTTCGACAGCGCT NNN GAGAGCCTTGACG

Met214 FP CATGGTGTGTCC $NNNTT$ CCCCAACACC
 RP GGTGTTGGGGA $NNNGG$ ACACACCATG

Met305 FP CCGGTATCGG $ANNNA$ AGTCCATCCTG
 RP CAGGATGGACT $TNNNT$ CCGATACCGG

Met480 FP CTCCGGTGCC $NNNC$ AGACCTACTTC
 RP GAAGTAGGTCTG $NNNGG$ CACCGGAG

PRILOG 1: prajmeri za kloniranje

Met523	FP	GGTACTTGCTCCNNNATGCCGAAGGAG
	RP	CTCCTTCGGCATNNNGGAGCAAGTACC
Met524	FP	CTTGCTCCATGNNNCCGAAGGAGATG
	RP	CATCTCCTTCGGNNNCATGGAGCAAG
Met528	FP	GCCGAAGGAGNNNGGCGGTGTTG
	RP	CAACACCGCCNNNCTCCTTCGGC
Met556	FP	CCTCCTACGCAANNNTCGTCCCATGTCATG
	RP	CATGACATGGGACGANNNTTGCGTAGGAGG
Met561	FP	CGTCCCATGTCNNNACGGTGTTCTATG
	RP	CATAGAACACCGTNNNGACATGGGACG
Met567	FP	GGTGTTCTATGCCNNNGCGCTAAAAATTTCCG
	RP	CCGAAATTTTTAGCGCNNNGGCATAGAACACC
Met582	FP	GATTATGCTTCCNNNCAGGGAGGATCCG
	RP	CGGATCCTCCCTGNNNGGAAGCATAATC

Prajmeri za pravljenje kombinovanih mutanata glukoza-oksidade u pCTCON2 i pPICZaA vektoru (4.3.5)

M214T	FP	CATGGTGTGTCCACCTTCCCCAACACC
	RP	GGTGTTGGGGAAGGTGGACACACCATG
M556L	FP	CCTCCTACGCAACTATCGTCCCATGTCATG
	RP	CATGACATGGGACGATAGTTGCGTAGGAGG
M561S	FP	CGTCCCATGTCAGTACGGTGTTCTATG
	RP	CATAGAACACCGTACTGACATGGGACG
M567F	FP	GTGTTCTATGCCTTTGCGCTAAAAATTTCCG
	RP	CGAAATTTTTAGCGCAAAGGCATAGAACAC

Biografija

Gordana Kovačević je rođena 26.10.1987. godine u Sarajevu, Bosna i Hercegovina. Osnovnu i srednju školu je završila u Požarevcu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, upisala je 2006. godine i završila 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,29. Dobitnik je specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za postignut izuzetan uspeh tokom studiranja. Master studije je upisala iste godine na smeru Biohemija i završila 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,80. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer biohemija, je upisala 2011. godine. Od 2012. godine zaposlena je na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta i angažovana na projektu „Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj“ (rukovodilac projekta dr Marija Gavrović Jankulović). U toku 2016. i 2017. godine je bila na petomesečnom studijskom boravku u Nemačkoj u okviru bilateralnog projekta „Razvoj visoko efikasnih skrining sistema zasnovanih na protočnoj citometriji i mikrofluidici za dirigovanu evoluciju glukoza oksidaze, celobiozo dehidrogenaze i hemicelulaze“. 2016. godine je dobila EMBO stipendiju za učešće na VII EMBO konferenciji u Manhajmu, Nemačka, a 2017. godine je učestvovala na praktičnom kursu “High-throughput protein production and crystallization” u Oksfordu, u organizaciji EMBO i Univerziteta u Oksfordu. Do sada je objavila pet radova u međunarodnim časopisima, od kojih dva kao prvi autor. Imala je šest saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Гордана Ковачевић _____

Број индекса _____ ДБ12/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Протеински инжењеринг и развој високоефикасних метода за претраживање библиотеке гена глукоза-оксидазе из *Aspergillus niger* у циљу повећања ензимске активности и стабилности

- 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.

Потпис аутора

У Београду, 13.08.2018.године

Гордана Ковачевић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Гордана Ковачевић

Број индекса ДБ12/2011

Студијски програм Биохемија

Наслов рада **Протеински инжењеринг и развој високоефикасних метода за претраживање библиотеке гена глукоза-оксидазе из *Aspergillus niger* у циљу повећања ензимске активности и стабилности**

Ментор др Радивоје Продановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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 у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 13.08.2018.године

Гордана Ковачевић

Изјава о коришћењу

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

Протеински инжењеринг и развој високоефикасних метода за претраживање библиотеке гена глукоза-оксидазе из *Aspergillus niger* у циљу повећања ензимске активности и стабилности

која је 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).

Потпис аутора

У Београду, 13.08.2018.године

Јордана Кобичевић

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.