

RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ

01.09.2020 – 31.12.2020

Cod proiect	PN-III-P1-1.1-PD-2019-1222/ PD 98
Titlul proiectului (în română)	Ingineria proteică a decarboxilazei acidului ferulic din <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Titlul proiectului (în engleză)	Protein ENgineering of Ferulic acid DeCarboxylase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Acronimul proiectului	PEN-FDC

Etapa 1. Crearea unui sistem de expresie bacterian heterolog pentru ScFDC1

Activitatea 1.1 Clonarea moleculară a ScFDC1 și (t)PAD1 în diferiți vectori de expresie

În procesul de decarboxilare al derivațiilor de acid ferulic, acid *p*-cumaric sau al altor substraturi similare precum derivații de acizi cinamici, sunt necesare o decarboxilază a acidului ferulic din *Saccharomyces cerevisiae* (ScFDC1) și o decarboxilază a acidului fenil acrilic (PAD1) care furnizează flavin nucleotidă prenilată (prFMN).^(1,2)

Pentru obținerea acestor enzime s-a recurs la crearea unui sistem de expresie bacterian holo-ScFDC1 prin clonarea separată sau împreună a genelor (*t*)*pad1* și *fdc1* în diferiți vectori de expresie.

Gena trunchiată *tpad1* derivă din gena *pad1* în urma eliminării unei secvențe semnal de la capătul N-terminal (aminoacizii 1-69).⁽³⁾ Conform literaturii de specialitate forma trunchiată este mai activă în comparație cu proteina de lungime completă.⁽⁴⁾

Strategia de clonare a avut ca și scop obținerea a trei vectori de expresie: pCDFDuet1 cu gena *fdc1*, pCDFDuet1 cu genele *fdc1+pad1* și pCDFDuet1 cu genele *fdc1+tpad1*.

Vectorul pCDFDuet-1 conținând două situri multiple de clonare (MCS) precum și genele *fdc1*, *pad1* și *tpad1* au fost disponibile în cadrul centrului de cercetare Biocataliză și Biotransformări celulare.



Figure 1. Hărțile vectorilor de expresie: **a)** vectorul pCDFDuet1 vector având gena pentru *fdc1* și poziția situsurilor de restricție a genei, respectiv primeri de verificare a insertului *fdc1*.

b) vectorul pCDFDuet1 cu gena *fdc1* și gena *tpad1* și poziția situsurilor de restricție a genei *tpad1*, respectiv primeri de verificare a insertului *tpad1*.

Gena *fdc1* a fost introdusă în situsul de multiclonare (MCS1) a vectorului pCDFDuet1 prin tehnica clonării direcționate. Compoziția sistemului de ligare a fost: 8 μ L din soluția de vector pCDFDuet1 de 15

μg/μL cu situsurile de restricție Sall și HindIII, 16 μL insert de 28 μg/μL, 3 μL ADN T4 ligaza, 5 μL soluție tampon de ligare; reacția de ligare s-a desfășurat la 4 °C, peste noapte.

Pentru verificarea clonării, 3 μL din reacția de ligare, a fost introdusă, prin șoc termic în celulele bacteriene chemocompetente *E. coli* XL-1 Blue. Câteva dintre coloniile obținute peste noapte la 37 °C, pe o placa LB-agar tratată în prealabil cu streptomycină 30 μg/mL (STR) și tetraciclină 12,5 μg/mL (TC) pentru selecție, au fost verificate prin tehnica PCR (figura 3) folosind ca și primeri de amplificare, T7_for și Duet_DOWN1 (tabel 1.)

Pentru introducerea genei *pad1* respectiv *tpad1* în al doilea sistem de clonare (MCS2) s-au parcurs următoarele etape:

- cu o colonie pozitivă din etapa de mai sus, s-a inoculat 5 mL de mediu suplimentat cu STR 30 μg/mL și TC 12,5 μg/mL și carbenicilină 50 μg/mL (CAR), iar după 6 ore de la incubarea la 37 °C, 200 rpm s-a realizat extracția plasmidei pCDFDuet1- FDC1.
- genele *pad1* și *tpad1* au fost amplificate prin tehnica PCR (figura 3B.) pentru obținerea situsurilor de restricție NdeI și XhoI folosind primeri PAD1_for1, tPAD1_for2 și tPAD1_rev2 (tabel 1.)
- enzimele de restricție *NdeI* și *XhoI* au fost folosite pentru a crea capete coezive atât în cazul vectorului CDFDuet1-FDC1, acționând în regiunea MCS2 cât și asupra genelor *pad1* și *tpad1*.
- s-a continuat cu extracția vectorului și inserării din gelul de agaroză urmând etapa de ligare și transformare în celulele bacteriene chemocompetente *E. coli* XL-1 Blue conform paragrafelor 6-7.
- s-a verificat reacția de ligare prin tehnica *colony PCR* folosind primerii de amplificare Duet-UP1 și T7-rev (tabel 1).

