

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Mirna Larva

**Ekspresija Rekombinantnih Litičkih Polisaharidnih Monooksigenaza  
iz Paprati**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Institutu za Molekularnu Biotehnologiju, Tehničko Sveučilište u Grazu, pod vodstvom mentora Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Roberta Kourista, Dipl.-Ing. Bakk.techn. PhD Daniela Krachera i prof. dr. sc. Anite Slavica, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

## POPIS KRATICA

1KP

(engl. *1000 Plants transcriptome data*)

Inicijativa 1000 biljnih transkriptoma

2,6-DMP

(engl. *2,6-dimethoxyphenol*)

2,6-dimetoksifenol

AA

(engl. *Auxiliary Activity enzymes*)

Enzimi pomoćne aktivnosti

BCA

(engl. *BicinChoninic acid Assay*)

Metoda bicinhoninske kiseline

BSA

(engl. *Bovine serum Albumin*)

Albumin goveđeg seruma

CAZy

(engl. *the Carbohydrate-Active enZYmes*)

Baza podataka s enzimima koji su uključeni u sintezu, metabolizam i prepoznavanje ugljikohidrata

CBM21

(engl. *Carbohydrate-Binding Module Family 21*)

Obitelj enzima koji imaju modul za vezanje ugljikohidrata

ddH<sub>2</sub>O

(engl. *Double Distilled water*)

Dvostruko destilirana voda

DNA

(engl. *DeoxyriboNucleic Acid*)

Deoksiribonukleinska kiselina

EDTA

(engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

Etilendiamintetraoctena kiselina

FPLC

(engl. *Fast Protein Liquid Chromatography*)

Brza proteinska tekućinska kromatografija

GH61 (glikozidni hidrolitički enzimi)

(engl. *Glycoside Hydrolytic Family 61*)

Obitelj glikozidnih hidrolaza 61

GSH

Glutation

HGT

(engl. *Horizontal Gene Transfer*)

Horizontalni transfer gena

His-tag

(engl. *polyHistidine tag*)

Polihistidinska oznaka

HRP	
(engl. <i>HorseRadisch Peroxidase</i> )	Peroksidaza iz hrena
HPLC	
(engl. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> )	Visokoučinkovita tekućinska kromatografija
IMBT	
(engl. <i>Institute for Molecular Biotechnology</i> )	Institut za Molekularnu Biotehnologiju
IPTG	
(engl. <i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> )	Izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid
IUBMB	
(engl. <i>International Unit for Biochemistry and Molecular Biology</i> )	Međunarodna Jedinica za Biokemiju i Molekularnu biologiju
LB	
(engl. <i>Lysogeny Broth</i> )	Lizogeni medij
LPMO	
(engl. <i>Lytic Polysaccharide MonoOxygenases</i> )	Litičke polisaharidne monooksigenaze
OD	
(engl. <i>Optical Density</i> )	Optička gustoća
MS	
(engl. <i>Mass Spectrometry</i> )	Spektrometrija masa
NMR/EPR	
(engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance/Electron Paramagnetic Resonance</i> )	Nuklerna magnetska rezonanca/Elektronska paramagnetska rezonanca
mRNA	
(engl. <i>messenger RiboNucleic Acid</i> )	Glasnička ribonukleinska kiselina
MW	
(engl. <i>Molecular Weight</i> )	Molekulska masa
MUSCLE	
(engl. <i>MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation</i> )	Višestruka usporedba sekvenci pomoću log-očekivanja
PDB	
(engl. <i>Protein Data Bank</i> )	Baza podataka proteina
PCR	
(engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	Lančana reakcija polimeraze

PVF	
(engl. <i>PolyVinyl Fluoride</i> )	Polivinil fluorid
PRCx	
(engl. <i>PRofile Comparer program Extended</i> )	Prošireni program usporedbi profila
RNA	
(engl. <i>RiboNucleic Acid</i> )	Ribonukleinska kiselina
SDS-PAGE	
(engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyacrylAmide Gel Electrophoresis</i> )	Natrij dodecil-sulfat – poliakrilamid gel elektroforeza
SOC	
(engl. <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> )	SOC
TAE	
(engl. <i>Tris-Acetate-EDTA Buffer</i> )	Tris-Acetat-EDTA pufer
TBS	
(engl. <i>Tris-Buffered Saline stock solution</i> )	Tris-puferirana fiziološka otopina
TBST	
(engl. <i>Tris-buffered saline with 0.1% Tween®20 Detergent</i> )	Tris-puferirana fiziološka otopina/polisorbat
UV	
(engl. <i>Ultra Violet</i> )	Ultraljubičasto zračenje
VGT	
(engl. <i>Vertical Gene Transfer</i> )	Vertikalan transfer gena

## Sadržaj

<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1. Povijest proizvodnje i primjene biogoriva .....	1
2. Biogoriva – definicija i generacije .....	2
2.1. Definicija biogoriva .....	2
2.1.1. Generacije biogoriva .....	3
2.1.1.1. Biogoriva prve generacije .....	3
2.1.1.2. Biogoriva druge generacije .....	4
2.1.1.3. Biogoriva treće generacije .....	5
3. Biotehnološki aspekti korištenja lignoceluloznih biopolimera .....	6
3.1. Enzimaska razgradnja lignocelulozne biomase .....	7
3.1.1. Litičke polisaharidne monooksigenaze .....	9
3.1.1.1. Mehanizam enzimske reakcije i struktura LPMO .....	10
3.1.1.2. Bioraznolikost i biološke funkcije LPMO .....	15
<b>OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b> .....	<b>20</b>
<b>MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>21</b>
1. Materijali .....	21
1.1. Kemikalije i enzimi .....	21
1.2. Bakterijski sojevi .....	23
1.3. Plazmid pET22b(+) .....	24
1.4. Hranjive podloge za uzgoj bakterijskih sojeva <i>E. coli</i> TOP10 i <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	24
1.5. Pufferi .....	25
1.5.1. 50 mM K-fosfatni puffer, pH 7,4, za određivanje koncentracije proteina, pročišćavanje enzima i određivanje aktivnosti LPMO .....	25
1.5.2. 50 mM K-fosfatni puffer, pH 7,4 s imidazolom za pročišćavanje LPMO .....	25
1.5.3. Koncentrirani (50X) TRIS-Acetat-EDTA (TAE) puffer .....	26

1.5.4. Pufferi za <i>Western blot</i> .....	26
2. Metode .....	27
2.1. Bioinformatički alati i baze podataka .....	27
2.1.1. <i>Protein Data Bank</i> (PDB) .....	27
2.1.2. Incijativa 1000 biljnih transkriptoma .....	27
2.1.3. Program <i>MUSCLE</i> .....	28
2.1.4. Program <i>HMMER</i> .....	28
2.1.5. Program <i>MEGA</i> .....	28
2.2. Metode molekularne biotehnologije.....	29
2.2.1. Transformacija kemijski kompetentnih <i>E. coli</i> TOP10 stanica .....	29
2.2.2. Izolacija plazmidne DNA.....	31
2.2.3. Određivanje koncentracije plazmidne DNA.....	31
2.2.4. Restrikcija.....	32
2.2.5. Gel elektroforeza .....	33
2.2.6. Ekstrakcija DNA iz agaroznog gela i ligacija dobivenih fragmenata DNA.....	34
2.2.7. Sekvencijska analiza rekombinantnih DNA molekula.....	34
2.2.8 Transformacija kemijski kompetentnih <i>E. coli</i> BL21(DE3) stanica i uzgoj transformiranih stanica.....	35
2.2.9. Heterologna ekspresija proteina TeleLPMO i OseLPMO .....	36
2.2.10. Određivanje koncentracije proteina.....	37
2.2.11. Natrij dodecil-sulfat – poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE) .....	38
2.2.12. <i>Western blot</i> .....	39
2.2.13. Pročišćavanje protein brzom tekućinskom kromatografijom.....	40
2.2.14. Koncentriranje pročišćenog proteina i inkubacija ionima bakra .....	41
2.2.15. Metoda za određivanje aktivnosti proteina .....	42

<b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>44</b>
1. Korištenje bioinformatičkih alata i baza podataka.....	45
1.1. Primarna sekvenca i struktura Tma12.....	45
1.2. Odabir homolognih sekvenci.....	47
1.3. Konstrukcija filogenetskog stabla .....	48
1.4. LPMO iz paprati .....	51
1.4.1. Odabir sekvenci LPMO za rekombinantnu ekspresiju gena u <i>E. coli</i> .....	52
2. Umnažanje i restrikcija pET22b(+) plazmida i LPMO gena .....	55
2.1. Transformacija <i>E. coli</i> i izolacija pET22b(+) plazmida i LPMO gena.....	55
3. Ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih LPMO enzima .....	57
3.1. Kultivacija <i>E. coli</i> BL21(DE3) s pET22b(+)_ <i>TeleLPMO</i> ili <i>OseLPMO</i> i izolacija ekspimiranih LPMO.....	57
3.2. Pročišćavanje ekspimiranih LPMO i potvrda ekspresije ovih heterolognih proteina .58	
3.2.1. Pročišćavanje LPMO brzom tekućinskom kromatografijom.....	58
3.2.2. Potvrda ekspresije <i>TeleLPMO</i> i <i>OseLPMO</i> <i>Western blot</i> metodom.....	59
3.3. Određivanje enzimске aktivnosti <i>TeleLPMO</i> i <i>OseLPMO</i> .....	59
<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>63</b>
<b>ZAHVALE</b> .....	<b>64</b>
<b>POPIS LITERATURE</b> .....	<b>65</b>
<b>SAŽETAK</b> .....	<b>73</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>74</b>



## UVOD

### 1. Povijest proizvodnje i primjene biogoriva

Od početka 20. stoljeća ulažu se izuzetni naponi u unaprjeđenje tehnologija primjenjenih u rafinerijama nafte, ugljena i prirodnog plina, kako bi se postiglo brže i učinkovitije iskorištavanje ovih relativno dostupnih fosilnih sirovina. Velika biotehnološka i druga industrijska postrojenja koriste izniman energetski potencijal iskorištavanja fosilnih sirovina i to za dobivanje različitih proizvoda poput farmaceutskih proizvoda, finih kemikalija, nanomaterijala, detergenata, pesticida, biogoriva i drugih biotehnoloških proizvoda, a kako bi se zadovoljila rastuća svjetska potražnja za ovim proizvodima (Jeswani i sur., 2020). Međutim, fosilni resursi pripadaju u kategoriju neodrživih izvora energije, koji imaju negativne ekološke i ekonomske učinke. Korištenje ovih sirovina kao primarnog izvora energije na globalnoj razini rezultiralo je postupnim zagrijavanjem Zemljine površine i atmosfere i, posljedično, značajnim klimatskim promjenama. Naime, izgaranje fosilnih goriva uzrokuje povećanje udjela stakleničkih plinova u Zemljinoj atmosferi, prvenstveno dušikova oksida ( $N_2O$ ), ugljikova dioksida ( $CO_2$ ) i metana ( $CH_4$ ). Stoga je znanstveno i opće prihvaćeno stajalište da se emisija stakleničkih plinova treba znatno reducirati i tako usporiti zagrijavanje i druge posljedične klimatske pojave. Transport ljudi i dobara troši najviše fosilnih goriva i smatra se da emitira oko 15% stakleničkih plinova (Naik i sur., 2010). Stoga brojne nacionalne strategije daju snažnu potporu istraživanjima, razvoju i primjeni biogoriva, kao alternativnih i obnovljivih izvora energije.

Povijest upotrebe biogoriva može se pratiti od ranih godina automobilske industrije, kada je Rudolph Diesel koristio ulje kikirikija kao pogonsko gorivo za svoj prvi automobilski motor, pa sve do poslijeratnih godina prošloga stoljeća, kada je fosilno gorivo postalo znatno interesantnije, dostupnije i ekonomski učinkovitije. Tijekom naftne krize 70-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća brojne ekonomije Europskih država i Sjedinjenih Američkih Država (SAD) pokazuju interes i ulažu

u industriju proizvodnje biogoriva. Kroz dva desetljeća 21. stoljeća se više nego prije osvještava učinak biotehnoške i druge industrijske proizvodnje na klimatske promjene, pri čemu se biogoriva smatraju izvrsnom alternativom fosilnim gorivima, jer mogu biti ugljično neutralan izvor energije. Biogorivo se, između ostaloga, može proizvesti iz tzv. biljne biomase. Biljke koriste sunčevu energiju za redukciju CO<sub>2</sub> iz zraka (i tako se može umanjiti učinak stakleničkih plinova) i proizvodnju ugljikohidrata, kisika i sintezu biljne biomase. Jedan od načina korištenja biljne biomase u smislu pridobivanja energije je spaljivanje. Prilikom izgaranja biljne biomase oslobađa se toplinska energija (kao posljedica oksidacije ove biomase) i CO<sub>2</sub>, i time dolazi do recikliranja CO<sub>2</sub>, čime ovaj proces zapravo postaje ugljično neutralan. Više od 85% energije oslobođene izgaranjem biljne biomase može se koristiti za proizvodnju pare u parnim generatorima, pri čemu dolazi do oslobađanja više od 35% direktno upotrebljive električne energije. Ova je činjenica potaknula čelnike više od 60 država svijeta da pokrenu posebne programe za brže uključivanje biogoriva u kontinuiranu upotrebu i proizvodnju energije ([Somerville, 2007](#)).

## **2. Biogoriva - definicija i generacije**

### **2.1. Definicija biogoriva**

Biogorivo se može definirati kao bilo koje gorivo koje se proizvodi iz sirovina biljnog ili životinjskog podrijetla, a onda se ove sirovine nazivaju „biomasa”. Budući da se ovi tipovi sirovina (biomase) mogu nadomjestiti (obnoviti), smatraju se obnovljivim izvorima energije ([Selin i sur., 2021](#)). Suprotno od biogoriva su fosilna goriva (npr. nafta, ugljen i plin), koji se ne mogu nadomjestiti kao biomasa biljnog ili životinjskog podrijetla. Biogoriva se mogu svrstati u nekoliko generacija: biogoriva prve generacije, biogoriva druge i biogoriva treće generacije.

## 2.1.1. Generacije biogoriva

### 2.1.1.1. Biogoriva prve generacije

Biogoriva prve generacije predstavljala su značajan napredak u smislu smanjenja formiranja stakleničkih plinova i minimiziranja globalne ovisnosti o nafti. Međutim, nedostaci u proizvodnom procesu biogoriva prve generacije znatno otežavaju njihovu široku primjenu. Naime, ova se biogoriva proizvode iz sirovina kao što su različiti izvori jednostavnih ugljikohidrata, zatim škrobne sirovine i biljna ulja. Djelovanjem odabranih mikroorganizama i/ili enzima iz ovih se sirovina u bioprocusu mogu dobiti etanol, propanol i butanol (Dahman i sur., 2019). Od posebnog je interesa dobivanje tekućih biogoriva prve generacije i to zbog postojeće infrastrukture, koja je prilagođena korištenju tekućih (bio)goriva. Značajan je potencijal biogoriva prve generacije za njihovo korištenje u transportu, kako je to predviđeno strateškim okvirima vlada različitih tehnološko razvijenih zemalja. Međutim, proizvodnja ovih sirovina iziskuje korištenje velikih površina plodnog zemljišta i znatne količine vodenih resursa, a čija primjena prvenstveno treba biti namijenjena proizvodnji hrane i drugih proizvoda primarno potrebnih za održavanje kvalitete života čovjeka (Sims i sur., 2010). Zakonski okviri brojnih država propisuju korištenje bioetanola u mješavini s klasičnim (fosilnim) gorivima za pogon transportnih vozila, no i dalje relativno niska cijena fosilnih goriva znatno otežava ekonomsku učinkovitost uporabe baš ovih (bio)goriva prve generacije, pa tako i opravdanost biorafinerija.

Ukoliko se biogoriva prve generacije dobivaju iz biljnih ulja i kukuruznih (škrobnih) sirovina, nekoliko je osnovnih razloga koji bitno ograničavaju ili čak poništavaju prednosti primjene baš ovih biogoriva. Naime, za uzgoj kukuruza potrebna su fosilna goriva i to za proizvodnju gnojiva, transport sirovina i destilaciju etanola, koji se dobiva u bioprocusu konverzije ovako proizvedenih sirovina. Kod uzgoja uljarica potreba za zemljištem izazvala je prenamjenu velikih površina u tropskim krajevima u plantaže za uzgoj ovih biljaka, čime se direktno utječe na bioraznolikost ovih područja (Jeswani i sur., 2020). Dakle, ukoliko se želi optimizirati proces proizvodnje biogoriva

prve generacije, treba uspostaviti ravnotežu između (i) potražnje za ovim biogorivom i (ii) proizvodnje sirovina za proizvodnju ovoga biogoriva, ali bez (1) prenamjene obradivnog zemljišta, (2) korištenja sirovina koje se inače koriste u proizvodnji prehrambenih proizvoda, i (3) utjecaja na bioraznolikosti na određenom geografsko-klimatskom području. Potrošnja energije pri proizvodnji biogoriva prve generacije također se mora uzeti u obzir pri procjeni ekonomske učinkovitosti bioprocesa za proizvodnju biogoriva prve generacije. Uglavnom, industrijska proizvodnja ovih biogoriva je ekonomski nepovoljnija od proizvodnje fosilnih goriva, nadmašuje emisiju stakleničkih plinova i površinu (plodnog) zemljišta potrebnu za uzgoj sirovina, čije je korištenje u prehrambenoj industriji zapravo primarno. Nadalje, osim troškova, proizvodnja biogoriva prve generacije ima veći nepovoljan utjecaj na okoliš, čime se poništavaju benefiti primjene ovih goriva. Pobrajeni problemi su identificirani kao glavni čimbenici koji onemogućavaju primjenu biogoriva prve generacije, zbog čega je potrebno istražiti i primijeniti inovativne i učinkovitije načine pridobivanja energije, kao što su npr. biogoriva druge generacije.

#### **2.1.1.2. Biogoriva druge generacije**

Biogoriva druge generacije se mogu dobiti konverzijom tzv. biomase/sirovina niže vrijednosti od sirovina koje se primarno koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Sirovina niže vrijednosti je obično biomasa biljnog podrijetla, koja ima visok udjel neprobavljivog polimernog ugljikohidrata celuloze. Takva vrsta (biljne) biomase je nusproizvod drvne industrije, zatim nusproizvod u preradi šećerne trstike, kukuruznih i drugih sirovina. Ova se biomasa može uzgajati na zemljištu niske kvalitete (Sims i sur., 2010). Biogoriva druge generacije (celulozna biogoriva) mogu se dobiti iz lignocelulozne biomase, ali i iz čvrstog komunalnog otpada, koji je također sirovina za proizvodnju biogoriva druge generacije, a kao krajnji proizvod može se proizvesti biodizel, bioetanol, gorivo za zrakoplove, ali i vrijedne biokemikalije i drugi proizvodi (Nguyen i sur., 2017).

Celulozna biogoriva mogu se proizvesti kemijskim, biotehnološkim i termokemijskim procesima. Od posebnog je interesa biotehnološka konverzija lignoceluloze, koja se obično sastoji od tri osnovna koraka, a to su: predobrada sirovine, hidroliza lignoceluloze do jednostavnih fermentabilnih supstrata i fermentacija hidrolizom dobivenih jednostavnih ugljikohidrata do, uglavnom, etanola. Za predobradu sirovine najčešće se koriste kiseline. Ovim se predtretmanom slabi stanična stijenka biljnih stanica i to tako da se zapravo oslabi struktura lignina i hemiceluloze. Nakon toga se obično provodi hidroliza lignoceluloze odnosno biotehnološka konverzija celuloze do jednostavnih ugljikohidrata. Hidroliza celuloze se može provesti pročišćenim enzimima ili cjelovitim stanicama mikroorganizama, koji iskazuju hidrolitičku aktivnost. Ugljikohidrati dobiveni hidrolizom celuloze se koriste u fermentaciji tj. proizvodnji etanola kao konačnog proizvoda ([Horn i sur., 2012](#)). Proizvodnja i korištenje biogoriva druge generacije nadilazi neke od problema proizvodnje i uporabe biogoriva prve generacije. U biotehnološkoj proizvodnji biogoriva druge generacije postižu se veći prinosi i smanjena je emisija stakleničkih plinova nego kod biogoriva prve generacije.

### **2.1.1.3. Biogoriva treće generacije**

Biogoriva treće generacije se mogu dobiti iz biomase algi. U usporedbi sa sirovinama tj. biogorivima prve generacije, jako je važno da se biotehnološkom konverzijom ove biomase može dobiti biogorivo uz puno veći prinos ([Brennanna i sur., 2010](#)). Budući da se algalna biomasa može proizvesti u vodenim staništima u kojima se nužno ne proizvode sirovine/biomasa za proizvodnju prve i druge generacije biogoriva, ova je biomasa svrstana u kategoriju jeftinih, visokoenergetsko učinkovitih i potpuno obnovljivih izvora energije. Tako se algalna biomasa može uzgajati u već korištenoj vodi i to slanoj i slatkoj vodi, čime se bitno smanjuje potreba za korištenjem pitke vode, koja je primarno potrebna za osnovne životne potrebe čovjeka. Najznačajnija karakteristika algalne biomase je da kod uzgoja autotrofnih vrsta algi nisu potrebni dodatni izvori ugljika i

energije, jer ove alge koriste atmosferski CO<sub>2</sub> kao izvor ugljika i apsorbiraju sunčevu svjetlost kao energiju. Ovdje valja nanovo istaknuti da se na ovaj način reducira parcijalni tlak CO<sub>2</sub> u atmosferi, pa se uzgojem autotrofnih algi postiže dvostruki učinak (smanjenje udjela CO<sub>2</sub> u atmosferi i nema potrebe za dodatnim izvorom ugljika i energije). U stanicama algi se CO<sub>2</sub> konvertira u ugljikohidrate, koji se onda mogu biotehnološki prevesti do etanola tj. biogoriva. Uzgoj heterotrofnih algi, koje trebaju dodatni izvor ugljika i energije, također se optimira u cilju proizvodnje visokovrijednih biokemikalija i biodizela (John i sur., 2011). Dakle, biogoriva treće generacije ne interferiraju sa osnovnim životnim potrebama čovjeka i, od ove tri generacije biogoriva, imaju najmanje učinka na ekosustave (Subhadra i sur., 2010).

