

# RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ

01.01.2021 – 31.12.2021

Cod proiect	PN-III-P1-1.1-PD-2019-1222/ PD 98
Titlul proiectului (în română)	Ingenieria 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

Stirenul și derivații săi, monomeri valoroși din punct de vedere industrial, s-au dovedit recent relevanți într-o varietate de direcții de cercetare în chimie și biochimie care vizează punerea în operă a unor tehnologii durabile. Această clasă de compuși își găsește utilitate în sinteza fină de compuși cu activitate biologică,<sup>1,2</sup> ori ca intermediari în sinteza organică.<sup>3-6</sup>

Așadar, dezvoltarea unor metode alternative, ecologice, de obținere a stirenului este justificată de interesul pe care aceștia îl atrag în cercetarea științifică. Una dintre aceste metode este decarboxilarea enzimatică a diferiților acizi cinamici, varianta ce presupune o materie primă ieftină și nepoluantă, iar, ca biocatalizator, decarboxilaza acidului ferulic (FDC1).

## Etapa 2 - Optimizarea expresiei, producerea și purificarea ScFDC1, (t)PAD1 și holo-ScFDC1) și cartografierea situsului activ a enzimei ScFDC1

### Activitatea 2.1 - Optimizarea nivelurilor de expresie ale ScFDC1 și (t)PAD1

În a doua etapă a proiectului de cercetare s-a plecat de la stocurile în glicerol de celule competente obținute anterior prin metoda transformării și cotransformării plasmidelor purtătoare de gene *fdc1* și *(t)pad1*, uzând după caz (în funcție de tulpina *E. coli* folosită) de șoc termic și electroporare.

Tabelul 1. Stocurile de tulpini *E. coli* cu vectorii:

Nr.	Tulpina ( <i>E. coli</i> )	Vectorul 1	Vectorul 2	Gena 1	Gena 2
1	BL21 Gold	PAD1-pET19b	-	pad	-
2	BL21 Gold	tPAD1-pET19b	-	tpad	-
3	BL21 Gold	-	FDC1-pCDFDuet-1	-	fdc1
4	BL21 Gold	PAD1-pET19b	FDC1-pCDFDuet-1	pad	fdc1
5	BL21 Gold	tPAD1-pET19b	FDC1-pCDFDuet-1	tpad	fdc1
6	Rosetta DE3 pLysS	PAD1-pET19b	-	pad	-
7	Rosetta DE3 pLysS	tPAD1-pET19b	-	tpad	-
8	Rosetta DE3 pLysS	-	FDC1-pCDFDuet-1	-	fdc1
9	Rosetta DE3 pLysS	PAD1-pET19b	FDC1-pCDFDuet-1	pad	fdc1
10	Rosetta DE3 pLysS	tPAD1-pET19b	FDC1-pCDFDuet-1	tpad	fdc1
11	Rosetta DE3 pLysS	PAD1- FDC1-pCDFDuet-1		pad-fdc1	
12	Rosetta DE3 pLysS	tPAD1- FDC1-pCDFDuet-1		tpad-fdc1	

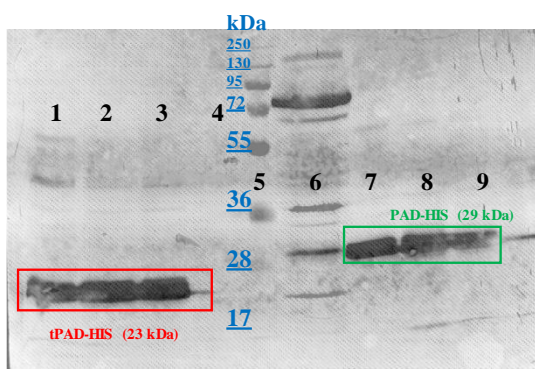
S-a studiat efectul diferitelor concentrații de inductor (0.1, 0.6 și 1 mM IPTG) și a temperaturii asupra nivelurilor de expresie ale enzimelor în diferite tulpini gazdă și vectori. Nivelurile de expresie ale proteinelor au fost determinate prin metoda Western Blot și SDS-PAGE.

Gelul de SDS-PAGE a fost transferat pe o membrană de difluorură de poliviniliden (PVDF) și supus migrării (în câmp electric) într-un sistem vertical timp de 10 minute. Membrana a fost incubată într-un tampon de blocare timp de 1 oră, 50 rpm și 25 °C și apoi spălată de 3 x timp de 5 minute cu 10 mL de PBS 1%.