Vectorii obținuți: pCDFDDuet1- FDC1, pCDFDDuet1- FDC1-PAD1 și pCDFDDuet1- FDC1-tPAD1 au fost introduși prin șoc termic în celulele competente *E. coli* Rosetta și BL21(DE3), BL21 Gold C41(DE3), Rosetta DE3 pLysS în vederea etapei de optimizare a exprimării enzimelor.

O altă strategie de clonare a avut ca scop obținerea de vectori pET19b-PAD1 și pET19b-tPAD1 (figura 2B.), pentru a urmări și nivelul de expresie a enzimelor PAD1 și tPAD1. Deoarece vectorul pCDFDuet1 conține eticheta de 6 Histidine⁽⁵⁾ doar la capătul N-terminal - MCS-1, purificarea proteinei folosind cromatografia de ion imobilizată (Ni-NTA)⁽⁶⁾ se poate realiza doar pentru enzima FDC1, nu și pentru enzimele tPAD1 și PAD1.

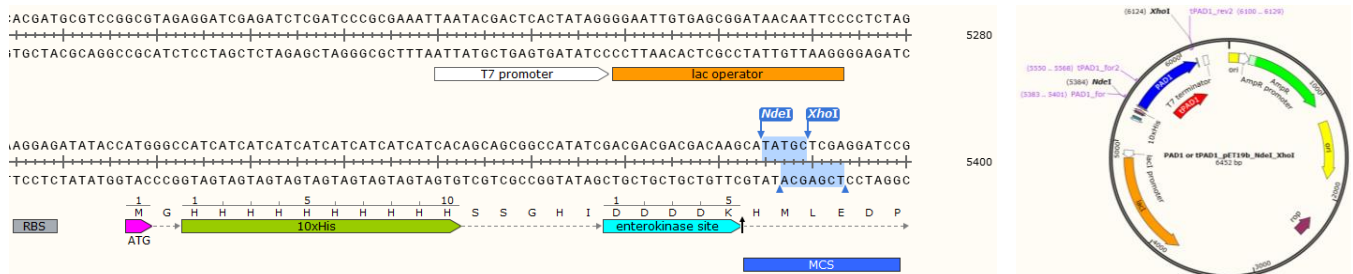


Figura 2. Caracteristicile vectorului pET19b
a) Reginea His-tag, MCS, situsurile de restricție NdeI și XhoI din vectorul gol de pET19b.

b) vectorul pET19b vector purtând gena *pad*. și poziția situsurilor de restricție a genei

În primă etapă vectorul expresie pET19b (+) a fost digerat cu enzimele de restricție *NdeI* și *XhoI* și introdus în amestecul de ligare urmat de genele *pad1* și *tpad1* având situsurile de restricție *NdeI* și *XhoI* obținute de la clonarea anterioară.

După etapa de transformare a produsului în celulele bacteriene chemocompetente *E. coli* XL-1 Blue și creștere pe un mediu LB-agar suplimentat de data aceasta cu tetraciclină 12,5 μg/mL și carbenicilină 50 μg/mL, un număr de 4 colonii au fost verificate prin metoda *colony PCR* folosind primerii T7 prom și AvPAL_seq3R (T7-rev).

Gelurile de agaroză de 1% (figura 3) confirmă clonarea cu succes a genelor (*t*)*pad1* și *fdc1* în diferiți vectori de expresie.