Ipak, najveći dio svjetskog znanstvenog potencijala usmjerava svoja istraživanja na iskorištavanje biljne biomase, što nije nimalo laka zadaća. Naime, razgradnja u prirodi najdostupnijih biopolimera je prva prepreka u razvoju održive biotehnološke proizvodnje farmaceutika i drugih visokovrijednih biokemikalija iz biljne biomase.

### **3. Biotehnološki aspekti korištenja lignoceluloznih biopolimera**

Suha tvar biljne biomase načinjena je od lignoceluloze i predstavlja najobilniju sirovinu dostupnu na Zemlji (Binod i sur., 2019). Lignoceluloza se sastoji od ugljikohidratnih biopolimera celuloze i hemiceluloze, koji su čvrsto vezani za neugljikohidratni polifenolni biopolimer lignin. Upotreba biljne biomase kao sirovine u biotehnološkim procesima, posebice u bioprocima proizvodnje biogoriva, može se poboljšati do visoke učinkovitosti ukoliko se primjene mikroorganizmi i/ili enzimi koji mogu razgraditi ove polimere, npr. celulaze. Bioprocima koje kataliziraju enzimi imaju niske energetske zahtjeve, ekološki su prihvatljivi te su visoko specifični. Zbog kompleksne građe lignoceluloznih sirovina, enzimska razgradnja ovih polimera u samo jednom koraku obično nije dovoljno učinkovita (Hemsworth i sur., 2015). Zapravo, enzimska

razgradnja lignoceluloznih sirovina zahtijeva nekoliko koraka i korištenje nekoliko različitih tipova enzima za prevođenje ovih supstrata u fermentabilne ugljikohidrate.

Stanična stijenka biljnih stanica uključuje celulozne mikrofibrile obavijene matriksom hemiceluloze, lignina i pektina. Pod pojmom hemiceluloza podrazumijeva se široka skupina složenih glikana, koji čine glavnu komponentnu staničnih stijenki biljnih stanica i jedna je od najvažnijih sirovina za proizvodnju biogoriva (Zhang i sur., 2021). Hemiceluloza pripada skupini razgranatih polisaharida, koji se sastoje od 500 do 3000 podjedinica. Pektini čine skupinu heterogenih strukturnih biljnih polisaharida, koji biljnoj stijenci daju fluidnost, a većinom su sastavljeni od jedinica galakturonske kiseline. Lignin je neugljikohidratni, relativno hidrofoban i aromatičan heteropolimer, koji je građen od *p*-kumaril, koniferil i sinapil alkohola, a biljnoj stanici daje izuzetnu čvrstoću. Celuloza je kompleksni nerazgranuti ravnolančani polisaharid, koji se sastoji od glukozilnih podjedinica, koje su međusobno povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom. Celuloza je osnovna komponenta staničnih stijenki biljnih stanica i čini više od 33% strukture biljne stanice. Nerazgranati hemicelulozni lanci i površina celuloznih mikrofibrila povezani su vodikovim vezama, dok su razgranati lanci hemiceluloze povezani esterskim vezama s fenolnim kiselinskim podjedinicama lignina (Chundawar i sur., 2011). Celuloza, hemiceluloza, pektin i lignin formiraju čvrste makrofibrile u stijenci biljnih stanica, koji onemogućuju izlaganje pojedinačnih celuloznih lanaca na površini stanične stijenke, a što celulozu čini vrlo otpornom na razgradnju različitim kemijskim reagensima i enzimima.

### 3.1. Enzimska razgradnja lignocelulozne biomase

Potpuna razgradnja lignocelulozne biomase do odgovarajućih dimera i monomera, koji se mogu koristiti za fermentativnu proizvodnju etanola, zahtijeva postupnu aktivnost cijelog spektra visokospecifičnih enzima (Binod i sur., 2019). Celulaze pripadaju glukozil hidrolazama, a

kataliziraju razgradnju celuloze. Potpuna razgranja celuloznih supstrata na monomerne podjedinice zahtijeva simultanu enzimsku aktivnost u dvije faze - primarnu i sekundarnu. Primarna faza obuhvaća djelovanje (a) endocelulaza koje nasumično kataliziraju cijepanje  $\beta$ -1,4-glikozidnih veza u celulozi i u ovako kataliziranoj reakciji nastaju oligosaharidi, i (b) celobiohidrolaza, koje kataliziraju cijepanje oligosaharidnih lanaca, koji su dobiveni djelovanjem endocelulaza, do celobioze (Horn i sur., 2012). Sekundarna faza razgradnje celuloze obuhvaća djelovanje  $\beta$ -glukozidaza, koje razgrađuju glikozidne veze u  $\beta$ -D-glukozidima i oligosaharidima do pojedinačnih glukoznih podjedinica.

Učinkovitost enzimske razgradnje celuloze znatno varira i to prvenstveno zbog heterogene strukture lignocelulozne biomase, kao i zbog inhibicije aktivnosti enzima ligninom, koji je ireverzibilno vezan za celulozu (Jin i sur., 2012). Vezanje lignina hidrofobnim interakcijama za celulozne lance, direktno utječe na aktivnost enzima, koji su se prethodno specifično vezali na ove polimerne supstrate. Uspješnost enzimski katalizirane razgradnje celuloze ovisi o kristaliničnoj strukturi celuloze, stupnju polimerizacije celuloze kao i raspoloživosti slobodne površine ovoga supstrata za vezanje enzima (Fan i sur., 2017). Većina istraživanja potvrđuje relativno brzu početnu enzimski kataliziranu razgradnju celuloze, koja se nedugo nakon vezanja enzima na supstrat i/ili sirovinu usporava i tako ostane nepotpuna. Smatra se da je uzrok nepotpune razgradnje celuloze početna amorfnost struktura ovoga supstrata, koja se javlja kao posljedica predtretmana lignocelulozne biomase, nakon kojeg se celuloza postupno kristalizira i to zbog ireverzibilnog vezanja lignina na celulozu (Mansfield i sur., 2003). Zbog svega ovdje navedenog, optimizacija sastava kombinacije različitih enzima za razgradnju lignoceluloznih biopolimera predstavlja izazov, posebice u proizvodnji biogoriva druge generacije.



### 3.1.1. Litičke polisaharidne monooksigenaze

Pedesetih godina 20. stoljeća pretpostavljalo se da razgradnja celuloznih sirovina zahtijeva nehidrolitičku komponentu, koja bi narušila kompaktnu strukturu ovih polimernih supstrata i/ili sirovina, čime bi se povećala dostupnost supstrata za enzimsku razgradnju (Reese i sur., 1950). Početkom 1990-ih godina okarakterizirane su prve polisaharidne monooksigenaze iz funga, za koje se pretpostavljalo da sudjeluju u razgradnji celuloze (Raguz i sur., 1992). Ove su fungalne polisaharidne monooksigenaze dodijeljene obitelji 61 glikozidnih hidrolitičkih enzima (GH61), kako je to opisano u bazi podataka u kojoj su pohranjeni podaci o katalitičkim modulima i enzimima koji kataliziraju razgradnju, modifikaciju ili formiranje glikozidne veze (engl. *the Carbohydrate-Active enZymes Database*, CAZy). Tako je iz funga *Trichoderma reesei* izolirana endonukleaza 4 (TrCel61A), koja iskazuje hidrolitičku aktivnosti prema celulozi (Karlsson i sur., 2001). Poravnanjem primarnih struktura enzima GH61 i TrCel61A pokazana je njihova strukturalna podudarnost (Vaaje-Kolstad i sur., 2005). Drugo nezavisno istraživanje je pokazalo da Gram-negativna bakterija *Serratia marcescens* proizvodi enzim CBP21, koji može razgraditi kristalinični polisaharid hitin, analog celuloze, i na taj način poboljšati pristupačnost ovoga supstrata i omogućiti aktivnost drugih enzima u razgradnji hitina (Brown i sur., 2008). Nakon celuloze, hitin je drugi najčešći kompleksni visokomolekularni građevni polisaharid i glavni je sastojak staničnih stijenki gljiva, lišajeva, egzoskeleta člankonožaca, vanjske ljuštore mekušaca i viših koljena drugih beskralježnjaka, a građen je od *N*-acetilglukozaminskih podjedinica povezanih  $\beta$ -1,4 vezom.

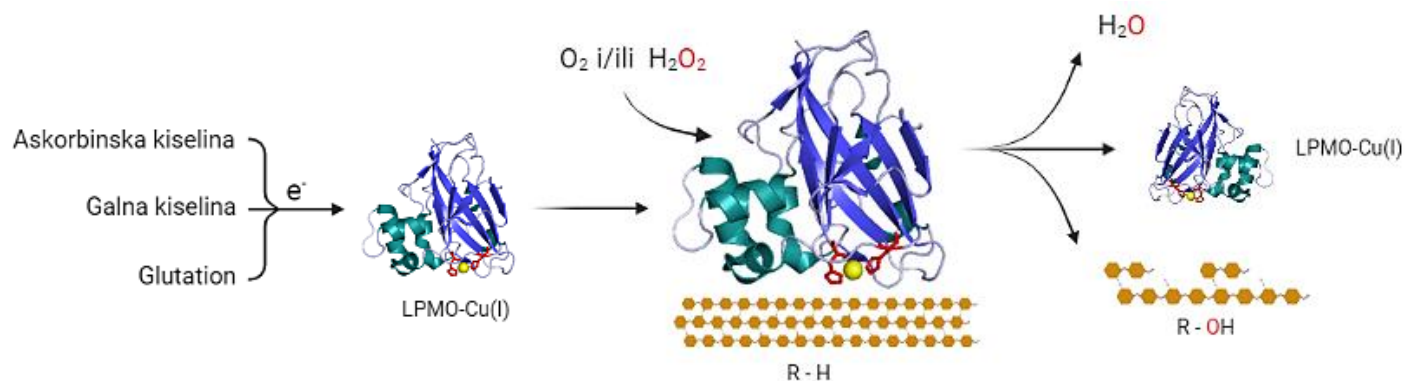
Primjena metoda nove generacije sekvencioniranja gena dovela je do brojnih otkrića vezanih uz genome, transkriptome i sekretome funga, koji su povezani sa razgradnjom celuloze. Tako je, osim u *T. reesei*, okarakterizirana ekspresija i sekrecija enzima iz obitelji GH61 i kod drugih funga i to ne samo celulaza, već i drugih enzima, koji sudjeluju u potpunoj razgradnji celuloze (Beeson i sur., 2019). Identifikacija ekstracelularnih donora elektrona, koji mogu aktivirati

enzime iz obitelji GH61, povezuje ove enzime s reakcijama oksidativne razgradnje celuloze. Nadalje su okarakterizirani ioni bakra kao funkcionalni dio aktivnog mjesta enzima iz obitelji GH61, ali je i utvrđena činjenica da ovi enzimi mogu katalizirati reakcije razgradnje supstrata na reduktivnim i nereduktivnim krajevima polisaharidnih lanca. Vaaje-Kolstad i suradnici (2010) su potvrdili da upravo bakterijski enzim CBP21 oksidativno depolimerizira hitin i to u prisutnosti donora elektrona (reducensa) i molekuskog kisika. Zbog toga se naziv enzima iz obitelji GH61 i CBM21 mijenja u novi naziv - litičke polisaharidne monooksigenaze (engl. *Lytic Polysaccharide MonoOxygenases*, LPMO), koje su svrstane u obitelji enzima pomoćne aktivnosti (engl. *Auxiliary Activity enzymes*; AA). Najnovija klasifikacija razvrstava LPMO u osam obitelji AA enzima i ovi se enzimi mogu pronaći u različitim granama stabla života - od virusa (AA10, 15), prokariota (AA10), funga (AA9, 11, 13, 14, 16, 17) do protista i životinja (AA15).

### 3.1.1.1. Mehanizam enzimske reakcije i struktura LPMO

Prema svojoj aktivnosti LPMO se svrstavaju u skupinu oksidoreduktaza (IUBMB, 2017). Oksidoreduktaze su ključni enzimi u metaboličkim procesima svih funkcionalnih stanica, a kataliziraju prijenos elektrona s donora elektrona (reducens) na akceptor elektrona (oksidans) i obično za svoju aktivnost trebaju kofaktor. Kofaktor u aktivnom mjestu LPMO je ion bakra, kojeg koordiniraju dva bočna lanca histidina ovoga enzima (Hemsworth i sur., 2014). Prema svojoj aktivnosti, LPMO se mogu podijeliti na dehidrogenaze i oksigenaze. U prisustvu vanjskog donora elektrona, LPMO kataliziraju hidroksilaciju jednog od ugljikovih atoma susprata - C1 ili C4, koji sudjeluje u glikozidnoj vezi, što dovodi do pucanja ove veze i to reakcijom eliminacije. Oksidacija C4 rezultira formiranjem 4-ketoheksoze i to na nereducirajućem kraju supstrata, dok se oksidacijom C1 dobiva aldonska kiselina na reducirajućem kraju susprata, a što može rezultirati formiranjem topljivih oligosaharida ukoliko je supstrat polimerni ugljikohidrat (Frommhagen i sur., 2018). Za razliku od ostalih enzima koji sudjeluju u razgradnji jednostrukih polisaharidnih lanaca,

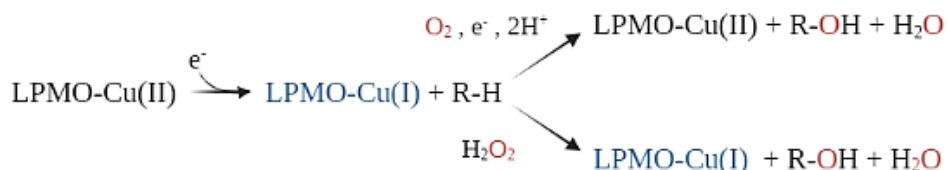
LPMO iskazuju aktivnost prema umreženim polisaharidnim lancima u kristaliničnom statusu, npr. celuloze, što dovodi do narušavanja strukture ovih kompleksnih supstrata i tako ih čine dostupnijim za druge enzime (Slika 1.).



**Slika 1.** Shematski prikaz razgradnje biopolimera koju katalizira LPMO

U reakcijama koje kataliziraju LPMO potreban je vanjski donor elektrona odnosno reducens za aktivaciju kosupstrata ( $O_2$  ili  $H_2O_2$ ), a ova je aktivacija kosupstrata nužna za oksidaciju supstrata (npr. celuloze). Danas se uobičajeno kao reducens koristi askorbinska kiselina, no mogu se koristiti i drugi donori elektrona, npr. glutacion ili željezov sulfat (Vaaje-Kolstad, 2010), zatim galne kiseline (Loose i sur., 2018) ili reakcije koje kataliziraju fungalne celobioza dehidrogenaze (Loose i sur. 2016). Mehanizam reakcije koju katalizira LPMO pretpostavlja potrebu za dvama elektronima, koji se trebaju pribaviti od vanjskog donora elektrona. U početku se smatralo da reducens može aktivirati jedino molekularni kisik (kosupstrat) te da se tijekom reakcije koju katalizira LPMO kao produkt redukcije kosupstrata ( $O_2$ ) formira  $H_2O_2$ . Do formiranja  $H_2O_2$  dolazi zbog prijenosa elektrona s vanjskog donora elektrona preko (reduciranog) LPMO do krajnjeg akceptora elektrona -  $O_2$ . Nekoliko istraživanja je pokazalo da LPMO kao kosupstrat mogu koristiti  $H_2O_2$  umjesto  $O_2$  (Bissaro i sur., 2017; Kuusk i sur., 2019,

Hangasky i sur., 2018) te su do danas predložena dva mehanizma oksidacije supstrata s pomoću LPMO kada je kosupstrat  $O_2$  ili  $H_2O_2$  (Slika 2.).



**Slika 2.** Mehanizmi hidroksilacije polisaharidnih supstrata, koju katalizira LPMO, u prisutnosti kosupstrata -  $O_2$  i/ili  $H_2O_2$  (prema Eijnsink i sur., 2019)

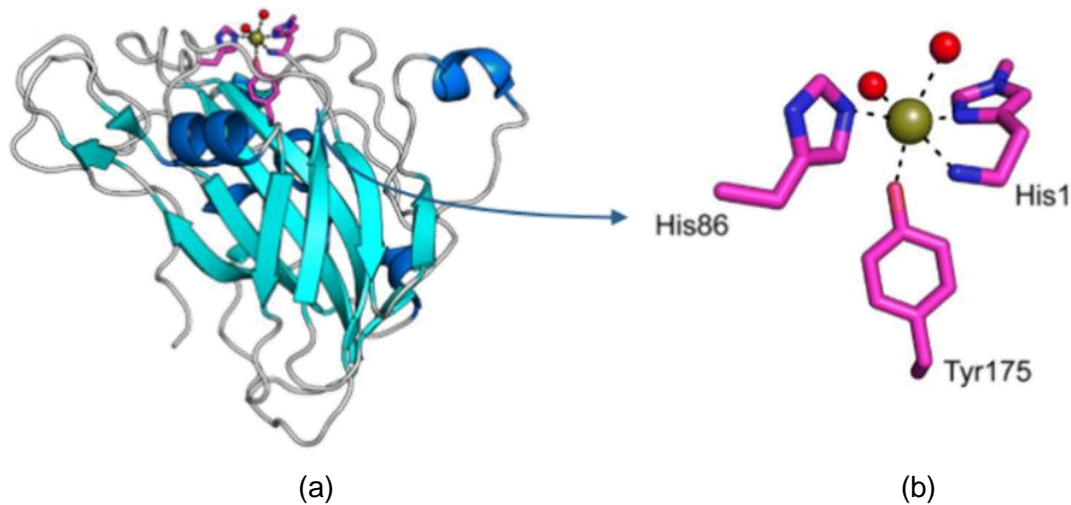
Naime, u fungalnim sekretomima su identificirane LPMO, koje se eksprimiraju zajedno s enzimima koji proizvode  $H_2O_2$ , pa se ovako proizvedeni  $H_2O_2$  može koristiti kao akceptor elektrona u LPMO kataliziranim reakcijama. Ključna razlika između korištenja dva moguća kosupstrata ( $O_2$  ili  $H_2O_2$ ) jest potreba za ekvivalentima redukcije, koja može predstavljati bitan faktor u optimizaciji industrijske primjene LPMO. Enzimske reakcije s molekulskim kisikom kao kosupstratom imaju ekvimolaran odnos reducensa i formiranog produkta. U ovim reakcijama najprije se odvija redukcija  $Cu^{2+}$  u  $Cu^+$  u aktivnom mjestu LPMO i to kako bi se dovršio jedan katalitički ciklus, u kojem se  $Cu^+$  reoksidira do  $Cu^{2+}$ . Nakon toga, nanovo je potrebno reducirati  $Cu^{2+}$  u  $Cu^+$  u aktivnom mjestu, kako bi započeo naredni katalitički ciklus. Kod reakcija s  $H_2O_2$  kao kosupstratom potrebna je samo početna redukcija iona bakra ( $Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$ ) u aktivnom mjestu, koji ostaje u ovom reduciranom statusu ( $Cu^+$ ) i tako može sudjelovati u narednom katalitičkom ciklusu bez potrebe za novim redukcijskim korakom nakon hidroksilacije supstrata (npr. celuloze) (Kuusk i sur., 2018).

Nedavno istraživanje je pokazalo da je katalitička učinkovitost reakcija s  $H_2O_2$  do dva reda veličine veća od reakcija s  $O_2$  (Kuusk i sur., 2018). Nadalje, Bissaro i sur. (2017) su pokazali da

se reakcije koje katalizira LPMO mogu odvijati i bez prisutnosti  $O_2$ . U eksperimentima koji su provedeni s različitim koncentracijama izotopa  $H_2^{18}O_2$  je pokazano da kisik, kojega ovaj enzim koristi kao kosupstrat, potječe upravo iz  $H_2O_2$ , čak i u uvjetima kad je koncentracija dostupnog  $O_2$  bila znatno veća od koncentracije  $H_2^{18}O_2$ , koji je dodan u reakcijsku smjesu. Ovdje bi se moglo zaključiti da je formiranje  $H_2O_2$  limitirajući faktor u reakciji koju katalizira LPMO. Poznat je primjer fungalne LPMO, koja je izolirana iz funga *Aspergillus fumigatus*, a kod koje je dokazana peroksidazna aktivnost LPMO uz potpuni izostanak monooksigenazne aktivnosti ovoga enzima (Rieder i sur., 2021). Međutim, kod visokih koncentracija  $H_2O_2$  enzim se oksidira i znatno se smanjuje stabilnost ovoga enzima. Ipak, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u cijelosti okarakterizirala ova enzimska reakcija.

Do danas je okarakterizirano više od 40 struktura različitih LPMO, koji pripadaju različitim obiteljima AA enzima. Usprkos niskoj homologiji primarnih sekvenci ovih enzima i to čak unutar iste obitelji, do sada opisani enzimi imaju visoko očuvane druge strukturne karakteristike, npr. tercijarne strukture. Tercijarna struktura LPMO je nalik strukturi imunoglobulina, a karakterizira ju od 7 do 10  $\beta$ -nabranih ploča, zatim niz kratkih petlji koje se sužavaju do konusnog vrha LPMO nasuprot površinski smještenom aktivnom mjestu. Strukturna raznolikost ovih enzima potječe od  $\alpha$ -uzvojnica i drugih petlji, koje povezuju  $\beta$ -nabrane ploče. Opisane razlike vode do varijacija u dimenzijama i topologijama površinskog vezanja ovih enzima na supstrate i/ili sirovine, koje imaju različite polimorfne polisaharidne strukture. U kristalnoj strukturi TrCel61A je očuvano visoko karakteristično površinski smješteno aktivno mjesto s mjestom za vezanje kofaktora. Ovo se aktivno mjesto razlikuje od aktivnih mjesta drugih celulaza, koje imaju oblik tunela ili rascjepa (Karkehabadi i sur., 2008). Aktivno mjesto LPMO enzima izloženo je na gotovo ravnoj visoko polarnoj površini dimenzija od oko 40 x 30 Å, čime je zapravo omogućeno vezanje enzima na voluminozne (polimerne) supstrate (Hemsworth i sur., 2013). Glavno obilježje LPMO strukture jest mjesto vezanja kofaktora - iona bakra, koje formiraju dva histidinska bočna lanca i to tako da

je kofaktor izložen okolini LPMO, a zapravo se nalazi u središtu jedne od ravnih površina ovoga enzima, čime je omogućeno vezanje biokatalizatora na supstrat/sirovinu (Slika 3.).