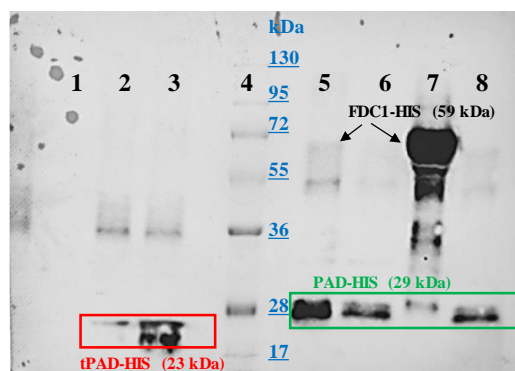
După aceea, a fost adăugat peste membrană anticorpul primar diluat, Anti His Ig Mouse, după care s-a reluat o nouă etapă de incubare (1 oră, 50 rpm și 25 °C) și o altă etapă de spălare (3 × pentru 5 min cu 10 mL de 1% PBS). O incubare finală cu anticorpul secundar Rb Anti-His Ig a avut loc în aceleași condiții ca și cel precedent, urmată de spălarea membranei.

În cele din urmă, membrana a fost incubată cu substrat Pierce ECL Western Blotting, urmată de detectarea chemiluminiscentei cu ChemiDoc™ Imaging System.

În figura 1 și 2 sunt prezentate rezultatele cele mai bune, obținute în urma mai multor încercări de optimizarea a expresiei proteinelor în diferite condiții.



**Figura 1.** Analiza Western Blot privind nivelul de expresie a proteinelor tPAD și PAD în tulpina BL21 Gold folosind 0,6 mM IPTG, concentrația de inductor și temperatura de expresie de 20 °C (probele 1 și 7), 25 °C (probele 2 și 8), și 30 °C (probele 3 și 9); 5. markerul de masa moleculară.



**Figura 2.** Analiza Western Blot cu nivelul de expresie a proteinelor tPAD, PAD și FDC1 folosind tulpina BL21 Gold cu vectorii tPAD/PAD1-pET19b + FDC1-pCDFDuet folosind 0,6 mM IPTG, la 25 °C.

1. înainte de inducție tPAD+FDC1; 2. 3 ore după inducție tPAD+FDC1; 3. 14 ore după inducție tPAD+FDC1; 5. 3 ore după inducție PAD+FDC1; 6. 14 ore după inducție PAD+FDC1; 7. Rosetta DE3 pLysS FDC1-pCDFDuet; 8. PAD în tulpina BL21 Gold; 4. markerul de masa moleculară.

### **Rezumatul pentru activitatea 2.1:**

În prezent, avem 5 stocuri de glicerol cu tulpina *E. coli* Rosetta DE3 pLysS a căror vectori de expresie conțin după caz una sau ambele gene. 7 stocuri de glicerol cu tulpina *E. coli* BL21 Gold a căror vectori de expresie conțin după caz una sau ambele gene conform tabelului 1.

A fost realizată cu success expresia celor trei proteine atât individual (în vectori de expresie cu un singur situs de clonare) cât și în vectori cu situs de clonare multiplu (MCS).

## Activitatea 2.2 - Producția și purificarea de holo-ScFDC1

S-a realizat purificarea individuală a enzimelor tPAD, PAD, FDC1 cât și sub forma de construct holo-ScFDC1 respectiv holo-ScFDC1 ținând cont de analiza Western Blot și respectiv pentru comparații ulterioare în termeni de puritate, stabilitate și activitate biocatalitică.

Astfel pentru obținerea acestora s-au testat mai multe metode de purificare și izolare iar protocolul care a oferit cea mai mare cantitate de proteină a fost cel descris în 2015 de Marsh și colaboratorii.<sup>7</sup>

Mediu LB steril (100 mL) suplimentat cu streptomicina (25 μg/mL) și cloramfenicol (30 μg/mL) a fost inoculat cu celule Rosetta tPAD-pET19b + FDC1-pCDFDuet și incubat peste noapte (37 °C, 200 rpm). 6 × 0,5 L de mediu LB steril au fost inoculați cu 2% (v/v) din cultura peste noapte și crescută la 37°C până când OD<sub>600</sub> a ajuns la 0,6 -0,7. Cultura celulară a fost indusă prin adăugarea a 100μL 0,6M IPTG și crescută la 25°C timp de încă 16 ore.

Celulele au fost recoltate prin centrifugare (30 min, 5000 rpm) și resuspendate în 50 mL tampon de liză (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 5% glicerol, pH 7.5) și supuse unei etape de distrugere prin ultrasonare (0.4 sec on/0.6 sec off) timp de 30 min. Înainte de ultrasonare, în suspensia celulară s-a mai adăugat: 1.14 mM PMSF, 0.015 mM Lysozyme, 0.003 mM RNase și o tabletă de inhibitor de protează (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail). Lizatul a fost centrifugat la 15000 rpm timp de 30 de minute iar supernatantul a fost utilizat pentru purificare ulterioară.