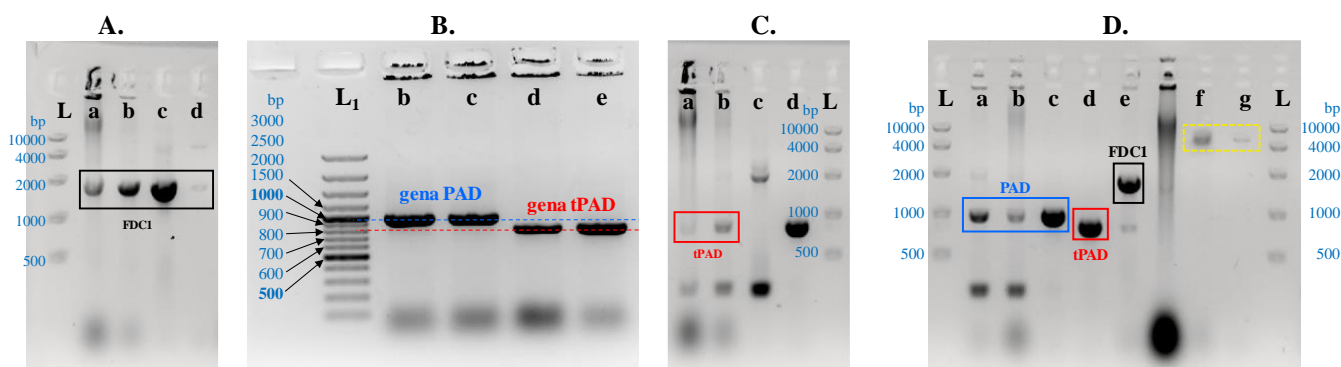


Figura 3. Gelul de agaroză de 1%. **A.** Se confirmă prezența genei *fdc1* (1757 bp) în vectorul de pCDFDuet-1, **L** – markerul, **a, b, c** și **d** = colonii pozitive; **B.** gena PAD și tPAD în urma introducerii situsurilor de restricție *Nde*I și *Xho*I cu primerii corespunzători, în vederea izolării din gel și ligării în vectorul de pCDFDuet-1. **C.** Se confirmă prezența genei *tpad* (801 pb) în vectorul de pCDFDuet-1, **L** – markerul, **a** și **b** colonii pozitive; **c** = colonie pozitivă ce confirmă prezența genei *fdc1* cu T7-for și Duet-DOWN1. **D.** Se confirmă prezența genei *pad* (963 bp) pCDFDuet-1 prin coloniile **a, b, c; d** și **e** = gena *tpad* și gena *fdc1* ca și control după extracția din gel; **f** = vectorul pET19b-PAD, **g** = pCDFDDuet1- FDC1 vectorul, **L** – markerul.

Tabel 1. Lista de primeri folosiți în etapele de introducere a situsurilor de restricție și a verificării inserțiilor prin amplificarea acestora.

Primer	Secvența 5' - 3'
T7-for (prom)	5'AATACGACTCACTATAGGGGAATTG3'
Duet-DOWN1	5'GATTATGCGGCCGTGTACAA3'
Duet-UP2	5'TTGTACACGGCCGCATAATC3'
T7-rev	5'TGCTAGTTATTGCTCAGCGG3
PAD1_for1	5'CTAGGACATATGATGCTGCTGTTCC3'
tPAD1_for2	5'CTGTACATATGAAACGTATTGTGGTTGCG3'
tPAD1_rev2	5'AATACTCGAGACCGTCTATTGCTTTTGATACC3'.
T7 promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG GC-3'
AvPAL_seq3R (T7-rev)	5'-CTCAAGACCCGTTTAGAGG-3'

Plasmidele himerice obținute, pET19b-PAD1 și pET19b-tPAD1 au fost introduse în celulele competente *E. coli* Rosetta și BL21 (DE3), BL21 Gold C41(DE3), Rosetta DE3 pLysS atât separate cât și în combinație cu plamida pCDFDDuet1- FDC prin metoda co-transformării în vederea etapei de optimizare a exprimării enzimelor.

Rezultate: la finalul **activității 1.1.** s-au obținut cu succes două clone pentru co-exprimarea enzimelor FDC1 și (t)PAD1 folosind vectorul pCDFDDuet1 și două clone pentru co-exprimarea enzimelor FDC1 și (t)PAD1 folosind vectorul pET19b. Rezultatele obținute în această etapă de clonare a genelor în diferite sisteme de expresie reprezintă punctul de start pentru optimizarea exprimării *ScFDC1* și a (t)PAD1 prin tehnica western-blot, folosind anticorpul anti-His-IgG, care va permite detecția benzilor corespunzătoare unei enzime ce conține ancora His, prin analiză de chemoluminescență.

Rezultatele obținute au fost diseminate momentan în cadrul centrului de cercetare Biocataliză și Biotransformări celulare, urmând a fi valorificate ulterior prin publicații relevante.

Bibliografie

- (1) F. Lin, K. L. Ferguson, D. R. Boyer, X. N. Lin, E. N. G. Marsh, *ACS Chem. Biol.*, **2015**, 10, 1137–1144.
- (2) K. A. P. Payne, M. D. White, K. Fisher, B. Khara, S. S. Bailey, D. Parker, N. J. Rattray, D. K. Trivedi, R. Goodacre, R. Beveridge, P. Barran, S. E. J. Rigby, Nigel S. Scrutton, S. Hay, D. Leys, *Nature* **2015**, 522, 497–501
- (3) R. Nielsen, D. R. McKenna, *Metab. Eng.* **2011**, 544–554.
- (4) S. T. Ahmed, F. Parmeggiani, N. J. Weise, S. L. Flitsch, N. J. Turner, *ACS Catal.*, **2018**, 8 (4), 3129–3132
- (5) M.A. Jensen, M. Fukushima, R.W. Davis, *PLoS ONE* 2010 5(6): e11024.
- (6) A. J. Bornhorst, J. J. Falke, *Methods Enzymol.*, **2000**, 326, 245–254

Director Proiect,

Asist. Dr. FILIP ALINA