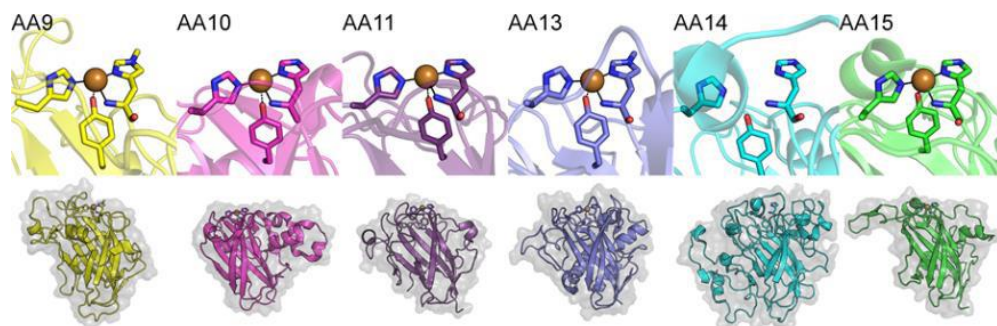
**Slika 3.** Trodimenzionalna struktura LPMO iz *Thermoascus aurantiacus* (TaLPMO9A), koji pripada AA9 obitelji: (a) kristalna struktura i (b) katalitički centar s ionom bakra, kojega koordiniraju dva histidinska bočna lanca (His1 i His86) i jedan bočni lanac tirozina (Tyr175) (prema Hoell i sur., 2019).

Heterogenost i netopljivost biopolimernih supstrata/sirovina onemogućuje korištenje uobičajenih laboratorijskih postupaka i metoda za definiranje mehanizama prema kojima LPMO formiraju komplekse sa supstratima. Klasične metode za određivanje interakcija enzima sa supstratima, kao što su to npr. kombinacija nuklearne magnetske rezonancije i elektronske paramagnetske rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance/Electron Paramagnetic Resonance*, NMR/EPR; Simmons i sur., 2017), zatim kristalografija X zraka (engl. *X-ray crystallography*; Tandrup i sur., 2020) i *in silico* modeli i analize, uspješno se koriste za potvrđivanje interakcija LPMO i kratkolančanih supstrata odnosno oligosaharida. Zbog limitacija ovih metoda, okarakteriziran je mehanizam razgradnje oligosaharida i to hidrosilacijom C4 ugljika supstrata u reakcijama koje kataliziraju dvije LPMO iz AA9 obitelji. Nažalost, ova saznanja

ne upućuju na strukturalne značajke enzima koji nativno razgrađuju kristalinične polisaharide. Frandsen i sur. (2016) su uspješno prikazali kristalnu strukturu LPMO iz *Lentinus similis* i *Collariella virescens*, koji pripadaju AA9 obitelji, i to u interakciji s celo-oligosaharidnim supstratima.

### 3.1.1.2. Bioraznolikost i biološke funkcije LPMO

**LPMO iz bakterija i funga.** S obzirom na najnovija saznanja o ovoj skupini enzima, pretpostavilo se da su geni, koji kodiraju za LPMO enzime koji iskazuju celulaznu aktivnost, zastupljeni u carstvu funga. Određeni saprofitni fungi imaju i do 30 gena koji kodiraju za različite tipove LPMO (Levasseur i sur., 2013). Ne zna se puno o srodnim genima u ostalim carstvima. Najnovija istraživanja pokazuju da ovi enzimi imaju raznolike biološke funkcije te da sudjeluju u brojnim biološkim procesima, poput faktora virulentnosti patogenih bakterija (Askarian i sur., 2021) ili u razvojnem procesu kukaca (Bissaro i sur., 2022). Većina istraživačkih skupina je fokusirala svoj rad na LPMO iz funga i bakterija, no niska podudarnost njihovih primarnih sekvenci, različiti afiniteti prema supstratima kao i postojanje ovih enzima u nekoliko klada stabla života ukazuje da se ovaj opseg istraživanja (fungi i bakterije) svakako treba prošiti (Slika 4.).



**Slika 4.** Različitost kristalnih struktura LPMO iz različitih AA obitelji (AA9-AA11 i AA13-AA15) s očuvanom strukturom aktivnog mjesta (prema Tandrup i sur., 2018)



Tijekom analize genoma različitih fungalnih vrsta je utvrđeno da vrste koje imaju gene koji kodiraju za različite hidrolitičke enzime, također imaju gene koji kodiraju za LPMO enzime (Frandsen i sur., 2016). Do sada nije izolirana fungalna vrsta s celulaznom aktivnošću, koja nema LPMO, što zapravo ukazuje da su LPMO ključni enzimi za razgradnju stijenki biljnih stanica. Osim u razgradnji celuloznih supstrata, LPMO mogu biti uključeni u patogenost različitih fungalnih vrsta. Tako npr. *Magnaporthe oryzae*, jedna od nekoliko najštetnijih biljnih patogena (Dean i sur., 2012), ugrožava iskorištavanje usjeva zbog smanjenja njihova prinosa. Ova makro gljiva specijaliziranim stanicama napada stijenku biljnih stanica i usljed toga se formira visoki turgor u napadnutim biljnim stanicama i, usljed povišenoga turgora, puca stijenka stanica. Pri tome LPMO iz *M. oryzae* inaktivira imunost sustav biljke i to tako da inficirana biljka ne može prepoznati ugljikohidrate iz ove fungalne vrste i kreirati svoj imunostni odgovor (Li i sur., 2020).

Analizom genoma i proteoma bakterija utvrđeno je da bakterijske LPMO mogu razgraditi celulozne supstrate/sirovine. Visoka je sličnost strukture ovih bakterijskih i fungalnih enzima, ali nisu i sekvencionalni homolozi. Do danas nije utvrđeno dijele li bakterijske i fungalne LPMO zajedničkog pretka i je li njihovo prisustvo u različitim vrstama posljedica horizontalnog tranfera gena ili pak konvergentne evolucije. Istraživanja provedena na različitim bakterijskim LPMO, kao što je to LPMO iz *Paenibacillus larvae* (Garcia-Gonzales i sur., 2013) ili LPMO iz *Vibrio cholerae* (Yoon i sur., 2019), pokazala su da ovi enzimi imaju značajnu ulogu u patogenosti i virulentnosti ovih opasnih vrsta mikroorganizama. S obzirom na ovu činjenicu, ovi su enzimi zapravo mete za sintezu učinkovitih inhibitora protiv spomenutih patogena. Istraživanje provedeno s *P. larvae*, koji može inficirati i usmrtiti larve medonosnih pčela, rezultiralo je otkrićem da LPMO iz obitelji AA10 djeluje kao faktor virulencije i to na način da oslabljuje i razgrađuje intestinalnu membranu, čime je omogućen prodor bakterijskih toksina u epitelne stanice intestinalnog sustava ličinki pčela (Garcia-Gonzalez i sur., 2014). Kada su ličinke pčela inficirane s *P. larvae*, kojima je deletiran LPMO kodirajući gen, preživljavanje ličinki je bilo veće od 95% pri čemu je intestinalna membrana



ostala u potpunosti očuvana. Ovaj eksperiment sugerira da LPMO predstavljaju glavni faktor virulentnosti ove opasne bakterije ([Garcia-Gonzalez i sur., 2014](#)). Neovisno istraživanje rezistentnosti bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na brojne antibiotike, koja može uzrokovati upalu pluća ili sepsu kod čovjeka, pokazalo je da je LPMO iz obitelji AA10 faktor virulentnosti i to tako da omogućava preživljavanje bakterija u krvi čovjeka. Mutanti bez gena koji kodira za LPMO su imali znatno manji postotak preživljavanja kao i otpornost na imunski odgovor čovjeka ([Askarian i sur., 2021](#)).

**LPMO iz paprati.** Paprati se svrstavaju u razred *Polypodiopsida*, razred vaskularnih biljaka bez cvijeta, koje se razmnožavaju sporama i posjeduju pravo korijenje, stabljiku i složene listove. Paprati čine jednu od najstarijih biljnih vrsta, čije podrijetlo seže od prije više od 350 milijuna godina. Trenutno je poznato oko 10 500 različitih vrsta paprati, no s obzirom na neistraženost brojnih tropskih područja, procjenjuje se da je pravi broj ovih vrsta oko 15 000 ([Tyron, 1982](#)). Paprati se izrazito razlikuju po svojoj veličini, obliku i načinima reprodukcije. Veličina biljaka varira od 1,0 - 1,2 cm visine kod najmanjih do sada poznatih vrsta, pa sve do 25 m visine kod tzv. paprati 'drveća'. Paprati su zadržale primitivni životni ciklus, koji uključuje dvije odvojene i više ili manje nezavisnih generacija. Vodene paprati karakteriziraju jedan od najkraćih životnih ciklusa među biljkama i ove paprati imaju brojne mutacije u svome genomu, što ih čini pogodnim modelnim makroorganizmima za istraživanje ([Rathinasabapathi, 2006](#)). U novije vrijeme paprati nemaju ekonomski značaj i samo se nekolicina vrsta paprati koristi u medicinske svrhe. Arktik i Antarktik nastanjuju samo nekolicina različitih vrsta paprati, dok se npr. na području Kostarike može identificirati više od 900 vrsta paprati tj. dvostruko više u usporedbi s područjem Sjeverne Amerike. U tropskim područjima paprati čine većinski dio vegetacije te se na relativno maloj površini može identificirati više od 100 različitih vrsta paprati. Rast paprati iz određenih obitelji limitiran je isključivo na tropska područja, dok većina ostalih vrsta paprati se može naći u područjima umjerene klime. Paprati su rijetki biljni razredi, koje se mogu pronaći na svim

kontinentima, a to je upravo od važnosti kada se razmatraju potencijalne mogućnosti zaštite okolišta i osiguravanje dostatnih količina hrane (Huang i sur., 2010). Nažalost, propadanje ključnih usjeva uzrokuju najezde insekata. Tako npr. najezde moljaca (*Besimbia tabaci*) na gotovo svim kontinentima, direktno ili indirektno uzrokuje velike gubitke usjeva soje, kukuruza i pamuka. Najezde moljaca direktno utječe na prerano uvenuće biljaka, usporavanje njihova rasta i gubitak prinosa, jer moljac sisa floemski sok biljaka i još dodatno indirektno može prenijeti gotovo 200 biljnih virusa. Kod paprati, kao neiskorištenog i nedovoljno istraženog resursa biološki aktivnih molekula i drugih važnih i potrebnih funkcija, istraživana je obrambeni mehanizam naspram insekata. Do danas je utvrđeno da patogeni i drugi štetnici rijetko inficiraju tj. napadaju mahovinu i paprati, ukoliko se ovaj parameter usporedi s biljakama cvjetnjačama. Nadahnuti ovim saznanjima, Shukla i suradnici (2016) su načinili probir od 38 različitih vrsta paprati, koje rastu na područjima Indije, a sve kako bi definirali protein, koji kod ovih biljaka sudjeluju u zaštiti protiv kukaca. Pri tom je važno da ovi proteini nemaju negativne učinke na druge biljke u kojima će se eksprimirati ciljani proteini, kao ni na druge (miko)organizme i čovjeka. Jestiva paprat *Tectaria macrodonta* je izgledan kandidat za proizvodnju ovih proteina, koji pružaju zaštitu paprati prema duhanovom štitastom moljcu. Naime, protein/enzim Tma12 je izoliran iz jestive paprati *T. macrodonta* i eksprimiran u transgenom gorskom ili meksičkom pamuku (*Gossypium hirsutum*), najzastupljenijoj vrsti pamuka na svijetu. U ovome istraživanju je razvijeno 16 transgenih linija gorskog ili meksičkog pamuka s varijabilnom ekspresijom Tma12. Jedna od linija ovoga pamuka se posebno ističe među ostalim transgenim linijama i to po tome što: ima izvrsnu ekspresiju Tma12, superiorne agronomske parametre kroz četiri generacije i nema simptome bolesti uvijanja listova, čijeg uzročnika prenosi moljac. Kada je Tma12 kloniran i ekprimiran u transgenim biljkama pamuka, ove biljke iskazuju 99% otpornosti na ovu vrstu moljca. Transgene biljke pamuka imaju isti prinos kao kontrolne biljke, koje su tretirane kemijskim pesticidima te nisu pokazale otpornost na druge insekte, koji ne uzrokuju štetu biljkama (Shukla et., al 2015). Sve do 2019. nije bila poznata struktura Tma12, bez koje se ne može istražiti mehanizama djelovanja ovoga

proteina/enzima. Yadav i sur. (2019) su sekvencionirali i okarakterizirali Tma12 kao prvu LPMO iz biljke. Tma12 je svrstan u obitelj AA10 enzima. Aminokiseline s aromatičnim bočnim lancima su bitne za prepoznavanje potencijalnih supstrata kao i vezanje enzima na odgovarajući biopolimer. Velika sličnost primarne sekvence ove eukariotske LPMO sa sekvencom bakterijskih LPMO zapravo potiče brojna pitanja vezana uz evoluciju ovih enzima kao i postojanje zajedničkog pretka, a što bi povezalo (miko)organizme iz različitih klada stabla života.

## OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Različite sirovine iz proizvodnje i prerade drvne biomase kao i najzastupljeniji biopolimeri u prirodi (npr. celuloza, hemiceluloza i lignin) predstavljaju izuzetan, zasad nedovoljno iskorišten, sirovinski potencijal, koji se može uspješno primijeniti u proizvodnji biogoriva druge generacije.

Nedavno je okarakterizirana zasebna skupina vrlo značajnih enzima - litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO), koji su jedinstveni tzv. monobakreni enzimi, a koji mogu depolimerizirati teško razgradljive polimere iz biljne biomase. Poznata je važnost aktivnosti LPMO u brojnim biološkim procesima, kao što su razgradnja biopolimera, razvojni ciklusi određenih organizama i kruženje ugljika u prirodi. Ipak, rasprostranjenost ovih enzima i puni potencijal njihove primjene još su uvijek nedovoljno istraženi i, sukladno tomu, primijenjeni.

Opći cilj ovoga rada bio je utvrditi rasprostranjenost LPMO u papratima, budući da je ova vrsta biljaka izuzetno otporna na najezde kukaca, koji mogu bitno reducirati prinose životno, civilizacijski, ekološko i ekonomski bitnih usjeva, kao što su npr. kukuruz i pamuk.

Specifični cilj ovoga rada bio je ponajprije utvrditi jesu li homologne DNA sekvence u odabranim vrstama paprati zaista geni koji kodiraju za LPMO. Dodatno, cilj je bio provesti ekspresiju odabranih gena iz dvije različite vrste paprati - *Thyrsopteris elegans* i *Onoclea sensibilis* (*TeleLPMO* i *OseLPMO*) u bakteriji *E. coli* BL21(DE3), odrediti aktivnost eksprimiranih heterolognih proteina/enzima (*TeleLPMO* i *OseLPMO*) i na taj način potvrditi rasprostranjenost LPMO među različitim vrstama paprati, koje bi bile izvrsni kandidati za biotehnološku primjenu.

## MATERIJALI I METODE

### 1. Materijali

#### 1.1. Kemikalije i enzimi

**Tablica 1.** Podrijetlo kemikalija, pufera, enzima, standarda i kitova, koji su korišteni u ovom istraživanju.

Kemikalija	Dobavljač	CAS registracijski broj
Agar-agar	Roth, Njemačka	9002-18-0
Agaroz LE	LabQ, Njemačka	9012-36-6
Albumin goveđeg seruma	Sigma-Aldrich, SAD	/
Ampicilin	Sigma-Aldrich, SAD	/
Bakrov (II) sulfat pentahidrat ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Njemačka	7758-99-8
$\beta$ -ciklodekstrin	TCl, Japan	7585-39-9
<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	Sigma-Aldrich, SAD	6104-58-1
di-Kalijev hidrogen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Roth, Njemačka	7778-77-0
Dvostruko destilirana voda ( $\text{ddH}_2\text{O}$ )	<i>Institute of Molecular Biotechnology, TU Graz</i>	/
Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	Sigma-Aldrich, SAD	60-00-4
Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )	Chem-Lab, Belgija	64-17-5
Fosfatna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )	Roth, Njemačka	7664-38-2
Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ )	Roth, Njemačka	56-81-5
Hidrogen peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Roth, Njemačka	91-10-1
Imidazol	Roth, Njemačka	32-4
Izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG)	Roth, Njemačka	/
Kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Roth, Njemačka	7758-11-4
Kvašev ekstrakt	Roth, Njemačka	8013-01-2

<b>Kemikalija</b>	<b>Dobavljač</b>	<b>CAS registracijski broj</b>
L(+)-Askorbinska kiselina	Roth, Njemačka	134-03-2
LB hranjiva podloga	Roth, Njemačka	73049-73-7
Natrij klorid (NaCl)	Roth, Njemačka	7647-14-5
Octena kiselina (CH <sub>3</sub> COOH)	Roth, Njemačka	64-19-7
SOC hranjiva podloga	Lennox, Roth, Njemačka	/
Trypton/pepton	Roth, Njemačka	91079-40-2
Trisaminometan (TRIS)	Roth, Njemačka	1185-53-1
2,6-dimetoksifenol (2,6-DMP)	Sigma-Aldrich, SAD	91-10-1
6X DNA vezujuća boja (engl. <i>Atlas ClearSight DNA Stain</i> )	BioAtlas, Estonija	/
10X migracijsko bojilo (engl. <i>DNA Loading Dye</i> )	ThermoFischer Scientific, SAD	/
<b>Pufer (engl. <i>Buffer</i>)</b>	<b>Dobavljač</b>	<b>CAS registracijski broj</b>
Pufer za restrikcijsko cijepanje		
10X <i>CutSmart</i> ® <i>Buffer</i>	New England Biolabs, SAD	/
Puferi za SDS elektroforezu		
4X Litij dodecil sulfatni pufer (engl. <i>LDS Sample Buffer</i> )	ThermoFischer Scientific, SAD	/
20X 2-(N-morfolino) etansulfonsko kiselinski pufer (engl. <i>MES SDS Running Buffer</i> )	ThermoFischer Scientific, SAD	/
Pufer za ligaciju		
10X pufer za T4 DNA Ligazu	ThermoFischer Scientific, SAD	/
<b>Enzim</b>	<b>Dobavljač</b>	<b>CAS registracijski broj</b>
10X T4 DNA Ligaza	ThermoFischer Scientific, SAD	/
NdeI restrikcijski enzim	New England Biolabs, SAD	/
XhoI restrikcijski enzim	New England Biolabs, SAD	/
<b>Standard</b>	<b>Dobavljač</b>	<b>CAS registracijski broj</b>
standard za agarozni gel ( <i>GeneRuler</i> <sup>TM</sup> <i>1 kb DNA Ladder</i> )	ThermoFischer Scientific, SAD	/
standard za SDS elektroforezu ( <i>PageRuler</i> <sup>TM</sup> <i>Protein Ladder</i> )	ThermoFischer Scientific, SAD	/

Kit	Dobavljač	CAS registracijski broj
kit za izolaciju plazmida (engl. <i>GenJET Plasmid MiniPrep Kit</i> )	ThermoFischer Scientific, SAD	/
kit za ekstrakciju (engl. <i>DNA Monarch® Gel Extraction Kit</i> )	New England Biolabs, SAD	/
kit za određivanje koncentracije proteina (engl. <i>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</i> )	ThermoFischer Scientific, SAD	/
kit za određivanje aktivnosti HRP enzima (engl. <i>Pierce™ Western Blotting Substrate</i> )	ThermoFischer Scientific, SAD	/

## 1.2. Bakterijski sojevi

Za umnažanje pET22b(+) plazmida (poglavlja 1.3., 2.2.1., 2.2.8. i 2.2.9.) kao i za ekspresiju heterolognih LPMO (TeleLPMO i OseLPMO), korištene su, redom, elektro/kemijski kompetentne stanice bakterijskih sojeva *E. coli* TOP10 i *E. coli* BL21(DE3).

**Tablica 2.** Bakterijski sojevi korišteni za umnažanje plazmida i ekspresiju heterolognih LPMO (TeleLPMO i OseLPMO).

Soj	Genotip	Primjena
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	Visokoučinkovito kloniranje gena i umnažanje plazmida
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS)	Visokoučinkovita ekspresija proteina

### 1.3. Plazmid pET22b(+)

Plazmid pET22b(+) sadrži (i) *pelB* signalnu sekvencu na N-kraju LPMO za translokaciju ovoga enzima iz citoplazmatskog u periplazmatski prostor, (ii) His-tag (6 x His) na C-kraju ovoga proteina, zatim (iii) selektivni marker za rezistenciju na antibiotik ampicilin (*Amp<sup>R</sup>*), (iv) ishodište replikacije *ori* i (v) T7 promotor.

### 1.4. Hranjive podloge za uzgoj bakterijskih sojeva *E. coli* TOP10 i *E. coli* BL21(DE3)

U ovome radu korištene su dvije vrste hranjivih podloga - LB (engl. *lysogeny broth / agar*) i SOC (engl. *Super Optimal broth with Catabolite repression*) (Tablica 1.).

**Tablica 3.** Sastav hranjivih podloga LB i SOC.

Hranjiva podloga	Sastav	Masa (g) / volumen (L)
LB	LB praškasta smjesa	20,0 g
	ddH <sub>2</sub> O	nadopuniti do 1,0 L
LB - agar	LB praškasta smjesa	20,0 g
	Agar-agar	15,0 g
	ddH <sub>2</sub> O	nadopuniti do 1,0 L
SOC	SOC praškasta smjesa	26,64 g
	ddH <sub>2</sub> O	nadopuniti do 1,0 L

Za selekciju transformiranih stanica *Escherichia coli* plazmidom pET22b(+), u LB hranjivu podlogu dodan je ampicilin (konačna koncentracija 0,1 mg/mL).



## 1.5. Pufferi

### 1.5.1. 50 mM K-fosfatni puffer, pH 7,4, za određivanje koncentracije proteina, pročišćavanje enzima i određivanje aktivnosti LPMO

**Tablica 4.** Sastav 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 7,4

Sastav [konačna koncentracija]	Volumen (mL ili L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [1,0 mol/L]	80,2 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [1,0 mol/L]	19,8 mL
ddH <sub>2</sub> O	nadopuniti do 1,0 L

### 1.5.2. 50 mM K-fosfatni puffer, pH 7,4 s imidazolom za pročišćavanje LPMO

Za pročišćavanje heterologne LPMO (His-tag na C-kraju proteina; poglavlje 1.3.) korištena je afinitetna kromatografija tj. Ni-kolona (HisTrap™ HP, 3 mL, GE Healthcare, SAD) i to brzom proteinskom tekućinskom kromatografijom (engl. *Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC; ÄktaPrime, Amersham Biosciences, Ujedinjeno Kraljevstvo). Za vezanje ovoga proteina iz staničnog ekstrakta (poglavlje 2.2.13.) na kolonu korišten je 50 mM K-fosfatni puffer, pH 7,4, dok se za eluciju specifično vezane LPMO iz kolone koristio 50 mM K-fosfatni puffer, pH 7,4, u linearnom gradijentu koncentracije imidazola (konačna koncentracija imidazola 500 mmol/L; Tablica 5.).