Purificarea enzimei holo-ScFDC1 este o etapă esențială în obținerea de biocatalizatori catalitic activi fapt pentru care enzimele marcate cu o etichetă de 6 Histidine au fost trecute printr-o coloană de afinitate Ni-NTA.

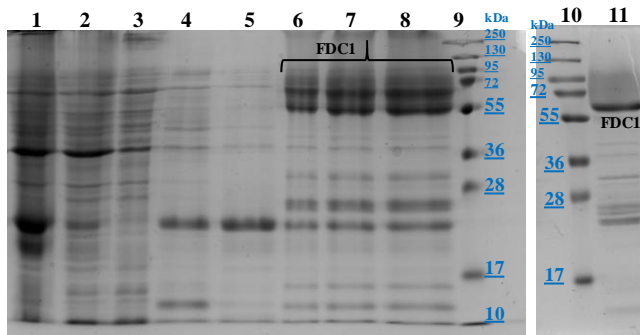
Faza staționară a coloanei a fost prespălată cu soluția tampon de PBS (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7.5). Spălarea fazei staționare după aplicarea supernatantului s-a făcut cu 20 mL din soluția de mai sus, apoi cu 10 mL soluție de liză celulară. Enzima a fost eluată cu 20 mL de soluție de imidazol (250 mM imidazol, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7.5).

Enzima a fost dializată în 5L soluție de dializă (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7.5).

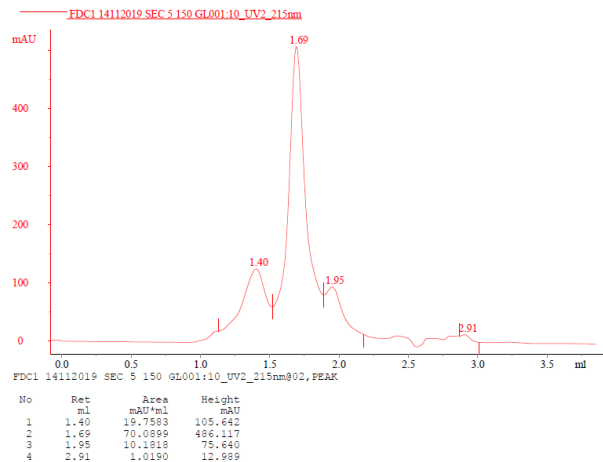
Concentrația de proteine a fost determinată prin metoda Bradford. Puritatea enzimei obținute a fost verificată prin electroforeză SDS-PAGE iar pentru analiza profilului soluției enzimaticice, pentru separarea formelor monomerice, tetramerice și agregate ale enzimelor s-a folosit cromatografia de excluziune sterică (Superdex 200 10/300 GL și Superdex 200 5/150 GL).

Cu toate că soluția proteică de FDC1 a fost obținută cu puritate ridicată conform figurii 4, cu masa moleculară de 57 kDa conform gelului de poliacrilamidă (figura 3 și 6), spectrul UV-vizibil al soluției enzimaticice cât și activitate specifică estimată a ~ 4,3±0,2 μmol stiren × min<sup>-1</sup> × mg<sup>-1</sup>,<sup>7</sup> nu au putut fi reproduse.