**Tablica 5.** Sastav 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 7,4 s imidazolom (konačna koncentracija 500 mmol/L) za eluciju LPMO iz afinitetne kolone

Sastav [konačna koncentracija]	Volumen / masa
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [1,0 mol/L]	80,2 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [1,0 mol/L]	19,8 mL
imidazol [1,0 mol/L]	34,04 g
ddH <sub>2</sub> O	nadopuniti do 1,0 L

### 1.5.3. Koncentrirani (50X) TRIS-Acetat-EDTA (TAE) pufer

(50X) TRIS-Acetat-EDTA (TAE) pufer se koristi za DNA elektroforeze (poglavlje 2.2.5.) i to nakon razrjeđivanja dvostruko destiliranom vodom.

**Tablica 6.** Sastav 50X TAE pufera

Sastav	Koncentracija / Volumen
Trisaminometan (TRIS)	2,0 mol/L
Octena kiselina	1,0 mol/L
Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	50,0 mol/L
ddH <sub>2</sub> O	nadopuniti do 1,0 L

### 1.5.4. Puferi za *Western blot*

Tri pufera su korištena za *Western blot*, kako slijedi: Tris-puferirana fiziološka otopina (engl. *Tris-Buffered Saline stock solution*; 10X TBS); zatim mješavina Tris-puferirane fiziološke otopine i polisorbata 20 (engl. *Tris-buffered saline with 0.1% Tween® 20 Detergent*; TBST); i TBST s albuminom seruma goveda (engl. *1X TBST with 5% Bovine serum Albumin*, BSA). Ovi su puferi korišteni, kako je opisano u poglavlju 2.2.5.

**Tablica 7.** Sastav pufera za *Western blot*

10X TBS	TBST (0.0003 %)	TBST 5% BSA
Masa / volumen [konačna koncentracija ili pH vrijednost]	Masa / volumen	Masa / volumen
30,3 g Tris [0,25 M]	100 mL 10X TBS	100 mL TBST
87,6 g NaCl [1,5 M]	300 µL Tween® 20	5,0 g BSA
HCl [pH 7,5]	/	/
nadopuniti s ddH <sub>2</sub> O do 1,0 L		

## 2. Metode

### 2.1. Bioinformatički alati i baze podataka

U ovome istraživanju su korištene dvije različite baze podataka (*Protein Data Bank* i Inicijativa 1000 biljnih transkriptoma), a zbog specifičnosti i obima podataka tj. odabranih sekvenci, koje su poravnane sa sekvencom Tma12, istražene su mogućnosti primjene tri različita programa (*MUSCLE*, *HMMER* i *MEGA*), kako je to opisano ovdje ispod.

#### 2.1.1. *Protein Data Bank* (PDB)

PDB je baza podataka koja sadrži više od 144 000 trodimenzionalnih strukturnih modela biomolekula poput DNA/RNA, proteina i njihovih kompleksa s metalima i drugim molekulama ([wwPDB consortium, 2019](#)). Strukturni modeli ovih biomolekula najčešće se određuju metodom difrakcije X-zraka, NMR spektroskopijom i/ili krio-elektronskom mikroskopijom. U ovome istraživanju iz PDB preuzeti su eksperimentalni i metapodaci o enzimu Tma12 iz paprati *Tectaria macrodonta*, koji je odabran kao protein/enzim za daljnje istraživanje i uspoređivanje homolognih enzima, koji mogu iskazivati aktivnost LPMO (poglavlje 2.2.15.).

#### 2.1.2. Inicijativa 1000 biljnih transkriptoma (engl. *1000 plants transcriptome data*; 1KP)

Inicijativa 1000 biljnih transkriptoma je multidisciplinarni međunarodni konzorcij, koji je generirao podatke o biljnim transkriptomima 1124 raznovrsnih biljnih vrsta ([One Thousand Plant Transcriptomes Initiative, 2019](#)). U ove vrste uključene su zelene biljke (*Viridiplantae*) i crvene alge (*Rhodophyta*). Sve veća dostupnost sekvenci različitih biomolekula biljnog podrijetla i brzi napredak u funkcionalnoj genomici omogućavaju istraživanje evolucije biljaka. Iz baze podataka 1KP preuzete su sekvence homolognih mRNA iz paprati, koje su poravnane sa sekvencom Tma12 (poglavlje 2.1.3.).

### **2.1.3. Program *MUSCLE***

Pomoću programa *MUSCLE* (eng. *MU*ltiple *Seq*uence *Co*mparison by *Log*-*Exp*ecation) načinjeno je višestruko poravnanje sekvenci homolognih mRNA iz paprati. Ovo poravnanje 170 nukleotidnih sekvenci načinjeno je s ciljem procjene homologije između odabranih sekvenci, zatim predviđanja sekundarne strukture proteina kao i identifikacije aminokiselina, koje su ključne za aktivnost enzima (Edgar, 2004). Sekvenca Tma12 je korištena kao polazna sekvenca u ovom poravnanju.

### **2.1.4. Program *HMMER***

Program *HMMER* se koristio za pretraživanje dostupnih baza podataka genomskih sekvenci, pretragu homologa enzimu Tma12 te poravnavanje odabranih sekvenci. Ovaj program implementira primjenu vjerojatnosnih modela, koji se nazvaju skriveni Markov modeli (engl. *Hidden Markov Models*), a osmišljen je za detekciju udaljenih homologa (Finn i sur., 2011). I u ovom programu sekvenca Tma12 je bila polazišna informacija za daljnju identifikaciju homolognih sekvenci potencijalnih LPMO.

### **2.1.5. Program *MEGA***

Pomoću programa *MEGA* moguće je identificirati i analizirati DNA sekvence kao i sekvence proteina iz evolucijske perspektive. Program na temelju unesenih DNA sekvenci odrađuje komparativnu analizu tih sekvenci kako bi se olakšala procjena sličnosti unutar jedne skupine gena kao i između različitih skupina gena te kako bi se mogli procijeniti evolucijski odnosi između gena i vrsta. Unutar ovoga programa su implementirane brojne metode za izračunavanje molekularnog slijeda aminokiselina, procjenu evolucijskih udaljenosti unesenih sekvenci te na temelju njih konstrukcija filogenetskih stabala. Na opisani način konstruirano je filogenetsko stablo srodnosti potvrđenih bakterijskih LPMO sekvenci i do sada nepotvrđenih LPMO sekvenci podrijetlom iz paprati s polaznim enzimom Tma12.

## 2.2. Metode molekularne biotehnologije

U ovome istraživanju bilo je potrebno heterologno eksprimirati dva gena - *TeleLPMO* i *OseLPMO*, koji kodiraju potencijalne LPMO. Na temelju generiranih podataka dobivenih prethodno spomenutim programima, oba su gena konstruirana pomoću servera *Benchling* i za ovo istraživanje insertirana u plazmid pET22b(+), koji je prethodno umnožen u kemijski kompetentnim stanicama *E. coli* TOP10 (poglavlje 2.2.1.). Ovaj je plazmid kao i sekvence koje kodiraju za *TeleLPMO* i *OseLPMO* tretiran restriksijskim enzimima (poglavlje 2.2.4.). Radi potvrde uspješnog restriksijskog cijepanja plazmida i dvaju gena, procijenjena je veličina plazmidne DNA i dvaju fragmenata u agaroznom gelu (poglavlje 2.2.5.), a zatim su DNA fragmenti ekstrahirani iz ovoga gela i načinjena je ligacija gena s plazmidom, čime su dobiveni ciljani konstrukti pET22b(+)-*TeleLPMO* i pET22b(+)-*OseLPMO*. Prije transformacije elektrokompetentnih stanica *E. coli* BL 21 (DE3) izoliranim konstruktima (poglavlje 2.2.8.), potvrđena je sekvenca konstrukata (poglavlje 2.2.7.). Nakon toga, transformirane stanice *E. coli* BL 21(DE3) uzgojene su radi ekspresije gena (poglavlje 2.2.9.) i pročišćavanja dvaju heterolognih proteina (poglavlje 2.2.13.), određena je njihova koncentracija (poglavlje 2.2.10.) i procijenjena molekulska masa (SDS-PAGE, poglavlje 2.2.11.). Dodatno, potvrđena je ekspresija obaju proteina (*Western blot*, 2.2.12.) te su pročišćeni proteini inkubirani s ionima bakra (poglavlje 2.2.15.), nakon čega je određena aktivnost eksprimiranih heterolognih enzima, koji iskazuju aktivnost LPMO (poglavlje 2.2.15.).

### 2.2.1. Transformacija kemijski kompetentnih *E. coli* TOP10 stanica

**Princip.** Transformacija stanica je postupak unosa genetskog materijala (DNA molekule) bez direktnog kontakta između stanice donora i stanice primatelja DNA, pri čemu se stanice primatelja egzogene DNA nazivaju kompetentne stanice. Određene bakterijske vrste se smatraju prirodno kompetentnim stanicama, dok se netransformabilne stanice mogu načiniti kompetentnima primjenom različitih laboratorijskih metoda. Kompetencija stanica se odnosi na sposobnost stanica primatelja DNA da uspješno prihvate i, tijekom umnožavanja stanica, umnože

i plazmidnu DNA, koja ne treba sadržavati specifičnu sekvencu za svoj transport u stanicu (Swords, 2003). Transformacija različitih sojeva bakterije *Escherichia coli* ciljanim plazmidima ključan je i prvi korak za ekspresiju heterolognih proteina/enzima. Dostupan je cijeli niz različitih metoda za transformaciju ovih sojeva, a generalno se ove metode mogu podijeliti na kemijsku transformaciju i elektroporaciju. Učinkovitost i jednostavnost kemijske transformacije i to bez upotrebe zasebne opreme (elektroporatora, koji je potreban za elektroporaciju), predstavlja prednost kemijskih metoda transformacije stanica. Nije u potpunosti jasan mehanizam transformacije kemijski kompetentnih stanica, no smatra se da kalcijevi ioni, s kojima se stanice prije transformacije inkubiraju, olakšavaju vezanje fosfatne okosnice DNA, koja ima negativan naboj, na površinu stanice, koja obično ima pozitivan naboj. Nakon toga, usljed izazvanog toplinskog šoka, slabi struktura stanične membrane i vezana DNA može ući u stanicu i tako se može dobiti transformirana stanica (Chang i sur., 2017).

U ovome radu je provedena transformacija kemijski kompetentnog soja *E. coli* TOP10 s ciljem umnažanja plazmidne DNA [pET22b(+)] i vektora s integriranim LPMO genima (*TeleLPMO* i *OseLPMO*) i, nakon toga, transformacija elektrokompetentnog soja *E. coli* BL21 (DE3) s konstruktima pET22b(+)-*OseLPMO* i pET22b(+)-*TeleLPMO*, radi ekspresije ovih proteina.

**Postupak.** U alikvot suspenzije *E. coli* TOP10 od 50  $\mu$ L, koji se čuva u Eppendorf epruветama pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i zatim premjesti na led, doda se 1  $\mu$ L plazmidne DNA (1-3 ng) te inkubira na ledu kroz 30 min. Nakon toga, stanice se podvrgnu toplinskom šoku pri  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 30 s, kako bi došlo do slabljenja stanične membrane i olakšanog ulaska plazmidne DNA u stanicu. Suspenzija se zatim nanovo premjesti na led i doda joj se 950  $\mu$ L SOC hranjive podloge. Ovako priređena suspenzija se inkubira pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 800 rpm kroz 1-2 h (IKA® VORTEX GENIUS 3, Sigma-Aldrich, Njemačka). Porasle transformirane stanice *E. coli* TOP10 (20-100  $\mu$ L) naciјepe se na LB-agar, kojem je dodan ampicilin (100 mg/mL; poglavlje 1.4.) i inkubiraju preko noći pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Odabere se jedna kolonija transformiranih stanica *E. coli* TOP10 porasla pri ovim selektivnim uvjetima (ampicilin) i u aseptičnim uvjetima njome se inokulira LB hranjiva podloga s ampicilinom

(5,0 mL) kako bi se uzgojila (37 °C i 120 rpm) svježa prekonoćna kultura, iz koje se izolira umnoženi plasmid (poglavlje 2.2.2.).

### **2.2.2. Izolacija plazmidne DNA**

Umnožena plazmidna DNA se izolira pomoću *GeneJET Miniprep Plasmid Isolation Kit* (ThermoFischer Scientific, SAD), prema protokolu i otopinama, koje dobavlja ovaj proizvođač. Nakon izolacije plazmidne DNA, odredi se njena koncentracija iz apsorbancije otopine pri 280 nm (poglavlje 2.2.3.).

### **2.2.3. Određivanje koncentracije plazmidne DNA**

Spektrofotometar NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, SAD) korišten je za određivanje koncentracije izolirane plazmidne DNA. Ovaj uređaj zadržava uzorke relativno malih volumena (0,5-2,0 µL) između dvije mjerne površine i to zbog površinske napetosti tekućina ([Desjardins i sur., 2009](#)). Na ovaj način može se brzo i jednostavno odrediti koncentracija DNA i to iz apsorbancije priređene otopine izoliranoga plazmida pET22b(+) i konstrukta s integriranim LPMO genima pri 280 nm ( $A_{280}$ ). NanoDrop 2000c je već baždaren odgovarajućim standardima nukleinskih kiselina i automatski iz vrijednosti za  $A_{280}$  prikazuje koncentraciju plazmidne DNA (ng/µL). Dodatno, ovaj uređaj određuje apsorbanciju otopine pri 260 ( $A_{260}$ ) i 230 nm ( $A_{230}$ ) i omjere ovih apsorbancija ( $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$ ), kako bi se istovremeno mogla procijeniti čistoća izoliranoga plazmida s obzirom na prisutnost drugih otopljenih molekula (npr. proteina i RNA) i drugih spojeva.

#### 2.2.4. Restrikcija

Restriksijski postupak proveden je s ciljem fragmentiranja plazmida pET22b(+) i gena od interesa (*TeleLPMO* i *OseLPMO*). Kako bi proveli ligaciju odnosno insertirali dva gena u pET22b(+) plazmid, provedeno je fragmentiranje pET22b(+) plazmida i fragmenata s ova dva gena na identičnim restriksijskim mjestima. Nakon ligacije, dobiveni su željeni konstrukti pET22b(+)-*TeleLPMO* i pET22b(+)-*OseLPMO*.

**Princip.** Restriksijske endonukleaze su okarakterizirane početkom pedesetih godina prošlog stoljeća. Obično su to bakterijski enzimi, koji omogućuju fragmentiranje dvolančane DNA molekule na točno određenim mjestima - unutar specifične palindromske sekvence komplementarnih DNA lanaca. Dakle, restriksijske endonukleaze su s obzirom na svoju aktivnost neophodne u genetičkom inženjerstvu za izrezivanje tj. fragmentiranje određenih gena i plazmida. Ovako dobiveni fragmenti se mogu međusobno ligirati, pri čemu je potrebna aktivnost specifičnih ligaza, što rezultira novim kombinacijama DNA molekula [npr. genom za LPMO insertiranim u pET22b(+)].

U ovome istraživanju koristili smo restriksijske enzime XhoI i NdeI za specifično fragmentiranje (1) praznog plazmida pET22b(+), (2) fragmenta s genom *TeleLPMO*, i (3) fragmenta s genom *OseLPMO*, to na karakterističnim restriksijskim mjestima, koja su identična u sva tri slučaja - (1), (2) i (3) i, prema tome, komplementarna za naredni korak – nezavisnu ligaciju plazmida (1) s fragmentima (2) ili (3).

**Postupak.** U odvojenim Eppendorf epruvetama pomiješan je prethodno izoliran pET22b(+) (1,0 ng) plazmid i izolirani *TeleLPMO* (1,0 ng) ili izolirani *OseLPMO* (1,0 ng) s puferom za restrikciju (*CUTsmart*, 10x), restriksijskim enzimima XhoI i NdeI (1,0 µL) i ddH<sub>2</sub>O do konačnog volumena ovako priređene reakcijske smjese od 30 µL. Uzorci su inkubirani pri 30 °C kroz 12 h. Nakon toga je načinjena gel elektroforeza s ciljem potvrde uspješnog fragmentiranja pET22b(+) i dvaju gena od interesa (*TeleLPMO* i *OseLPMO*), potom ekstrakcija ovih fragmenata iz agaroznog gela i ligacija dobivenih fragmenata.



### 2.2.5. Gel elektroforeza

Nakon provođenja većine eksperimenata iz molekularne biotehnologije, poput kloniranja gena i/ili plazmida, fragmentiranja DNA ili RNA molekula i lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), obično se rezultirajuće nukleinske kiseline analiziraju gel elektroforezom (Warren i sur. 2003). Gel elektroforeza u agaroznom gelu je visko specifična, brza i jednostavna metoda za izdvajanje, procjenu broja parova baza i pročišćavanje DNA fragmenata (poglavlje 2.2.6.) veličine od 0,5 do 25 kb (Voytas, 1992).

**Princip.** Razdvajanje DNA fragmenata gel elektroforezom se temelji na migraciji molekula s nabojem kroz matriks gela u električnom polju, koje se uspostavlja u puferu između dviju elektroda - anode i katode (Hames, 1998). Fosfatna okosnica nukleinskih kiselina daje molekulama DNA ravnomjerno raspoređen negativan neto naboj po njihovoj cijeloj dužini, zbog čega se ove molekule u električnom polju kreću prema pozitivnoj elektrodi – anodi, pri čemu dolazi do brže migracije manjih molekulskih iona i to zbog njihova lakšeg prolaska kroz pore matriksa gela.

Gel elektroforeza je korištena za potvrđivanje uspješne restrikcije vektorske DNA i dvaju gena - *TeleLPMO* i *OseLPMO* (poglavlje 2.2.4.).

**Postupak.** Provedena je horizontalna gel elektroforeza i to u 1% agaroznom gelu. Agarozni gel je pripremljen otapanjem 0,8 g agaroze u 80 mL TAE (1X) pufera uz dodatak boje (5 µL) za detekciju nukleinskih kiselina *Atlas ClearSight DNA* (Biolabs New England, SAD), prema uputstvu proizvođača. Najprije su restrikcijski fragmentirani i nefragmentirani alikvoti uzoraka pET22b(+) i potencijalnih LPMO gena, *OseLPMO* i *TeleLPMO*, temperirani pri 62 °C kroz 20 minuta. Nakon toga, ovim je uzorcima dodano migracijsko bojilo *DNA Loading Dye 6x* (ThermoFischer Scientific, SAD) te su uzorci nanoseni u jažice prethodno priređenog agaroznog gela. Standard *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (ThermoFischer Scientific, SAD) je korišten radi procjene veličine fragmenata za ovu gel elektroforezu, koja je provedena u uređaju za elektroforezu pri 110 V i 400 mA kroz 35 min (nanoPAC-300P, Cleaver Scientific Ltd, UK). Nakon

toga, separirane vrpce DNA vizualizirane su u komori s UV svjetlom (G:BOX, Syngene, Indija). Nefragmentirani uzorci pET22b(+) plazmida koji nisu tretirani restrikcijskim enzimima i zadržali su svoj karakterističan kružni oblik, su korišteni u gel elektroforezi kao kontrola, kojom je potvrđeno da su ostali uzorci linearizirani pomoću restrikcijskih endonukleaza (poglavlje 2.2.4.).

### **2.2.6. Ekstrakcija DNA iz agaroznog gela i ligacija dobivenih fragmenata DNA**

Ekstrakcijom plazmidne DNA i drugih fragmenata s odgovarajućim brojem parova baza iz djelića agaroznog gela, dobiju se ciljani dijelovi DNA, koji se mogu ligirati i na taj način dobiti nova DNA molekula - plazmid (vektor), koja sadrži gen od interesa (npr. gen za Tma12 ili gene *TeleLPMO* i *OseLPMO*). Na ovaj se način dobije plazmid s ciljanim genom i njime se mogu transformirati (elektro)kompetentne stanice *E. coli*, npr. *E. coli* BL21 (DE3).

**Postupak.** Vrpce lineariziranih fragmenata pET22b(+) plazmida i gena *TeleLPMO* i *OseLPMO* su izrezane iz agaroznog gela pomoću skalpela. Ekstrakcija ovih fragmenata iz izrezanog komadića gela načinjena je pomoću *Monarch DNA Gel Extraction Kit* (New England Biolabs Inc., SAD), uz korištenje protokola i otopina, koje je priložio proizvođač. Nakon toga, u Eppendorf epruvete dodan je ekstrahiran pET22b(+), gen od interesa (*TeleLPMO* ili *OseLPMO*), T4 ligaza, pufer za ovu ligazu (10x) i dodatkom ddH<sub>2</sub>O je podešen ukupni volumen ove smjese do 20 µL. Rezultirajući plazmidi [pET22b(+) s genom od interesa - pET22b(+)-*TeleLPMO* i pET22b(+)-*OseLPMO*] su korišteni za transformaciju stanica elektrokompetentnog soja *E. coli* BL21 (DE3), kako je to opisano u poglavlju 2.2.8.

### **2.2.7. Sekvencijska analiza rekombinantnih DNA molekula**

Fragmenti DNA, koji su izolirani iz agaroznog gela su sekvencionirani, kako bi se potvrdile sekvence ovih fragmenata za ligaciju, a time i sekvencija plazmida pET22b(+) s genom *TeleLPMO* ili *OseLPMO*, kojim su transformirane elektrokompetentne stanice *E. coli* BL21 (DE3). Tvrtka Microsynth AG (Balgach, Švicarska) koristi Sanger metodu sekvencioniranja DNA, koja se temelji

na nasumičnom dodavanju dideoksinukeotida pomoću DNA polimeraze tijekom *in vitro* DNA replikacije. Sanger metodom je potvrđena točnost izoliranih i ligiranih sekvenci, kojima su onda transformirane stanice elektrokompetentnog soja *E. coli* BL21 (DE3) (poglavlje 2.2.8.).

### **2.2.8. Transformacija elektrokompetentnih stanica *E. coli* BL21(DE3) i uzgoj transformiranih stanica**

Soj *E. coli* BL21(DE3) se vrlo često koristi za proizvodnju rekombinantnih proteina (Pinske i sur., 2011). Ovom soju nedostaju dvije proteaze - Lon i OmpT, koje mogu razgraditi tzv. nepravilno sintetizirane proteine, i povećana je stabilnost mRNA molekula u stanicama ovoga soja.

**Princip.** Transformacija kompetentnih stanica je metoda kojom se heterologna DNA vektora unosi u ove stanice i to u cilju njezina umnožavanja homolognom rekombinacijom (Green i Rogers, 2013). Uz transformaciju kompetentnih stanica kemijskim postupkom, drugi tip učinkovite transformacije kompetentnih stanica je elektroporacija, kod koje je unos rekombinantne DNA u (bakterijsku) stanicu potpomognut pulsom napona u električnom polju. Naime, suspenzija elektrokompetentnih stanica i DNA materijala se izlaže kratko pulsirajućem intenzivnom naponu eksponencijalnog oblika, čime se omogućuje prolazak rekombinantne DNA kroz membranu stanice u unutarstanični prostor (Dower i sur., 1998; Hengen, 1995). Frekvencija uspješno transformiranih stanica je linearna funkcija koncentracije kompetentnih stanica i koncentracije rekombinantne DNA, a još ovisi i o jačini električnog polja i trajanju impulsa (Dower i sur., 1988).

**Postupak.** Nakon ligacije (poglavlje 2.2.6.), ligacijska smjesa je temperirana pri 65 °C kroz 20 min. Zatim su iz ove ligacijske smjese uklonjene soli i to tako da je smjesa (10 µL) pažljivo dodana na nitrocelulozne membranske filtere (promjer pora 13 mm, veličina 0,025 mm; Bartelt, Austrija), koji su pažljivo položeni na površinu vode (ddH<sub>2</sub>O) u Petrijevoj zdjelici, pa su soli iz ligacijske smjese kroz 20 min difundirale u područje manje koncentracije (u ddH<sub>2</sub>O), a na

membrani je zaostala rekombinantna DNA. Ova je DNA korištena za transformaciju elektrokompetentnih stanica soja *E. coli* BL21 (DE3). U Eppendorf epruveti je pripravljena suspenzija elektrokompetentnih stanica, koja se čuvaju na ledu, i dodan joj je 1,0 µL rekombinantne DNA. Ovako priređena suspenzija je ostavljena na ledu dodatnih 10 min. Nakon toga, u sterilnu kivetu za elektroporaciju je preneseno 50 µL ove smjese te se je na smjesu kiveti djelovalo pulsirajućim električnim poljem od 1,8 kW tijekom 5 ms (MicroPulser electroporator; Bio-Rad, SAD). Odmah nakon toga u ovu je suspenziju dodano 950 µL SOC hranjive podloge i suspenzija je nadalje inkubirana na rotacijskoj mješalici pri 37 °C i 300 rpm kroz 60 min (IKA® VORTEX GENIUS 3, Sigma-Aldrich, Njemačka;). Ovako porasla suspenzija transformiranih *E. coli* BL21 (DE3) stanica (20-100 µL) je nacijepljena na LB-agar s ampicilinom i inkubirana preko noći pri 37 °C. Ova se hranjiva podloga priprema na identičan način kao LB hranjiva podloga uz jedan izuzetak – dodatak agara (poglavlje 2.2.9.). Sterilna vruća podloga se pri sterilnim uvjetima izlijeva u Petrijeve zdjelice i ostavi da se ohladi i očvrsne. Jedna porasla kolonija je odabrana za nacijepljivanje LB hranjive podloge s ampicilinom (5 mL) i uzgojena pri 37 °C kao prekonoćna kultura – inokulum za uzgoj stanica u većem mjerilu u cilju ekspresije i purifikacije proteina (poglavlje 2.2.9.).

### **2.2.9. Heterologna ekspresija TeleLPMO i OseLPMO**

Nakon pripreme inokuluma (poglavlje 2.2.8.), uzgojene su transformirane stanice *E. coli* BL21 (DE3) u većem mjerilu (300 mL) radi ekspresije proteina i, nakon toga, njihova pročišćavanja.

Najprije je priređena selektivna LB hranjiva podloga (Tablica 3.). Nakon dodatka sterilizirane LB hranjive podloge (300 mL) u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu s odbijačima vrtloga (1000 mL), ovoj se podlozi doda ampicilin (100 mg/mL) do konačne koncentracije od 0.1 mg/mL. Ovako priređena hranjiva podloga inokulirana je s 20 mL (4 x 5,0 mL) svježe uzgojene prekonoćne culture *E. coli* BL21 (DE3). Nacijepljena podloga je inkubirana pri 37 °C i 120 rpm uz povremeno

određivanje optičke gustoće suspenzije pri valnoj duljini svjetlosti od 600 nm ( $OD_{600}$ ; BioPhotometer 6131, Eppendorf, Njemačka). Kada je  $OD_{600}$  vrijednost dosegla 0,5-0,8 AU, provedena je indukcija ekspresije gena i to dodatkom izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG, 300  $\mu$ L, 1,0 mol/L), tako da je konačna koncentracija IPTG bila 0,001 mol/L. Zatim je suspenzija inkubirana pri 28 °C i 120 rpm tijekom narednih 16 sati. Potom su iz dobivene suspenzije izdvojene stanice (4000 rpm, 30 min, 4 °C; Avanti J-10, Beckman coulter, SAD) i resuspendirane u 50 mM K-fosfatnom puferu, pH 8,0 (20 mL). Ovako resuspendirane stanice tretirane su ultrazvukom (ciklus 70%, 5 min; Branson Ultrasonics™ Sonifer S-250A, ThermoScientific, SAD). Iz dobivenih smjesa centrifugiranjem (15000 rpm, 20 min, 4 °C; Avanti J-25.50, Beckman coulter, SAD) su izdvojeni supernatanti iz kojeg su izdvojeni i pročišćeni TeleLPMO i OseLPMO enzimi (poglavlje 2.2.13.). Preostali dio uzorka (stanične membrane i druge netopljive komponente stanica tretiranih ultrazvukom), analiziran je metodom SDS-PAGE (poglavlje 2.2.11.)

### 2.2.10. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je pomoću tzv. BCA metode (engl. *bicinchoninic acid assay*, *Smith assay*).

**Princip.** BCA metoda se koristi za kvantifikaciju ukupnih proteina u otopini. Temelji se na redukciji bakrovih atoma ( $Cu^{2+}$  do  $Cu^{1+}$ ) u alkalnom mediju. Bicinoninska kiselina (BCA) omogućuje visoko osjetljivu i selektivnu kolorimetrijsku detekciju reduciranog oblika iona bakra. U prvoj reakciji dolazi to tzv. biuretne reakcije, odnosno formiranja obojenog kelatnog kompleksa proteina, koji sadrže tri ili više aminokiselinska ostatka, s bakrovim ionima u alkalnoj sredini. Zatim BCA reagira s reduciranim ionom bakra, što rezultira kelacijom dviju molekula BCA s jednim bakrovim ionom. U ovom drugom koraku dolazi do razvoja intenzivne ljubičaste boje kao posljedica formiranja kompleksa BCA-bakrov ion, čija se apsorpcija mjeri pri 562 nm.

**Postupak.** Određivanje koncentracije proteina provedeno je uz korištenje otopina i protokola, prema uputama proizvođača (Pierce™ BCA Protein Assay, ThermoFischer Scientific,

SAD), a apsorpcija dobivenih uzoraka je određena pri 562 nm pomoću spektrofotometra (BioTek Instruments, SAD).

### 2.2.11. Natrij dodecil-sulfat – poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je elektroforetska metoda koja se izuzetno često koristi za separaciju i kvalitativnu analizu smjese proteina (Walker, 2002). Ova relativno brza, jednostavna i vrlo osjetljiva metoda često se koristi nakon pročišćavanja proteina, kako bi se potvrdila njihova ekspresija i procijenila molekulska masa pročišćenih proteina.

**Princip.** Elektroforezom proteina u poliakrilamidnom gelu pri denaturirajućim uvjetima ove se molekule odjeljuju na osnovi svoje molekulske mase. Naime, otapanjem smjese proteina u otopini natrijeva dodecil-sulfata (SDS) dolazi do pucanja disulfidnih veza u proteinima, zatim proteini se bolje otapaju, denaturiraju i disociraju do pojedinačnih polipeptidnih lanaca. Vezanjem SDS-a na protein dolazi do maskiranja električnog naboja svakog pojedinačnog proteina i time protein dobiva negativan neto naboj od sulfata. Izjednačavanjem omjera molekulske mase proteina i naboja proteina (sulfata) u smjesi proteina znači da će se ovi denaturirani proteini s negativnim nabojem u električnom polju razdvojiti u poliakrilamidnom gelu isključivo na temelju veličine proteinskih molekula, koja zapravo odgovara molekulskoj masi svakog proteina.

Metodom SDS-PAGE kvalitativno su analizirane topljive (supernatant) i netopljive (talog; poglavlje 2.2.9.) frakcije proteina staničnog ekstrakta, kao i frakcije dobivene tijekom pročišćavanja eksprimiranih proteina (poglavlje 2.2.13.).

**Postupak.** Alikvoti proteinskih uzoraka su pripremljeni u skladu s protokolom proizvođača i to tako da su topljivim i netopljivim frakcijama proteina (10 µL) dodani reducirajući reagens (10X, 2 µL; NuPAGE®, ThermoFischer Scientific, SAD) i LDS pufer (4X, 4 µL; NuPAGE®, ThermoFischer Scientific, SAD). Dobivene smjese su zagrijane kroz 3 min pri 96 °C i, nakon toga, nanese u jažice SDS-PAGE gela (4-12 % Bis-Tris gel; NuPAGE®, ThermoFischer Scientific, SAD). SDS-PAGE je proveden u MES-SDS pri 160-180 V kroz 35 min (20X, PowerEase500®,

ThermoFischer Scientific, SAD). Nakon toga su proteini u ovome gelu vizualizirani bojom (*Coomassie Brilliant Blue*, Sigma-Aldrich, SAD), prema uputi proizvođača.

### 2.2.12. *Western blot*

Blotting je postupak prijenosa biomolekula (DNA, RNA ili proteina), koje su prethodno elektroforetski razdvojene u gelu, iz gela na membranu i to prvenstveno u cilju detekcije ovih biomolekula. Različite membrane mogu biti načinjene od npr. polivinil difluorida (PVDF), nitroceluloze, najlona ili papira. Osim detekcije, *Western blot* tehnika omogućava identifikaciju i kvantifikaciju ciljanih proteina i to na temelju formiranja kompleksa između ciljanog proteina, koji se veže na membranu, i antitijela, koje je specifičan za vezani protein. Pri tome je važno (*i*) izbjeći nespecifično vezanje proteina na membranu kao i (*ii*) vezanje primarnih antitijela na proteine, ali i (*iii*) vizualizirati specifično vezane proteine na membrani ([Memelink i sur., 1994](#)).

Prije detekcije ciljanih proteina, koji su se vezali na npr. membranu, kako je to načinjeno u ovome istraživanju, proteini su odijeljeni SDS-PAGE metodom (poglavlje 2.2.11.), ali nije načinjena vizualizacija proteina bojom. Budući da plazmid pET22b(+) sadrži gene koji kodiraju za šest histidina (engl. His-Tag), korišteno je anti-HisTag antitijelo, koje se specifično veže za ove proteine. Za vizualizaciju kompleksa protein-antitijelo, korištena je osjetljiva detekcija pomoću peroksidaze iz hrena (engl. *HorseRadisch Peroxidase*, HRP). Kemiluminiscentni supstrat HRP koristi se za detekciju HRP-obilježenih antitijela, specifično vezanih za ciljane proteine.

**Postupak.** Ponajprije je priređena Tris-puferirana fiziološka otopina (Tablica 7.) i zatim je ekvilibrirana PVDF membrana (0.2  $\mu\text{m}$ , 7 x 8.4 cm; ThermoFischer Scientific, SAD) i to namakanjem ove membrane u 100 %-tnom metanolu kroz 3 min. Ovako priređena membrana pažljivo je prebačena na pozitivnu donju elektrodu (anodu) kazete uređaja za *Western blot* (Trans-blot Turbo; Bio-Rad, SAD). Prethodno priređeni SDS-PAGE gel s razdvojenim proteinskim vrpcama položen je membranu, uklonjeni su mjehurići zraka između gela i membrane, i kazeta je zatvorena gornjom negativnom elektrodom (katodom). Ovako priređena kazeta postavljena je u

kadicu uređaja (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System; Bio-Rad, SAD), a kadica je smještena na magnetsku mješalicu, kako bi se održavala kontinuirana temperatura kadice. Prijenos proteina iz SDS-PAGE gela na nitroceluloznu membranu je proveden pri 1,0 A i 25 V kroz 30 min. Nitrocelulozna membrana je ostavljena u 10 mL 5 %-tnog 1X TBST-BSA puferu preko noći, kako bi se spriječilo nespecifično vezanje proteina na membranu. Nakon toga, membrana s vezanim proteinima je preko noći inkubirana s primarnim antitijelima (Anti-6X His tag antibody; Abcam, SAD) u kadici koja ne propušta svjetlost (pri 4 °C i 100 rpm). Nakon ove inkubacije, uklonjena je otopina primarnih antitijela njihovim ispiranjem na način da je membrana uronjena u 10-15 mL 1X TBST pufer, te tako uronjena ostavljena na rotacijskoj mješalici (pri sobnoj temperature i 100 rpm kroz 10 min). Postupak ispiranja je ponovljen sveukupno 3 puta. HRP reakcija je provedena pomoću supstrata i otopina kita *Pierce™ Western Blotting Substrate Kit*, prema uputama proizvođača (ThermoFischer Scientific, SAD). Kemiluminiscencija formiranog kompleksa protein-antitijelo detektirana je pomoću uređaja G:BOX (Syngene, Indija).

### **2.2.13. Pročišćavanje proteina brzom tekućinskom kromatografijom**

Tekućinska kromatografija je metoda koja se koristi za razdvajanje sastojaka otopljenih u otopini i to na temelju interakcija svakoga sastojka sa stacionarnom fazom kromatografske kolone. Pročišćavanje proteina brzom tekućinskom kromatografijom (engl. *Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC*) je vrsta srednjotlačne tekućinske kromatografije visoke razlučivosti i reproducibilnosti, a razvijena je za brzo odjeljivanje proteina (Pontis, 2017). Ovu metodu karakterizira relativno brzi protok mobilne faze kao i biokompatibilnost s vodenim puferskim sustavima (mobilna faza) i stacionarnim fazama, koje se uobičajeno koriste kod tekućinske kromatografije. Ove stacionarne faze načinjene su od relativno malih nosača (kuglica) i imaju veliki kapacitet za vezivanje specifičnih otopljenih molekula u staklenim ili plastičnim kolonama (Madadlou, 2012).



**Princip.** Afinitetna kromatografija se temelji na specifičnom vezanju proteina za određeni ligand. Plazmid pET22b(+) u kojeg su insertirani *TeleLPMO* i *OseLPMO* sadrži parove baza, koje kodiraju za His-tag (poglavlje 1.3.). Osim vezanja specifičnih antitijela (vidi poglavlje 2.2.12.), ovaj se tag koristio i za pročišćavanje ciljnih proteina pomoću afinitetne kromatografije. Prednosti ove metode su visoki afinitet i specifičnost vezanja His-tag-a za dvovalentne metalne ione u koloni pri neutralnoj pH vrijednosti otopine. U ovome istraživanju korištena je afinitetna kolona s dvovalentnim ionima nikla. Proteini s His-tagom vežu se s ionima nikla, dok ostali proteini iz smjese prolaze kroz kolonu (ili se nespecifično vežu, ali se lako ispiru iz kolone pomoću pufera). Specifično vezani proteini mogu se eluirati koristeći pufer s dodatkom imidazole, koji konkurira za vezanje s ionima nikla. Time dolazi do elucije rekombinantnih proteina s kolone, koji su u samo jednom koraku izdvojeni od ostalih proteina smjese.

**Postupak.** Supernatant dobiven nakon centrifugiranja (25 mL; poglavlje 2.2.9.) nanesen je na kolonu (HisTrap™ HP, 3 mL, GE Healthcare, SAD) kromatografskog uređaja (ÄktaPrime, Amersham Biosciences, Ujedinjeno Kraljevstvo). Nakon nanošenja supernatanta na kolonu, provedeno je ispiranje nespecifično vezanih proteina 50 mM K-fosfatnim puferom, pH 7,4. Linearna elucija (0-100%) specifično vezanog proteina s His-tag-om načinjena je pomoću 50 mM K-fosfatnog pufera s 500 mM imidazolom, pH 7,4 uz protok mobilne faze od 1,0 mL/min. Prikupljene frakcije (3,0 mL) su koncentrirane (poglavlje 2.2.14.), određena je koncentracija proteina (poglavlje 2.2.10.), kao i enzimska aktivnost ovako izdvojenih enzima (poglavlje 2.2.15.).

#### **2.2.14. Koncentriranje pročišćenog proteina i inkubacija s ionima bakra**

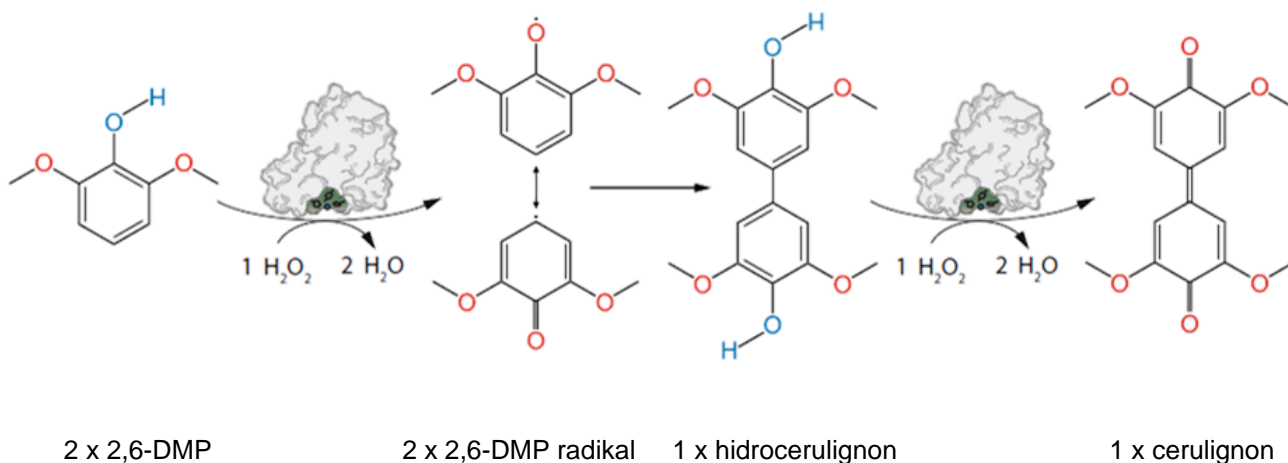
Nakon pročišćavanja enzima (poglavlje 2.2.13.), prikupljene su tri različite frakcije, koje su sadržavale proteine od interesa - *TeleLPMO* i *OseLPMO*, te su koncentrirane do konačnog volumena od 3,0 mL pomoću membranskih epruveta za koncentriranje (10 kDa MWCO, Sartorius, Njemačka) centrifugiranjem (4 °C, 4000 rpm, 3 x 10 min; 5810R, Eppendorf, Njemačka). Alikvotima koncentriranih uzoraka pročišćenog proteina je dodana otopina bakrovog

sulfata ( $\text{CuSO}_4$ , 500  $\mu\text{M}$ ) do konačne koncentracije ove otopine od 50  $\mu\text{mol/L}$  s ciljem zasićenja aktivnog mjesta enzima bakrovim ionom. Ovako priređeni uzorci su inkubirani preko noći pri 4 °C. Nakon toga, suvišak nevezanih bakrovih iona je uklonjen i proteinu je izmijenjen pufer (50 mM K-fosfatni pufer, pH 7,4) pomoću membranskih epruveta za koncentriranje (10 kDa MWCO, Sartorius, Njemačka) centrifugiranjem (4 °C, 4000 rpm, 3 x 10 min; 5810R, Eppendorf, Njemačka). Ovako priređenom enzimu određena je aktivnost (poglavlje 2.2.15.).

### **2.2.15. Metoda za određivanje aktivnosti proteina**

Činjenica koji znatno otežava određivanje aktivnosti LPMO je prirodni čvrsti polimerni netopljivi supstrat. Dodatno, produkti enzimski katalizirane reakcije trebali bi biti spojevi niske molekulske mase, koji su topljivi u puferima i za koje se mogu dobiti standardi, što u slučaju celuloze kao supstrata i oligo- i disaharida kao produkata nije uvijek tako. Određivanje aktivnosti LPMO visokoučinkovitom tekućinskom kromatografijom (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) spregnutom s spektrometrijom masa (eng. Mass Spectrometry; MS) (HPLC-MS) može dati vrlo detaljan uvid u cijeli spektar produkata formiranih tijekom enzimske razgradnje celuloze, ali zahtjeva kompleksnu pripremu uzoraka i vremenski je intenzivan ([Frommhagen i sur., 2017](#)).

Stoga je u ovome istraživanju za određivanje aktivnosti LPMO optimirana i korištena brza, jednostavna i osjetljiva spektrofotometrijska metoda. Kao supstrat korišten je analog - 2,6-dimetoksifenol (2,6-DMP), a kao (ko-)supstrat -  $\text{H}_2\text{O}_2$  (umjesto  $\text{O}_2$ ) ([Bissaro i sur., 2018](#); [Breslamayr i sur., 2018](#)). U LPMO kataliziranoj reakciji iz ovih se supstrata kao produkti dobiju 2,6-dimetoksifenol radikal i voda (Slika 5.). Kako ovi radikali dimeriziraju (hidrocerulignon), LPMO može ovaj dimer nanovo oksidirati i u reakciji oksidacije hidrocerulignona nastaje cerulignon, spoj koji apsorbira svjetlost pri 469 nm, što se može pratiti spektrofotometrijski.



**Slika 5.** Shematski prikaz LPMO katalizirane oksidacije 2,6-DMP do 2,6-dimetoksifenol radikala (koji formira dimer hidrocerulignon) i vode, i naknadna oksidacija ovoga hidrocerulignona do cerulignona.