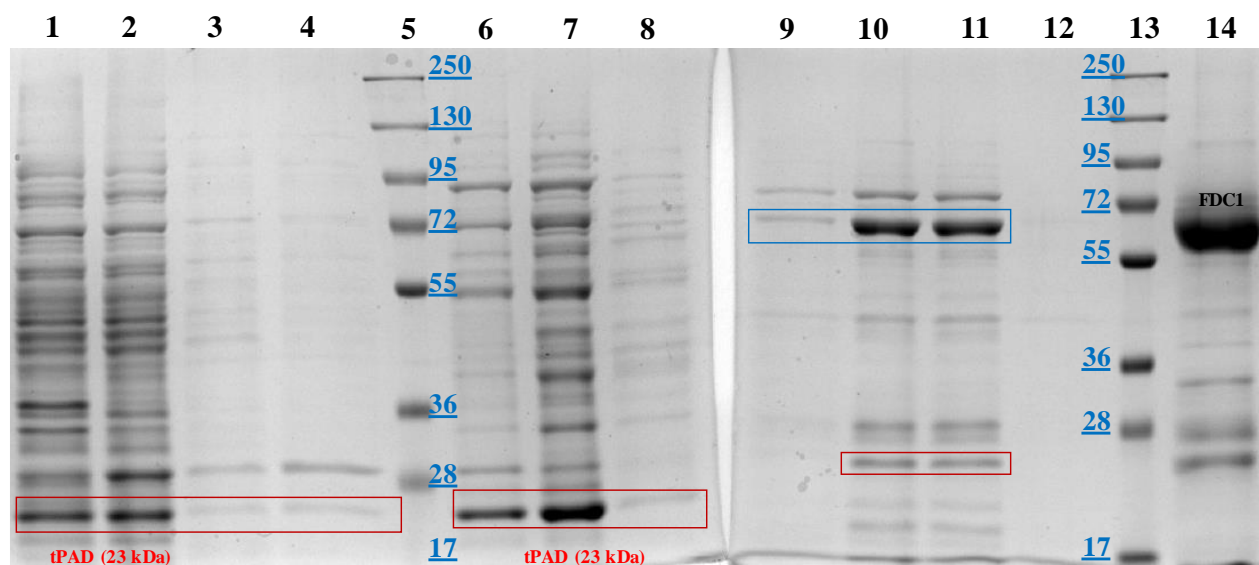
Problemele de stabilitate ale cofactorului prFMN<sup>8</sup>, ca unul dintre factorii majori care limitează aplicabilitatea reacțiilor FDC, pot fi atenuate prin utilizarea biocatalizatorilor FDC ca celule întregi<sup>9</sup> sau lizate celulare.<sup>10</sup>



**Figura 3.** Gelul de SDS-PAGE, 10%. Etapele de purificare a enzimei *wt-ScFDC1*. **1.** lizat celular; **2.** supernatant; **3.** flow through; **4.** spălare cu soluție de 20 mM imidazol; **5.** spălare cu soluție de 50 mM imidazol; **6,7,8** spălare cu soluție de 250 mM imidazol; **9** și **10** markerul de masă moleculară; **11.** Soluția de *wt-ScFDC1* după dializă.



**Figura 4.** Purificarea enzimei *wt-ScFDC1* pe coloana de excludere sterică, Superdex 200 5/150 GL.

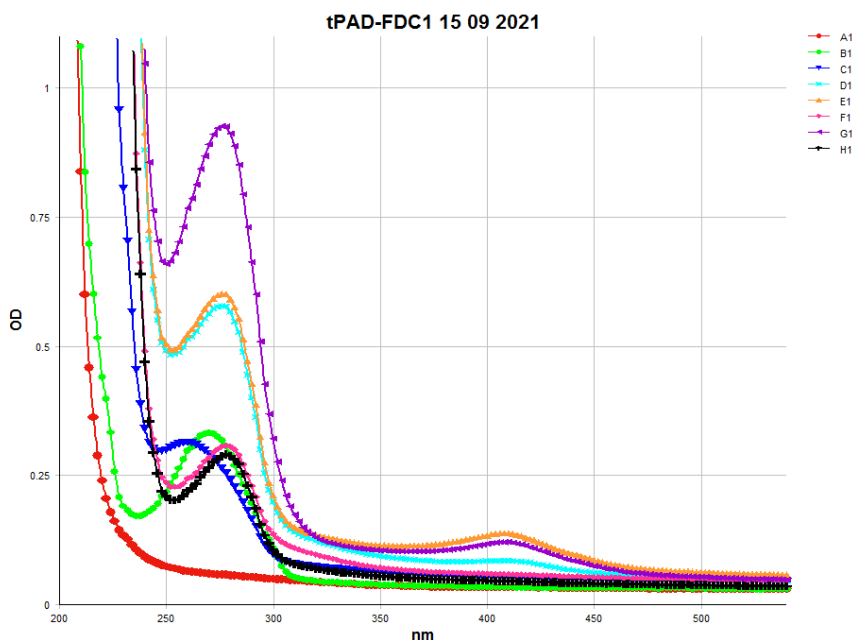


**Figura 5.** Gelul de SDS-PAGE, 10%. Etapele de purificare a enzimei *tPAD-ScFDC1\_Rosetta DE3 pLysS*. **1.** lizat celular, **2.** supernatant; **3.** flow through **4.** spălare cu soluție salină (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and 250 mM NaCl); **10** markerul de masa moleculară; **6.** spălare cu soluție de 20 mM imidazol; **7.** spălare cu soluție de 50 mM imidazol; **8.** spălare cu soluție salină (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and 250 mM NaCl); **9.** spălare cu soluție de 50 mM imidazol; **10.** și **11.** spălare cu soluție de 500 mM imidazol; **12.** spălare cu soluție de 1000 mM imidazol; **13.** markerul de masa moleculară; **14.** soluția de *tPAD-ScFDC1* după dializă.