Prema opisanome principu su određene aktivnosti dvaju eksprimiranih i pročišćenih LPMO - TeleLPMO i OseLPMO.

**Postupak.** Reakcijska smjesa je načinjena od 2,6-DMP (konačna koncentracija 1,0 mM),  $H_2O_2$  (konačna koncentracija 1,0 mM) i LPMO u 50 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,4, do konačnog volumena ove smjese od 200  $\mu$ L. Enzim je dodan na kraju i odmah nakon toga je započeto određivanje apsorbancije pri 469 nm ( $A_{469}$ ; BioTek Instruments, SAD) kroz narednih 20 minuta. Aktivnost LPMO je procijenjena iz početnog linearnog dijela dobivenog pravca. Kao kontrole koristile su se reakcijske smjese (1) bez dodatka enzima i (2) uz dodatak enzima ali i s dodatkom inhibitora enzimske aktivnosti - etilen diamin tetra octene kiseline (EDTA; konačna koncentracija 5,0 mM). Naime, u ovoj posljednjoj reakcijskoj smjesi EDTA formira stabilan kompleks s ionima bakra i na taj način onemogućava aktivnost LPMO (koja ne iskazuje aktivnosti bez iona bakra).

## REZULTATI I RASPRAVA

Aktivnost relativno nove skupine enzima - litičkih polisaharidnih monooksigenaza (LPMO), značajno je promijenila biotehnoške strategije za enzimsku razgradnju najdostupnijih prirodnih biopolimera - celuloze i hitina. LPMO se mogu vezati na površinu kompleksnih biopolimera – supstrata/sirovina i ovdje kataliziraju oksidativno cijepanje glikozidnih lanaca. Tako njihova aktivnost zapravo predstavlja inicijalni proces, koji onda omogućava aktivnost drugih enzima u smislu razgradnje ovih složenih supstrata, npr. aktivnost endoglukanaza, celulaza ili hitinaza ([Askarian i sur., 2021](#)). Sinergistička aktivnost LPMO i glukozil hidrolaza znatno olakšava razgranju ovih biljnih supstrata. Nedavno istraživanje je pokazalo da se primjenom smjese različitih glukozil hidrolaza u razgradnji lignoceluloznih supstrata, uključujući i LPMO, dobije čak 60 % više glukoze u usporedbi s prinosom glukoze, koja se dobije primjenom smjesa enzima koje ne sadrže ovaj ključan enzim (LPMO; [Müller i sur., 2015](#)). Razvoj i optimizacija inovativnih biotehnoških procesa za konverziju kompleksnih supstrata iz biljne biomase otvara nove mogućnosti u razvitku održivih i obnovljivih izvora energije ([Fushinobu, 2014](#)).

Kroz posljednjih pet godina mnogostruko se unaprijedilo znanje o biološkim funkcijama i rasprostranjenosti LPMO u svim trima domenama života (Archea, Eubakterija, Eukarioti). Ponajprije se smatralo da su LPMO fungalnog podrijetla i da je njihova jedina uloga razgradnja kompleksnih biopolimera. Nakon toga je utvrđena važnost ovih enzima u svim domenama života s raznovrsnim ulogama, kao npr. virulentnost bakterije *P. aeruginosa*, koja može oksidirati hitin i preživjeti u krvi čovjeka ([Askarian i sur., 2021](#)). [Shukla i sur. \(2016\)](#) su identificirali LPMO iz paprati *Tectaria macrodonta*. Izolacija i karakterizacija LPMO u dodatnom carstvu postavili su pitanje o rasprostranjenosti i biološkim funkcijama ovih enzima u biljnim organizmima.

Kako bi se upoznali s ulogama LPMO i eventualno definirali njihov potencijal za biotehnološku upotrebu, ključno je bilo istražiti postoje li LPMO i u drugim biljnim organizmima ili je paprat *T. macrodonta* individualan slučaj. Nadalje, bilo je potrebno potvrditi aktivnost identificiranih LPMO enzima. Međutim, za provođenje daljnjih istraživanja, nužno je osmisliti funkcionalne strategije rekombinantne ekspresije ovih enzima u modelnim organizmima (npr. *E. coli*) s ciljem njihove ekspresije i karakterizacije. Stoga su u ovom istraživanju korišteni različiti bioinformatički alati i baze podataka (PDB, 1KP, IMBT TU Graz - neobjavljeni podaci), kako bi ustanovili primarnu sekvencu i strukturu jedinog poznatog LPMO enzima - Tma12 (poglavlje 2.1.1.), zatim da bi se utvrdila homologija primarne sekvence ovoga proteina s primarnim sekvencama potencijalnih LPMO iz paprati (poglavlja 2.1.3. i 2.1.4.), načinilo filogenetsko stablo (poglavlje 2.1.5.) i odredile aktivnosti dviju potencijalnih eksprimiranih LPMO - OseLPMO i TeleLPMO.

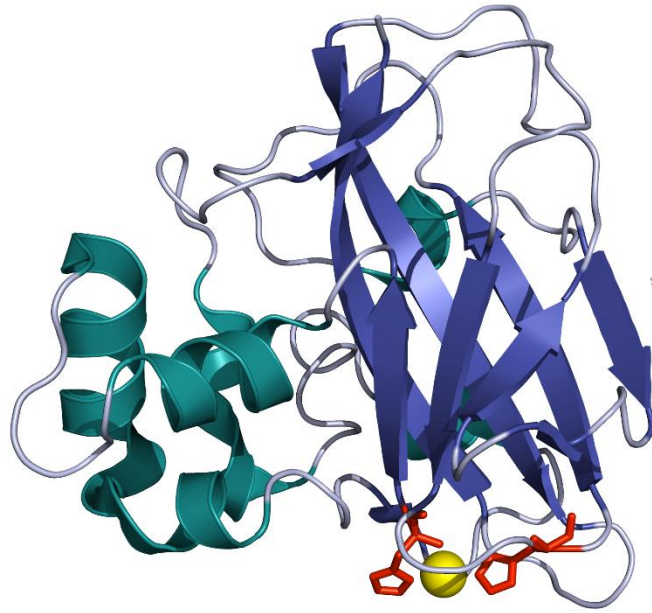
## **1. Korištenje bioinformatičkih alata i baza podataka**

### **1.1. Primarna sekvenca i struktura Tma12**

Protein Tma12 bio je polazna točka ovoga istraživanja, jer je jedino ovaj LPMO iz paprati *T. macrodonta* identificiran i izoliran (Shukla i sur., 2016) te sekvencioniran i dodatno opisan u više detalja (Yadav i sur., 2019). Naime, Shukla i suradnici (2016) su identificirali ovaj novi enzim iz jestive paprati *T. macrodonta*, koja je široko rasprostranjena na području Indije. Ova vrsta paprati razvila je otpornost na utjecaj moljca (*Besimia tabaci*), koji uzrokuju veliku štetu na usjevima i to (a) direktno - sisanjem floemskog soka, što rezultira ranim uvenućem biljke, usporavanjem njezina rasta i gubitkom prinosa biljne biomase, te (b) indirektno - prenoseći više od 200 biljnih virusa, koji mogu uzrokovati potpuni gubitak prinosa ove paprati. Do sada je poznato više od 1550 vrsta moljaca, koji obitavaju na svim kontinentima, a uzrokuju propadanje širokog

spektra različitih biljaka. Stoga su izuzetno važni rezultati ove istraživačke grupe iz Indije, koja je identificirala Tma12, za kojega je utvrđeno da je glavni uzrok otpornosti ove vrste paprati. Zbog toga je gen za Tma12 eksprimiran u transgenom pamuku, koji je pokazao sličnu otpornost prema moljcima kao i *T. macrodonta*. Pokazano je da Tma12 u paprati *T. macrodonta* inhibira razvoj larvi. Jedna hipoteza sugerira da Tma12 sudjeluje u razgradnji hitina, polimera koji čini vanjsku ovojniciu ličinki bijelih mušica, dok druga hipoteza opisuje inhibicijsko djelovanje reaktivnih oksidacijskih spojeva (engl. *reactive oxygen species*), koji nastaju u reakcijama koje katalizira Tma12, na razvoj larvi.

Naknadno je određena primarna sekvenca ovoga proteina i načinjena je kristalna struktura Tma12 (Yadav i sur., 2019). Pretraživanjem dostupnih podataka (poglavlje 2.1.1.) o Tma12, pronađena je primarna sekvenca (21,51 kDa; Tablica 8.) i kristalna struktura ovoga proteina u *Protein Data Bank* (PDB 6IF7). Na temelju strukture ovoga proteina i udjela polarnih aminokiselina na njegovoj površini (kojima se ovaj enzim veže na potencijani supstrat, npr. hitin), Tma12 je klasificiran u obitelj AA10 proteina. U ovome istraživanju vizualizirana je trodimenzionalna struktura Tma12 pomoću programa *Pymol* (Slika 6.).



**Slika 6.** Struktura Tma12 (PDB 6IF7) s ionom bakra (žuto) u aktivnom mjestu i His1 i His101, koji koordiniraju ovaj kofaktor.

## 1.2. Odabir homolognih sekvenci

Multidisciplinarni međunarodni konzorcij 1KP generirao je podatke o genomima i transkriptomima više od 1000 različitih biljnih vrsta i ovo je za sada jedina takva dostupna baza podataka. U ovom istraživanju iz ove baze podataka ekstrahirane su sekvence mRNA (transkriptom), koji bi mogli kodirati za homologne LPMO (poglavlje 2.1.2.). Zatim su potencijalno LPMO kodirajuće sekvence pomoću programa *MUSCLE* i *HMMER* (poglavlja 2.1.3 i 2.1.4.) poravnate sa sekvencom mRNA, koji kodira za Tma12. Dodatno, sekvenca *Tma12* gena je poravnata sa sekvencama određenih bakterijskih vrsta, koji sadrže i mRNA za LPMO (Institut za Molekularnu Biotehnologiju, IMBT, TU Graz, neobjavljeni podaci). Sekvence brojnih (mikro)organizama su pokazale visoku homologiju sa sekvencom *Tma12*. Međutim, u konačnom odabiru značajnih homologa ključna je bila prisutnost dvaju histidina, koja u aktivnom mjestu

LPMO koordiniraju kofaktor - ion bakra. Zbog toga su pojedinačno poravnate svaka od odabranih sekvenci potencijalnih LPMO i to s ciljem potvrđivanja homologije odabrane sekvence s Tma12 i identifikacije dvaju histidina (Slika 7.).

```

SmLPMO      HGYVESPASRAYQCKLQLNTQCGSVQYE-----PQSVEGLKGFPPQAGPAD      45
Tma12       HGSMEDPISRVRCLRLENPERPTSPACQAAVALSGTQAFYDWNEVNIPNAAGRHRRELIPD  60
** :*. * ** .*: **:   : *   :                               .: . * : *

SmLPMO      GHIASADKSTFFELDQQTPTRWKLNKLTGPNSTWKLTAHST-TSWRYFITKPNWDAS      104
Tma12       GQLCSAGRFKYRGLD-LARSDWIATPLPSGASSFPFRYIATAAHLGFFEFYVTREGYQPT  119
*::**.: : ** : : *   * :* .** :: * :   ::::*. : : :

SmLPMO      QPLTRASFDLTPFCQFNDGGAIPAAQVTHQCNIADRSGSHVILAVWDIADTANAFYQAI      164
Tma12       VPLKWADLEELPFINVTNPLVS-GSYQITGTTPSGKSGSHLIYVIWQRTDSPEAFYSCS  178
** . *.: : ** :.: :   : ..   . *:::***:* .*: :*: :***..

SmLPMO      DVNLSK      170
Tma12       DVYFT-      183
** ::

```

**Slika 7.** Poravnate primarne sekvence Tma12 i već poznate LPMO iz bakterije *Serratia marcescens* (SmLPMO).

Na temelju ovako dobivenih podataka identificirano je više od 40 do sada neokarakteriziranih potencijalnih LPMO iz paprati. Ove su LPMO sekvence korištene za daljnje istraživanje.

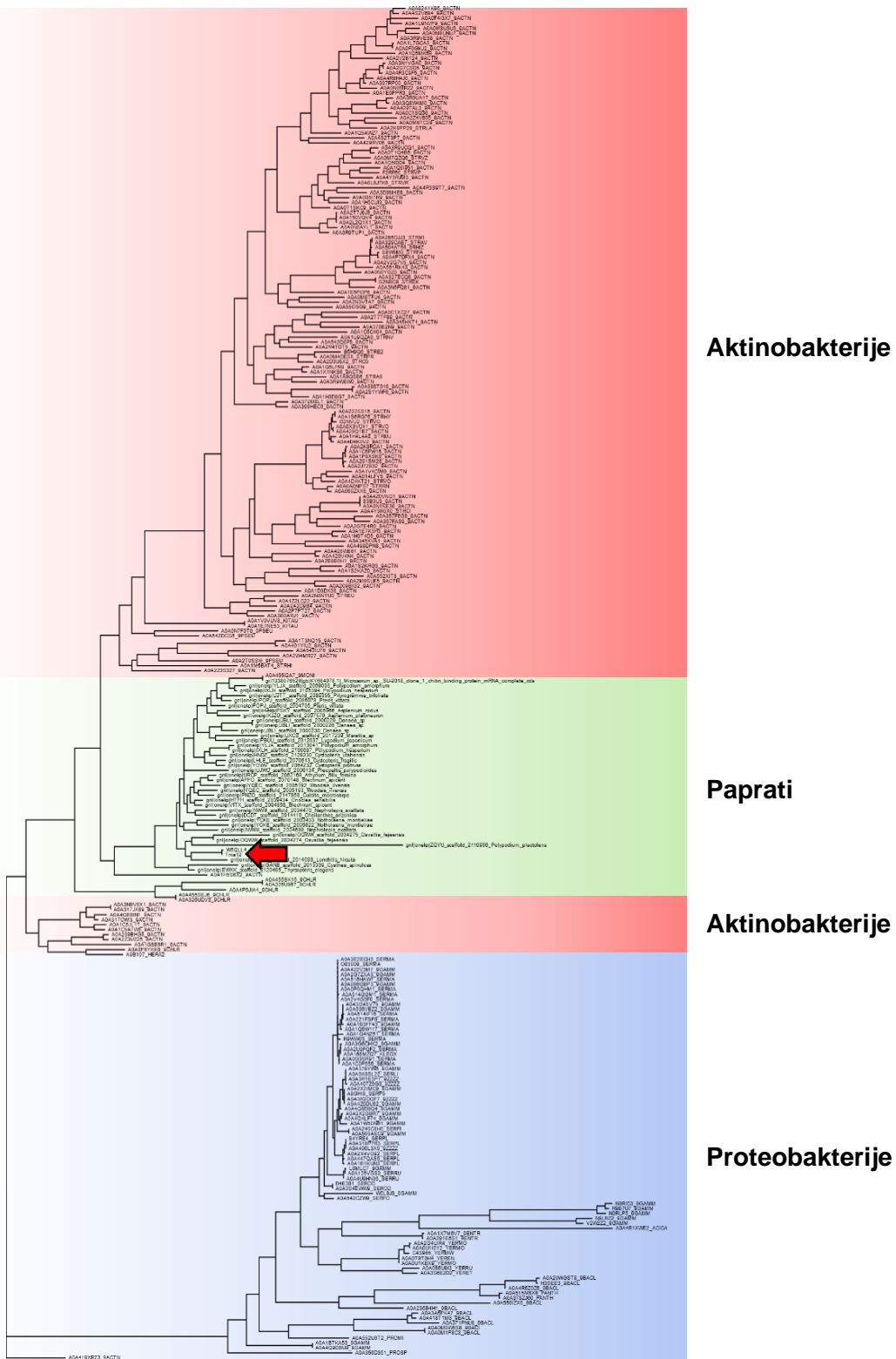
### 1.3. Konstrukcija filogenetskog stabla

Uvid u evolucijsku povezanost LPMO pokazuje njihove odnose unutar ove obitelji enzima, što zapravo pomaže u razumijevanju njihove specifičnosti i omogućava da se pretpostave potencijalne uloge ovih enzima s do sada nedefiniranim aktivnostima. Dodatno, na temelju ovoga uvida metodama proteinskog inženjerstva mogu se optimirati određene karakteristike odabranih LPMO i tako prilagoditi za eventualnu primjenu u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji. Book i sur. (2014) su konstruirali filogenetsko stablo LPMO, kako bi pronašli homologe i zajedničkog



pretka LPMO enzima iz obitelji AA9 i AA10. Komparativna analiza sekvenci i strukturnih karakteristika homolognih LPMO pokazala je njihovu veliku međusobnu strukturnu sličnost. Međutim, odabranim LPMO nedostaje homologija sekvenci i to izvan aktivnog mjesta ovih enzima. Dobiveni rezultati ukazuju na postojanje različitih klada unutar LPMO obitelji i pojedinačne klade LPMO imaju specifične afinitete prema različitim supstratima te kataliziraju reakcije na različitim C atomima supstrata (C1, C4 ili C1/C4). Također je utvrđeno da enzimi iz obitelji AA9 i AA10 imaju zajedničkog evolucijskog pretka. Nadalje, usporedbom više od 10 000 sekvenci LPMO iz sedam različitih AA obitelji, utvrđeno je da su enzimi unutar LPMO superobitelji nekoliko puta neovisno evoluirali, čime se mijenjao afinitet ovih enzima prema različitim supstratima (Voshol i sur., 2019).

U ovom znanstvenom istraživanju mRNA i proteinske sekvence potencijalnih LPMO su analizirane iz evolucijske perspektive (*MEGA* program; poglavlje 2.1.5.) i tako je konstruirano prvo takvo filogenetsko stablo srodnih LPMO s Tma12 (Slika 8.).

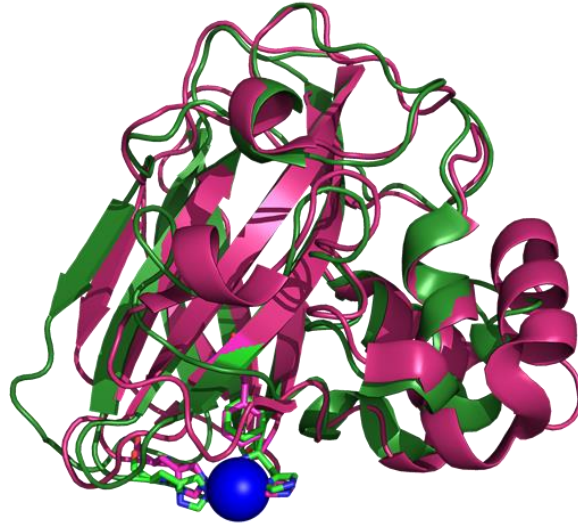


Slika 8. Filogenetsko stablo srodnih LPMO s Tma12 (Tma12 je označen crvenom strelicom)

U konstrukciji ovoga filogenetskog stabla korištene su sekvence iz interne baze podataka, koja sadrži više od 170 sekvencioniranih bakterijskih genoma (IMBT, TU Graz, neobjavljeni podaci). Dobiveni podaci ukazuju da Tma12 dijeli najviše homologije s enzimima prodijetlom iz Gram-pozitivnih aktinobakterija iz reda aktinomiceta, čiji genomi sadrže visok udjel gvanina i citozina. Aktinobakterije su široko rasprostranjene u vodenim i u kopnenim ekosustavima i dijele brojne karakteristike bakterija i funga, a imaju vrlo važnu ulogu u razgradnji kompleksnih biopolimera (Dhakal i sur., 2017; Anandan, 2016). Na temelju rezultata dobivenih u ovome istraživanju može se zaključiti da Tma12 ima vrlo visoku homologiju s bakterijskim LPMO u usporedbi s LPMO iz eukariota. Ova činjenica postavlja ključno pitanje vezano uz evolucijsko podrijetlo Tma12.

#### **1.4. LPMO iz paprati**

Kristalne strukture dvaju proteina - Tma12 i SmLPMO (PDB 2BEM) su uspoređene u *Pymol* programu (Slika 9.). Usporedbom njihovih struktura utvrđeno je da Tma12 dijeli visoku homologiju s enzimom bakterijskog podrijetla (SmLPMO), dok je homologija primarnih sekvenci izrazito niska (~25 %). Daljnjom analizom ovih dviju sekvenci može se zaključiti da su petlje u blizini aktivnog mjesta enzima Tma12 zaslužne za specifično prepoznavanje supstrata i vezanje enzima na prepoznati supstrat. Izrazita evolucijska srodnost Tma12 s bakterijskim LPMO zapravo postavlja pitanje zajedničkog pretka LPMO i ukazuje na mogućnost horizontalnog prijenosa gena s bakterija na paprati u dalekoj prošlosti planete Zemlje.

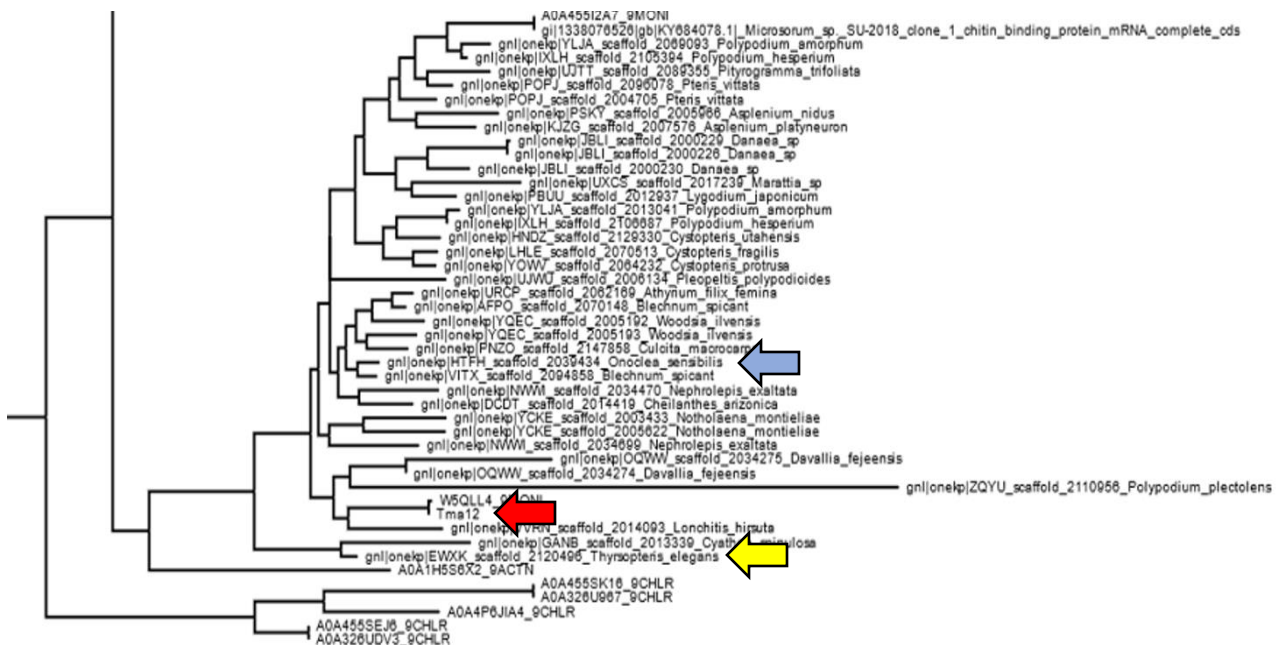


**Slika 9.** Usporedba trodimenzionalne strukture Tma12 (zeleno) i SmLPMO (ljubičasto) s ionom bakra (plavo)

Horizontalni transfer gena (engl. *Horizontal Gene Transfer*, HGT) se može definirati kao prijenos gena iz jednog (mikro)organizma na drugi (mikro)organizam bez uobičajenog prijenosa gena s roditelja na potomstvo (*Vertical Gene Transfer*, VGT), a uključuje mehanizme prijenosa: transformacije, transdukcije, konjugacije i, nedavno otkrivenog transfera, pomoću nanocjevčica (Dubey i sutr., 2011). Među bakterijama, HGT igra ključnu ulogu u evolucijskoj dinamici. Iako je HGT detektiran i kod eukariota, mehanizam prijenosa gena iz bakterijskih mikroorganizama u eukariote je još uvijek nedovoljno pojašnjen.

#### 1.4.1. Odabir sekvenci LPMO za ekspresiju gena u *E. coli*

Usporedbom mRNA sekvenci iz biljaka (1KP; poglavlja 2.1.2., 2.1.2. i 2.1.3) identificirano je više od 40 sekvenci, koje kodiraju za potencijalne LPMO (Slika 10.).



**Slika 10.** Filogenetsko stablo srodnosti potencijalnih LPMO iz paprati s Tma12 (izdvojen dio prethodno prikazanog filogenetskog stabla, Slika 8.). Strelice pokazuju položaj Tma12 (crvena), LPMO iz *Thyrsopteris elegans* (TeleLPMO; žuta strelica) i LPMO iz *Onoclea sensibilis* (OseLPMO; plava strelica).

Na temelju ove analize odabrane su dvije potencijalne LPMO iz paprati - jedna iz *Thyrsopteris elegans* (TeleLPMO) i druga iz *Onoclea sensibilis* (OseLPMO). Paprat *T. elegans* je jedina danas živa vrsta paprati iz porodice *Thyrsopteridaceae*. Smatra se da se ova paprat rasprostranila tijekom mezozoika. Fosili *T. elegans*, koji datiraju iz razdoblja krede, pronađeni su na kopnu Čilea u Južnoj Americi, no danas je ova vrsta endem otočja Juan Fernández, Čile (Matos, 2006). Na konstruiranom filogenetskom stablu može se uočiti da sekvenca TeleLPMO dijeli visoku homologiju s Tma12 (Slika 10.), što je zanimljivo s obzirom na podrijetlo i rasprostranjenost ove paprati (Južna Amerika) s obzirom na rasprostranjenost *T. macrodonta* (Indija). Stoga je upravo ova sekvenca (TeleLPMO) odabrana za rekombinantnu ekspresiju u stanicama *E. coli*. Druga odabrana sekvenca je sekvenca OseLPMO (iz paprati *Onoclea sensibilis*). Fosili koji datiraju od prije 60 milijuna godina nalikuju na danas poznatu vrstu ove

paprati, što sugerira da je baš ova vrsta preživjela relativno nepromijenjena još od paleoceanske epohe. Ova autohtona vrsta paprati raste na vlažnim područjima sjeveroistoka Kanade i Sjedinjenih Američkih Država. Osim geografske udaljenosti paprati *Onoclea sensibilis* od područja rasprostranjenosti paprati *T. macrodonta*, OseLPMO također karakterizira udaljenost od Tma12 u filogenetskom stablu (Slika 10.). Dakle, odabrane su dvije sekvence za ekspresiju u *E. coli*, pri čemu jedna sekvenca (TeleLPMO) ima visoku homologiju, a druga sekvenca (OseLPMO) nisku homologiju s Tma12 (Tablica 8.). Stoga bi se uspješnom rekombinantnom ekspresijom ovih dviju sekvenci po prvi puta potvrdila hipoteza o globalnoj rasprostranjenosti LPMO biljnog podrijetla, kako je to i načinjeno u ovome radu.

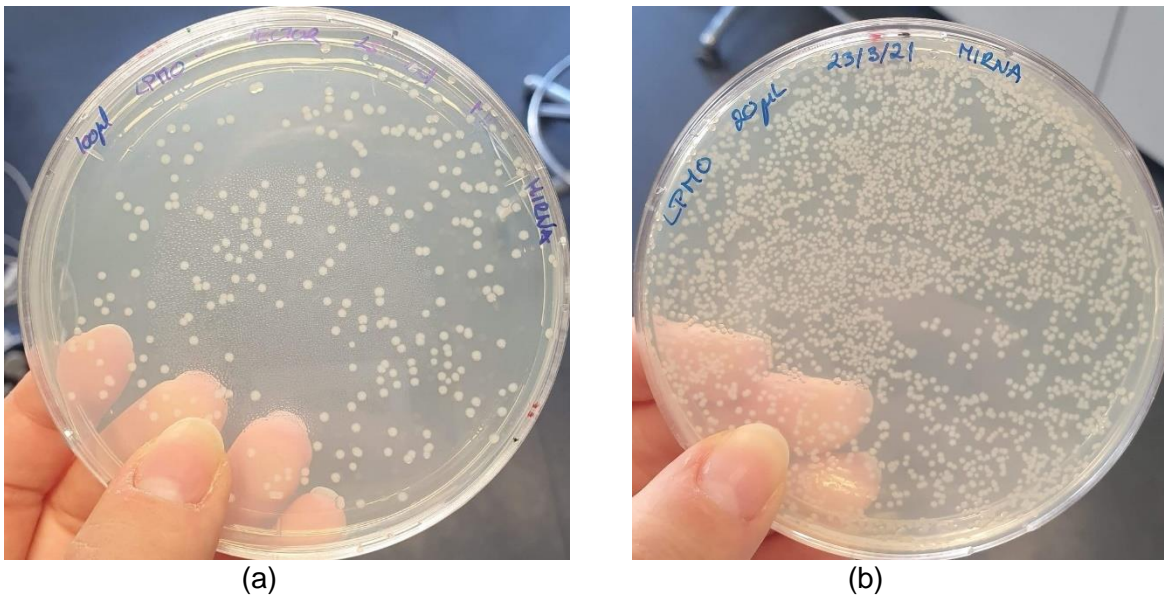
**Tablica 8.** Primarna struktura Tma12 i dviju potencijalnih LPMO - TeleLPMO i OseLPMO.

Enzim	Slijed aminokiselina
Tma12	HGSMEDPISRVCRLNPERPTSPACGAAVALSGTGAFYDWNEVNIPNAAGR HRELIPDGGLCSAGRFKYRGLDLARSDWIATPLPSGASSFPFRYIATAAHLGFFE FYVTREGYQPTVPLKWADLEELPFINVTNPPLVSGSYGITGTTSPSGKSGSHLIYV IWQRDSPEAFYSCSDVYFT
TeleLPMO	MKKSXGTVVVVAILLLCLLGVASGHGSMQDPISRVCYCYLEGPERPTSPACQA VVALGGTQPLYDWNEVNLNANGRHRELIPDGMLCSAGRRLKYQGLDLARADW PATSLSSGVAYTFLYRVTAHLGFFEFYVTRDSYDPTQPLTWADLEDSPFISITN PTTVGTTLGNAYQIPGTTTPAGKSGRHLIYVIWQRSDSAEAFYSCSDIDFSSDALI SLRSAVL
OseLPMO	MVLCGSGLLGVASGHGSMEDPISRVCYCYLENPESPTSAACQAAVALSGAQAF YDWNEVNLADAAGRHRELIPDGQLCSAGREKYQGLDLARSDWTATSLSSGVSF TYLYKATAPHLGFFEFYVTKDGYEPTPLKWADLEDSPFINVTDPTLVSGSYQIP GTTSPSGKSGRHLIYVIWQRSDSPESFYSCSDVDFDVALSLHSTT

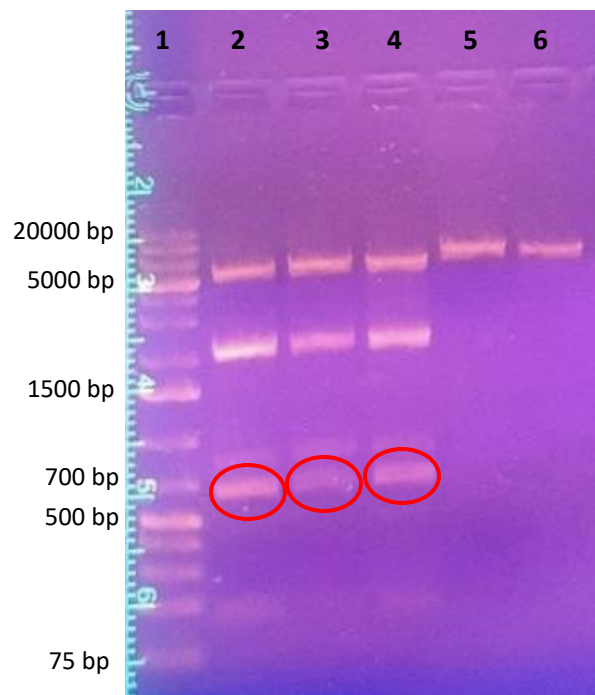
## 2. Umnažanje i restrikcija pET22b(+) plazmida i LPMO gena

### 2.1. Transformacija *E. coli* i izolacija pET22b(+) plazmida i LPMO gena

Sintetizirani su geni za TeleLPMO i OseLPMO (ATG Biosynthetics; Merzhausen, Njemačka), insertirani u pET22b(+) plazmid s kojim su transformirane kemijski kompetentne stanice soja *E. coli* TOP10. Transformirane stanice su uzgojene na selektivnoj (ampicilin) LB hranjivoj podlozi (Slika 11.) i uzgojene su prekonoćne kulture, iz kojih je izoliran ovaj plazmid s odgovarajućim genom (*TeleLPMO* ili *OseLPMO*), kako je sve detaljno opisano u poglavljima 2.2.1. i 2.2.2. i prikazano na slici 11. Potvrđena je sekvenca pET22b(+) s *TeleLPMO* ili *OseLPMO* (Microsynth AG; Balgach, Švicarska) i određena je koncentracija plazmidne DNA (poglavlje 2.2.3.).



**Slika 11.** Transformirane stanice *E. coli* TOP10 s pET22b(+)\_*TeleLPMO* (a) ili *OseLPMO* (b) porasle na selektivnoj (ampicilin) LB hranjivoj podlozi.



**Slika 12.** Agarozni gel s fragmentima pET22b(+) (6081 bp; jažice 2, 3 i 4 ) i *LPMO* genima: *Tma12* (jažica 2), *TeleLPMO* (jažica 3) i *OseLPMO* (jažica 4); negativna kontrola je restrikcijski netretirani pET22b(+) (sporiji prolazak kroz matricu agaroznog gela, pa je vrpca iznad 6081 bp; jažice 5 i 6), standard (*GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder*) (jažica 1).

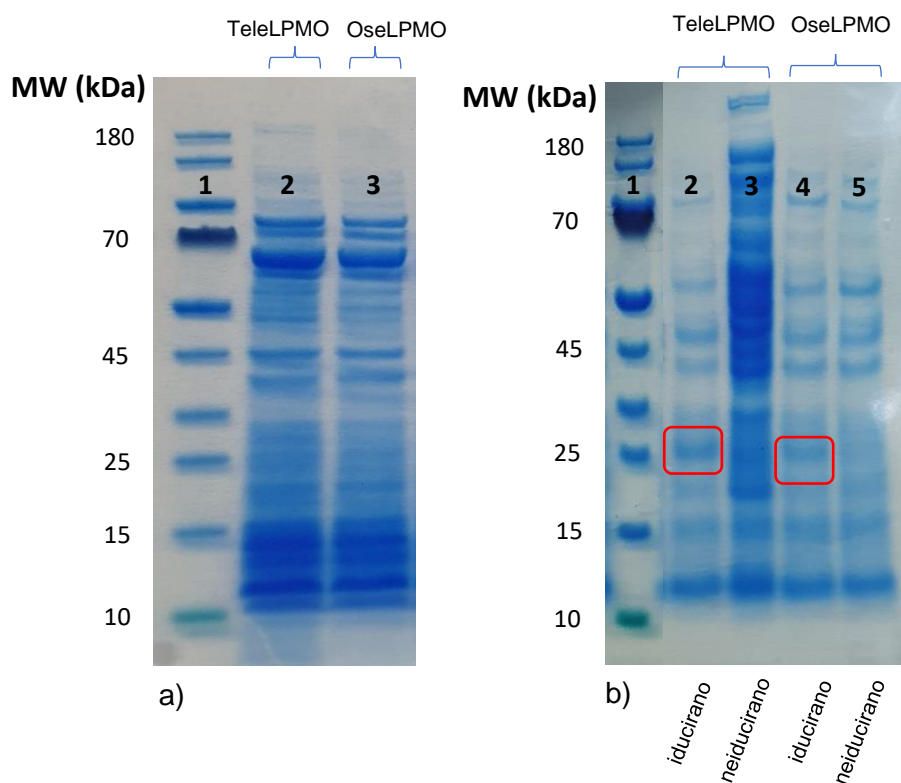
Kako je veličina linearne mRNA sekvence *Tma12* 651 bp (NCBI JQ438776), očekivano su veličine homolognih sekvenci *TeleLPMO* i *OseLPMO* slične veličini sekvence *Tma12* (jažice 2, 3 i 4).



### 3. Ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih LPMO enzima

#### 3.1. Kultivacija *E. coli* BL21(DE3) s pET22b(+)-*TeleLPMO* ili *OseLPMO* i izolacija eksprimiranih LPMO

Nakon uspješne transformacije elektrokompetentnog soja *E. coli* BL21(DE3) (poglavlje 2.2.8.) i uzgoja ovih stanica na selektivnoj (ampicilin) LB podlozi, uzgojene su prekonoćne kulture kao inokulum za uzgoj ovih suspenzija u većem mjerilu i izolaciju LPMO, kako je već opisano u poglavlju 2.2.9. Određena je koncentracija izoliranih proteina (poglavlje 2.2.10.) te je procijenjena uspješnost pročišćavanja heterolognih proteina i procijenjena molekulska masa denaturiranih proteina (Slika 13.).



**Slika 13.** SDS-PAGE proteina tijekom ekspresije i pročišćavanja TeleLPMO i OseLPMO: (a) jažica 1, standard (*PageRuler™ Protein Ladder*); jažica 2, supernatant nakon razbijanja stanica s TeleLPMO; jažica 3, supernatant nakon razbijanja stanica s OseLPMO; (b) jažica 1, standard

(PageRuler<sup>TM</sup> Protein Ladder); jažica 2, TeleLPMO (< 25 kDa), inducirana kultura IPTG-om; jažica 3, neinducirana kultura IPTG-om; jažica 4, OseLPMO (< 25 kDa), inducirana kultura IPTG-om; jažica 5, neinducirana kultura IPTG-om.

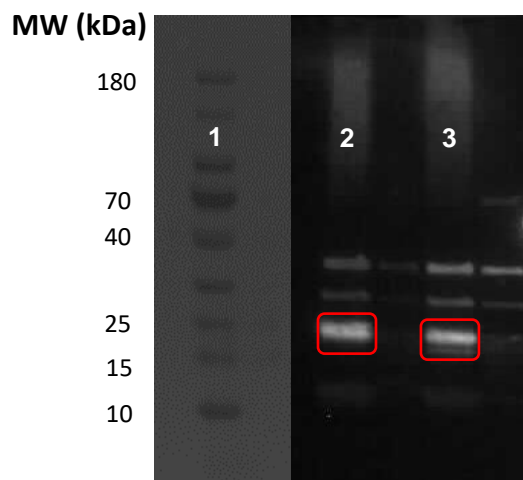
## **3.2. Pročišćavanje eksprimiranih LPMO i potvrda ekspresije ovih heterolognih proteina**

### **3.2.1. Pročišćavanje LPMO brzom tekućinskom kromatografijom**

Kromatografske metode koje se često koriste za pročišćavanje LPMO su: (i) afinitetna kromatografija (Vaaje-Kolstad i sur., 2005), (ii) gel filtracija (Karkehabadi i sur., 2008) i (iii) ionsko-izmjenjivačka kromatografija (Christensen i sur., 2021). U ovom istraživanju korištena je afinitetna kromatografija za izdvajanje rekombinantnih LPMO (TeleLPMO i OseLPMO) od preostalih proteina iz staničnog ekstrakta (poglavlje 2.2.13.). Brza tekućinska kromatografija (FPLC) omogućava reproducibilno izdvajanje proteina uz relativno velike brzine protoka (Madadlou, 2010). Uz oba LPMO gena (TeleLPMO i OseLPMO) dodana je sekvenca koja kodira za His-tag i to na C-kraju eksprimiranih proteina. Stoga su ovi proteini izdvojeni i pročišćeni u jednom koraku na temelju afiniteta histidina prema metalnim ionima nikla (Hemdan i sur., 1989; Gutiérrez i sur., 2006). LPMO s His-tagom su eluirani s kolone dodavanjem imidazola, koji se s većim afinitetom veže na ione nikla u koloni. Kromatogrami nisu prikazani.

### **3.2.2. Potvrda ekspresije TeleLPMO i OseLPMO Western blot metodom**

Kako su eksprimirani LPMO biljnog podrijetla, očekivano je da će ovi proteini imati molekulsku masu sličnu molekulskoj masi Tma12 (21,51 kDa), što je potvrđeno Western blot metodom (Slika 14.).



**Slika 14.** Analiza heterolognih LPMO - TeleLPMO i OseLPMO Western blot metodom. Jažica 1, standard (*GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder*), jažica 2, TeleLPMO (< 25 kDa), jažica 3, OseLPMO (< 25 kDa)

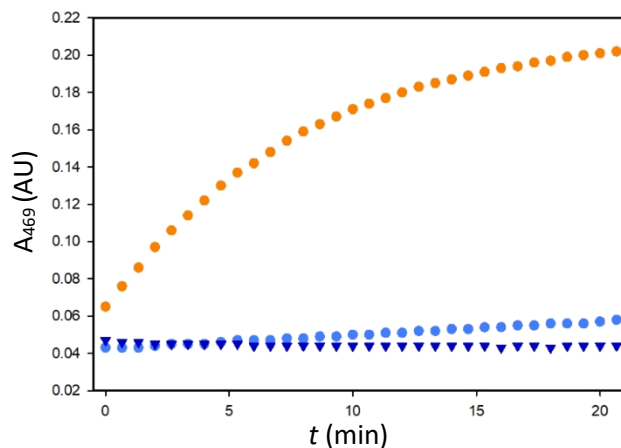
### 3.3. Određivanje enzimske aktivnosti TeleLPMO i OseLPMO

Specifičnost reakcija koje kataliziraju LPMO zapravo diktira metode za određivanje njihove aktivnosti uz korištenje supstrata - netopljivih kristaliničnih polimera, koji se u ovako kataliziranim reakcijama mogu razgraditi do topljivih oligomera ([Kojima i sur., 2016](#)). Identitet i koncentracija produkata ovih reakcija mogu se odrediti spektrometrijom masa ([Vajee-Kolstat i sur., 2010](#)) ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC; [Westereng i sur., 2013](#)). Ove su metode vremenski zahtjevne i mogu identificirati produkte enzimske reakcije niske molekulske mase, koji su topljivi. Kod ovih dugotrajnih i zahtjevnih metoda, supstrati - biopolimeri se najčešće inkubiraju u reakcijskim smjesama s LPMO pri definiranim uvjetima kroz dulje vremensko razdoblje (čak i do jednog dana), nakon čega je moguća kvantifikacija širokog spektra produkata – različitih topljivih oligomera. Dodatno, kod određivanja aktivnosti celulaza najčešće se kao supstrata koristi celuloza, koja se prethodno tretira fosforom kiselinom. Ovako priređena celuloza nije prirodan supstrat za LPMO, pa je ovako određena enzimska aktivnost zapravo podcijenjena.

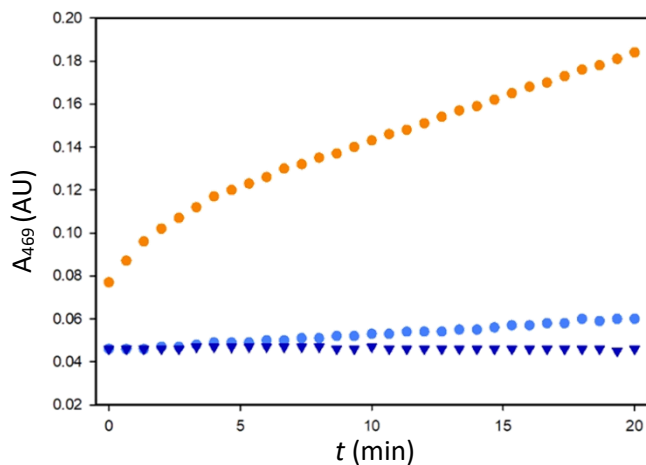
Naredna metoda, koja se također može koristiti za procjenu aktivnosti LPMO, je NMR. Ovom se metodom uspješno mogu identificirati produkti enzimske reakcije, ali se ne može odrediti aktivnosti ovih enzima u klasičnom smislu (Isaksen i sur., 2014).

Stoga je u ovom istraživanju korištena brza i jednostavna spektrofotometrijska metoda za određivanje aktivnosti heterolognih LPMO (Breslmayr i sur., 2018). Ova se metoda zasniva na korištenju analoga supstratu - 2,6-DMP i kosupstrata  $H_2O_2$ , kako je u detalje opisano u poglavlju 2.2.15. Ovom se metodom određuje peroksid-ovisna i supstrat-neovisna aktivnost LPMO, pri čemu se zapravo određuje integritet aktivnog mjesta LPMO. Dakle, u ovoj reakcijskoj smjesi LPMO katalizira oksidaciju supstrata (2,6-DMP) i tako formiranog 2,6-dimetoksifenol radikala do produkta – cerulignona, koji apsorbira svjetlost valne duljine 469 nm.

Kako su TeleLPMO i OseLPMO eksprimirani kao apoenzimi (Staiano i sur., 2013), potrebna je njihova inkubacija s  $CuSO_4$  - izvorom  $Cu^{2+}$  iona, čime je omogućeno formiranje holoenzima (poglavlje 2.2.14.). Kako ioni bakra interferiraju s apsorbancijom svjetlosti pri 469 nm, nakon formiranja holoenzima uklonjeni su nespecifično vezani  $Cu^{2+}$  ioni (poglavlje 2.2.15.). Nakon toga je bilo moguće odrediti aktivnost heterolognih TeleLPMO i OseLPMO ovom brzom spektrofotometrijskom metodom (Slike 15. i 16.).



**Slika 15.** Povećanje apsorbancije reakcijske smjese za određivanje aktivnosti TeleLPMO pri 469 nm ( $A_{469}$ ; AU) tijekom vremena ( $t$ , min) kao posljedica povećanja koncentracije produkta cerulignona (●). Kontrole: reakcija bez enzima (▼) i reakcija s EDTA (●).



**Slika 16.** Povećanje apsorbancije reakcijske smjese za određivanje aktivnosti OseLPMO pri 469 nm ( $A_{469}$ ; AU) tijekom vremena ( $t$ , min) kao posljedica povećanja koncentracije produkta cerulignona (●). Kontrole: reakcija bez enzima (▼) i reakcija s EDTA (●).

U oba slučaja, može se uočiti značajan porast  $A_{469}$ . Budući da se odredila aktivnost dosad neokarakteriziranih LPMO, kontrolnim eksperimentima potvrđeno je da supstrat ili kosupstrat nemaju utjecaja na određivanje aktivnosti ovom metodom. Dakle, peroksidazna aktivnost uspješno eksprimiranih i pročišćenih holoenzima TeleLPMO i OseLPMO iz dviju vrsta paprati posjeduju aktivnost i tipične su LPMO. Nakon karakterizacije Tma12, ovo su prva takva istraživanja i temeljita karakterizacija dvaju LPMO, koji imaju potencijal za primjenu u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji.

## ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata opisanih u ovome radu, može se zaključiti, kako slijedi:

1. Po prvi puta je uspoređeno 170 odabranih sekvenci bakterijskih litičkih polisaharidnih monooksigenaza (LPMO) i potencijalnih biljnih LPMO s jedinom do sada poznatom sekvencom LPMO iz paprati *Tectaria macrodonta* (Tma12) i načinjeno je filogenetsko stablo srodnosti ovih biljnih proteina.
2. Odabrane su dvije potencijalne LPMO iz paprati - jedna iz *Thyrsopteris elegans* (TeleLPMO), koja dijeli visoku homologiju s Tma12, i druga iz *Onoclea sensibilis* (OseLPMO), koja ima nisku homologiju s Tma12, i ova dva heterologna proteina su uspješno eksprimirana u stanicama *E. coli* BL21 (DE3). Porijeklo i rasprostranjenost ovih paprati (*Tectaria macrodonta* – Indija; *Thyrsopteris elegans* – Južna Amerika i *Onoclea sensibilis* – Sjeverna Amerika) potvrđuje hipotezu o globalnoj rasprostranjenosti LPMO biljnog podrijetla.
3. Optimizirana je brza i precizna spektrofotometrijska metoda za praćenje aktivnosti ovih pročišćenih enzima, kojom se prati konverzija 2,6-dimetoksifenola u prisutnosti kosupstrata ( $H_2O_2$ ) u cerulignon, čime se zapravo izbjegla zahtjevna i dugotrajna kvantifikacija netopljivih prirodnih susprata (npr. celuloze) i/ili cijelog niza (ne)topljivih produkata ove enzimske reakcije (polisaharida i oligosaharida). Ovom je metodom potvrđena peroksidazna aktivnost TeleLPMO i OseLPMO, čime su ova dva enzima uspješno okarakterizirana kao tipični LPMO.
4. Nakon karakterizacije Tma12, ovo su prva takva istraživanja i opsežna karakterizacija dvaju LPMO - TeleLPMO i OseLPMO, koji imaju izuzetan potencijal za primjenu u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji.

## ZAHVALE

*Najprije se zahvaljujem Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Robertu Kouristu što mi je pružio priliku da pod njegovim mentorstvom, na Institutu za Molekularnu Biotehnologiju, Tehničkog Sveučilišta u Grazu, provodim znanstvena istraživanja.*

*Iznimno se zahvaljujem mentoru Dr.Sc Danielu Kracheru, za kontinuiranu pomoć i vođenje kroz eksperimentalni dio ovog znanstvenog istraživanja. Omogućio mi je, pod vrhunskim vodstvom, samostalan rad i razvijanje kritičkog mišljenja. Ali, prvenstveno je bio prijatelj, kojeg sam uvijek mogla zatražiti za pomoć.*

*Nadalje, htjela bih se zahvaliti prof. dr. sc. Aniti Slavica, što mi je omogućila odlazak na Institut za Molekularnu Biotehnologiju te da pod njenim mentorstvom prijavim ovaj rad na natječaj za Rektorovu nagradu.*

*Zahvaljujem se svim članovima Instituta, na stalnoj pomoći, savjetima, strpljivosti i susretljivosti, a da su pritom bili nevjerojatni prijatelji i ponajprije ljudi.*

*Ogromna hvala mojim roditeljima, obitelji i prijateljima što su me podupirali kroz godinu dana života izvan vlastitog doma, na neopisivoj ljubavi i na tome što su uvijek raširenih ruku čekali da se vratim.*



## POPIS LITERATURE

Anandan R, Dharumadurai D, Manogaran G (2016) An Introduction to Actinobacteria. U: Dhanasekaran D, Jiang Y (ured.), *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, *IntechOpen*, 1. izd., str. 3-37.

Askarian F, Uchiyama S, Masson H, Sørensen HV, Golten O, Bunæs AC i sur. (2021) The lytic polysaccharide monooxygenase CbpD promotes *Pseudomonas aeruginosa* virulence in systemic infection. *Nat Commun.* **12**, 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21473-0>

Bissaro B, Røhr AK, Müller G, Chylenski P, Skaugen M, Forsberg Z i sur. (2017) Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nat Chem Biol.* **13**, 1123–1128. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2470>

Book AJ, Yennamalli RM, Takasuka TE, Currie CR, Phillips GN, Fox BG (2014) Evolution of substrate specificity in bacterial AA10 lytic polysaccharide monooxygenases. *Biotechnol Biofuels.* **7**, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-109>

Brennana L, Owendea P (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew Sust Energ Rev.* **14**, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>Get rights and content

CAZY (2005) GH61. CAZy-the Carbohydrate-Active enZymes Database, <http://www.cazy.org/GH61.html>. Pristupljeno 1. Svibnja 2022.

Brown K, Harris P, Zaretsky E, Re E, Vlasenko E (2008) Polypeptide from a cellulolytic fungus having cellulolytic enhancing activity. Patent US0050191736A1

Christensen IA, Eijsink VGH, Aachmann FL, Courtade G (2021) <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N resonance assignment of the apo form of the small, chitin-active lytic polysaccharide monooxygenase JdLPMO10A from *Jonesia denitrificans*. *Biomol NMR Assign.* **15**, 79-84. <https://doi.org/10.1007/s12104-020-09986-z>

Courtade G, Ciano L, Paradisi A, Lindley P J, Forsberg Z, Sørli M, i sur. (2020) Mechanistic basis of substrate-O<sub>2</sub> coupling within a chitin-active lytic polysaccharide monooxygenase: An integrated NMR/EPR study. *P Natl Acad Sci-Biol.* **117**, 19178-19189. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004277117>

Dagert M, Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* **6**, 23-28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(79\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(79)90082-9)

Dahman Y, Dignan C, Fiayaz A, Chaundhry A (2019) An Introduction to Biofuels, Foods, Livestock, and Environment. U: Verma D, Fortunati E, Jain S, Zhang X (ured.), 1.izd., Woodhead Publishing, str. 241-276.

Desjardins P, Hansen JB, Allen M (2009) Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer. *J Vis Exp.* **33**, 1-3. <https://doi: 10.3791/1610>

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD i sur. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* **13**, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

Dubey GP, Ben-Yehuda S (2011) Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell.* **144**, 590-600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>

Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* **5**, 1-19. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>

Reese ET, Siu RGH, Levinson HS (1950) The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivates and its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis. *J Bacteriol.* **59**, 485–497, <https://doi.org/10.1128/jb.59.4.485-497.195>

Ferrer M, Chernikova T, Yakimov M (2003) Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat Biotechnol.* **21**, 1266-1267. <https://doi.org/10.1038/nbt1103-1266b>

Fan L, Zhang Y, Liu S, Zhou N, Chen P, Cheng Y i sur. (2017). Bio-oil from fast pyrolysis of lignin: Effects of process and upgrading parameters. *Bioresource Technology.* **241**, 1118-1126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.129>

Finn RD, Clements J, Eddy SR (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* **39**, 29-37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>

Frommhagen M, Mutte SK, Westphal AH, Koetsier MJ, Hin SWA, Visser J (2017) Boosting LPMO-driven lignocellulose degradation by polyphenol oxidase-activated lignin building blocks. *Biotechnol Biofuels.* **10**, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0810-4>

Frommhagen M, Westphal AH, van Berkel WJH, Kabel MA (2018). Distinct substrate specificities and electron-donating systems of fungal lytic polysaccharide monooxygenases. *Front. Microbiol.* **9**, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01080>

Gutiérrez R, Martín del Valle EM, Galán MA (2007) Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends, *Sep Purif Rev.* **36**, 71-111. <https://doi.org/10.1080/15422110601166007>

Hemdan ES, Zhao YJ, Sulkowski E, Porath J (1989) Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 1811–1815. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.6.1811>

Hemsworth GR, Henrissat B, Davies GJ, Walton PH (2014) Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nat Chem Biol.* **10**, 122-126. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1417>

Hengen PN, (1995) Electro-transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA, *Trends Biochem Sci.* **20**, 248-249. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89028-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89028-3)

Hoell IA, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VGH (2019) Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. *Biotechnol Genet Eng.* **27**, 331–366. <https://doi.org/10.1080/02648725.2010.10648156>

Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VGH (2019) Novel Enzymes for the Degradation of Cellulose. *Biotechnol Biofuels.* **5**, 317-325. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-45>

Hrvatska enciklopedija (2021) Lignin. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=36462>.  
Pristupljeno 13. lipnja 2022.

Hrvatska enciklopedija (2021) Pektini. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=47363>.  
Pristupljeno 13. lipnja 2022.

IUBMB (2017) Lytic chitin monooxygenase. IUBMB-International Unit for Biochemistry and Molecular Biology, <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC1/14/99/54.html>. Pristupljeno 1. Svibnja 2022.

Isaksen T, Westereng B, Aachmann FL, Agger JW, Kracher D, Kittl R (2014) A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. *J Biol Chem.* **289**, 2632–2642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530196>

Jeswani HK, Chilver A, Azapagic A (1992) Environmental sustainability of biofuels: a review. *Proc. R. Soc. A.* **476**, 1-37. <https://doi.org/10.1098/rspa.2020.0351>

Johnston EM, Davies GJ, Walton PH (2022) Cellulose- Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/cellulose>. Pristupljeno 24. svibnja 2022.

Karkehabadi S, Hansson H, Kim S, Piens K, Mitchinson C, Sandgren M (2008) The First Structure of a Glycoside Hydrolase Family 61 Member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å Resolution. *J Mol Biol.* **383**, 144-154. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.016>

Karlsson J, Saloheimo M, Siika-Aho M, Tenkanen M, Penttilä M, Tjerneld. F (2001) Homologousexpression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6498–507. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02605.x>

Kim SR, Ha SJ, Wei N, Oh EJ, Jin YS (2012) Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.* **30**, 274–282. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2012.01.005>

Kojima Y, Várnai A, Ishida T, Sunagawa N, Petrovic DM, Igarashi K, Jellison J i sur. (2016) A lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Xyloglucan Specificity from the Brown-Rot Fungus

*Gloephyllum trabeum* and Its Action on Cellulose-Xyloglucan Complexes. *Appl Environ Microb.* **82**, 6557-6572. <https://doi.org/10.1128/AEM.01768-16>

Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B (2013) Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels.* **6**, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>

Li Y, Liu X, Liu M, Wang Y, Zou Y, You Y (2020) *Magnaporthe oryzae* auxiliary activity protein MoAa91 functions as chitinbinding protein to induce appressorium formation on artificial inductive surfaces and suppress plant immunity. *mBio.* **11**, 1-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03304-19>

Lehman C, Eckley N (2021) Biofuel. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/technology/biofuel>. Pristupljeno 2. svibnja 2022.

Mansfeld DS, Meder R (2003) Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. *Cellulose.* **10**, 196-169. <https://doi.org/10.1023/A:1024022710366>

Memelink J, Sword KMM, Staehelin LA, Hopem JHC (1994) Southern, Northern and Western blot analysis. U: Gelvin SB, Schilperoort RA (ured.) *Plant Molecular Biology Manual*, 2. Izd., Springer Science+Business Media, str. 273-279.

Matod F (2006) *Thyrsopteris elegans*- Ferns and Lycophytes of the World. <https://www.fernsoftheworld.com/2014/11/05/thyrsopteris-elegans/>. Pristupljeno 10. svibnja 2022.

Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK (2010) Production of first- and second-generation biofuels: A comprehensive review. *Renew Sust Energ Rev.* **14**, 578-597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>

Nguyen Q, Bowyer J, Howe J, Bratkovich S, Groot H, Pepke E i sur. (2017) Global Production of Second-generation Biofuels: trends and Influences. *Doventail Partners*, 1-15. <https://dovetailinc.org/upload/tmp/1579558792.pdf>

One Thousand Plant Transcriptomes Initiative (2019) One thousand plant transcriptomes and the phylogenomic of green plants. *Nature*. **574**, 679–685. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1693-2>

Pontis H (2016) Plants, Green Algae and Cyanobacteria, 1. izd., Academic Press, str. 45-63.

Pontis HG, Madadlou A, O'Sullivan S, Sheehan D (2011) Fast Protein Liquid Chromatography. U: Walls D, Loughran S, (ured.) Protein Chromatography. Methods in Molecular Biology (methods and Protocols). Humana Press, str. 439-447.

Pinske C, Bönn M, Krüger S, Lindenstrauß U, Sawers RG (2011) Metabolic Deficiencies Revealed in the Biotechnologically Important Model Bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). *PLoS ONE*. **6**, 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022830>

Raguz S, Yagüe E, Wood DA, Thurston CF (1992) Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*. *Gene*. **119**, 183–190. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90270-y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90270-y)

Rathinasabapathi B (2006) Ferns Represent an Untapped Biodiversity for Improving Crops for Environmental Stress Tolerance. *New Phytol*. **172**, 385–390. <http://www.jstor.org/stable/4131224>

Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*: Advances and Challenges. *Front Microbiol*. **5**, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

Schein C (1989) Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *Nat Biotechnol*. **7**, 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/nbt1189-1141>

Somerville, C., (2007) Biofuels. *Curr Biol*. **17**, 115-119. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.010>

Simmons TJ, Frandsen KEH, Ciano L, Tryfona T, Lenfant N, Poulsen JC i sur. (2017) Structural and electronic determinants of lytic polysaccharide monooxygenase reactivity on polysaccharide substrates. *Nat Commun*. **8**, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01247-3>

Sims RE, Mabee W, Saddler JN, Taylor M (2010). An overview of second-generation biofuel technologies. *Bioresour Technol*. **101**, 1570–1580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>

Staiano M, Pennacchio A, Varriale A, Capo A, Majoli A, Capacchione C i sur. (2017) Enzymes as Sensors. *Method Enzymol.* **598**, 115-131. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.01.015>

Swords, W.E. (2003). Chemical Transformation of *E. coli*. U: Casali, N., Preston, A. (ured.) *E. coli* Plasmid Vectors. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>. Humana Press, str. 49-53.

Tandrup T, Frandsen KEH, Johansen KS, Berrin JG, Leggio LL (2018) Recent insights into lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). *Biochem Soc Trans.* **46**, 1431-1447. <https://doi.org/10.1042/BST20170549>

Tian C, Beeson WT, Iavarone AT, Sun J, Marletta MA (2009) Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 22157–22162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906810106>

Vaaje-Kolstad G, Houston DR, Riemens AHK, Eijsink VGH, van Aalten DMF (2005) Crystal Structure and Binding Properties of the *Serratia marcescens*. *J Biol Chem.* **280**, 11313-11319. <http://doi.org/10.1074/jbc.M407175200>

Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sorlie M i sur. (2010) An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science.* **330**, 219–222. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1192231>

Voshol, G.P., Punt, P. J., Vijgenboom, E. (2019) Profile Comparer Extended: phylogeny of lytic polysaccharide monoxygenase families using profile hidden Markov model alignments. *F1000Research.* **8**, 1-17. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21104.1>

Voytas D (1992) Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Immunology.* **2**, 10.4.1-10.4.8. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1004s02>

Walker JM (2002) *The Protein Protocols Handbook*, 2. izd., Humana Press, str. 61-67.

Warren CM, Krzesinski PR, Greaser ML (2003) Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis.* **24**, 1695-1702. <https://doi.org/10.1002/elps.200305392>

wwPDB consortium. (2019) Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Res.* 47, 520-528. <https://doi.org/10.1093/nar/gky949>

Yoon SH, Waters CM (2019) *Vibrio cholerae*. *Trends Microbiol.* **27**, 806-807. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.005>



## SAŽETAK

### Mirna Larva

#### Ekspresija Rekombinantnih Litičkih Polisaharidnih Monooksigenaza iz Paprati

Kontrolirana enzimaska razgradnja izuzetno otpornih biopolimera otvara nove mogućnosti u korištenju obnovljivih bioloških resursa i tako utire put tranziciji gospodarstva temeljenog na fosilnim gorivima u održivo (bio)gospodarstvo, koje se zasniva na obnovljivim izvorima energije. Nedavno okarakterizirana zasebna grupa enzima - litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO) ima ključnu ulogu u razgradnji organskih polimera iz prirode i time su ovi enzimi izazvali izniman interes u akademskoj zajednici i biotehnološkoj industriji. Aktivnost LPMO obuhvaća snažan redoks mehanizam, koji omogućava dekonstrukciju, dekrystalizaciju i razgradnju teško razgradljivih prirodnih polisaharida, poput celuloze i hitina. Mehanizam LPMO kataliziranih reakcija identificiran je kod različitih oblika života (npr. virusa, bakterija, gljivica, insekata, biljki). Novija istraživanja upućuju na postojanje bioloških funkcija ovih enzima izvan okvira razgradnje polisaharidnih supstrata. Jedini dosad okarakteriziran LPMO biljnog podrijetla je enzim iz paprati *Tectaria macrodonta* (Tma12), koji je kandidat za primjenu u biološkim insekticidima. Naime, Tma12 može razgraditi drugi najzastupljeniji biopolimer u prirodi - hitin te se stoga može primijeniti u zaštiti biljaka i u sprječavanju razvoja ličinki kukaca.

U ovome istraživanju dostupne RNA sekvence možebitnih LPMO su preuzete iz različitih baza podataka, formirano je filogenetičko stablo uz korištenje sekvence Tma12 kao predložka i tako je identificirano više od 40 potencijalnih biljnih LPMO. Osim *T. macrodonta*, odabrane su dvije dodatne vrste paprati - *Onoclea sensibilis* i *Thyrsopteris elegans* kao izvori LPMO, i ovi su enzimi nazvani OseLPMO i TeleLPMO. Oba LPMO gena (*OseLPMO* i *TeleLPMO*), koja kodiraju za ove enzime, uspješno su eksprimirana u bakteriji *Escherichia coli* BL21(DE3) i proteini su pročišćeni afinitetnom kromatografijom. Razvijena je, optimizirana i primijenjena jednostavna i brza spektrofotometrijska metoda za praćenje aktivnosti ovih enzima. Tako je, uz *Western blot* analizu, ovom metodom potvrđena aktivnost dvaju funkcionalnih heterolognih LPMO - OseLPMO i TeleLPMO.

Ključne riječi: razgradnja biopolimera, litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO), paprati

## SUMMARY

### Mirna Larva

#### Expression of Recombinant Lytic Polysaccharide Monooxygenases from Ferns

Controlled enzymatic degradation of highly resistant biopolymers opens up new possibilities in using renewable biological resources, paving the way to transition from a fossil fuel-based economy to a sustainable (bio)economy based on renewable energy sources. Recently characterized a separate group of enzymes - lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) play a key role in the degradation of organic polymers from nature, and thus, these enzymes have aroused tremendous interest in academia and the biotechnology industry. LPMO activity involves a powerful redox mechanism, which enables the deconstruction, decrystallization, and degradation of difficult-to-degrade natural polysaccharides, such as cellulose and chitin. The mechanism of LPMO catalyzed reactions has been identified in various life forms (e.g. viruses, bacteria, fungi, insects, plants). Recent research suggests the existence of biological functions of these enzymes outside the framework of the degradation of polysaccharide substrates. The only plant-derived LPMO characterized to date has been the fern *Tectaria macrodonta* enzyme (Tma12), which is a candidate for use in biological insecticides. Namely, Tma12 can degrade the second most common biopolymer in nature - chitin and can therefore be used in plant protection and in preventing the development of insect larvae.

In this study, the available RNA sequences of possible LPMOs were taken from various databases, a phylogenetic tree was formed using the Tma12 sequence as a template, and more than 40 potential plant LPMOs were identified. In addition to *T. macrodonta*, two additional species of ferns were selected - *Onoclea sensibilis* and *Thyrsopteris elegans* as sources of LPMO, and these enzymes were named OseLPMO and TeleLPMO. Both LPMO genes (*OseLPMO* and *TeleLPMO*), which encode these enzymes, were successfully expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and the proteins were purified by affinity chromatography. A simple and fast spectrophotometric method for monitoring the activity of these enzymes has been developed, optimized and applied. Thus, together with Western blot analysis, this method confirmed the activity of two functional heterologous LPMOs - OseLPMO and TeleLPMO.

Keywords: biopolymer degradation, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO), ferns