Cu toate acestea amintim câteva dintre testările realizate și rezultatele parțiale obținute.

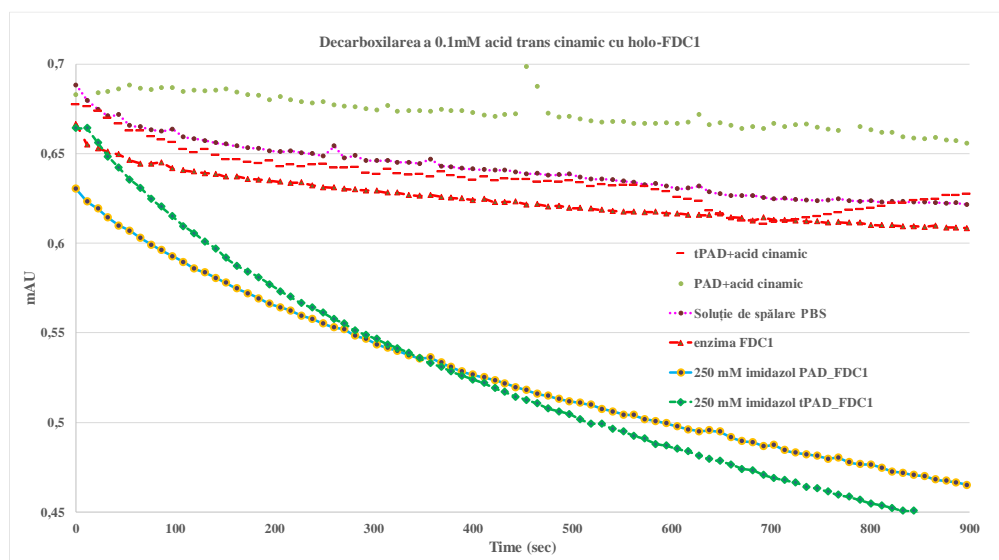
Într-o placă Corning cu 96 de godeuri s-au pipetat până la un volum final de 200  $\mu\text{L}$  câteva probe din etapele de purificare a enzimei *ScFDC1*. Intervalul de scanare a fost 200-600nm folosind cititorul de microplăci TECAN Spark 10M. Proba blank a constatat din 200  $\mu\text{L}$  de PBS (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7.5), soluția folosită pentru dializarea enzimei.

Activitatea relativă a soluțiilor eluate de pe coloana de afinitate cât și cinetica de reacție pentru determinare parametrilor  $V_{\text{max}}$  și  $K_M$  au fost efectuate în același tip de plăci (figura 6).



**Figura 6.** Spectrul UV-vizibil al soluțiilor enzimice de tPAD1\_FDC1 care nu indică legarea cofactorului flavinic (prFMN) de ScFDC1, o flavoproteină care este necesară pentru generarea de holo-FDC activ. **A1.** soluția PBS, **B1.** soluția de acid trans cinamic de 0,1 mM, **C1.** flow through. **D1.** și **E1.** soluția de 50 mM imidazol holo-FDC, **F1.** Soluția de 250 mM imidazol holo-FDC, **G1.** soluția de 50 mM imidazol holo-FDC după coloana HisTRAP HP și concentrare, **H1.** soluția de 250 mM imidazol holo-FDC după coloana HisTRAP HP.

În soluție, prFMNH<sub>2</sub> poate fi convertit ireversibil în forme inactive, cum ar fi prFMN C<sub>4a</sub>-OOH<sup>11</sup>, prFMN-OH, prFMN<sub>radical</sub>, prFMN<sub>radical</sub>-H, prFMN<sub>iminium</sub>-OH, C<sub>1</sub>-ene-prFMN<sub>iminium</sub><sup>8</sup>, în timp ce lumina a fost raportată ca favorizând descompunerea acestuia, toate acestea împiedicând obținerea holo-FDC în formă activă pe o perioadă de timp îndelungată.



**Figura 7.** Activitatea relativă a holo-FDC1 în reacția de decarboxilare a acidului trans cinamic.

Pentru a determina parametrii cinetici ( $V_{max}$ , și  $K_M$ ), concentrația de substrat (*acid trans cinamic*) folosită, a variat în intervalul 0.02 mM- 0.5 mM în prezența a 5 μg de enzimă. Mediul de reacție a fost o soluție tampon de PBS (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7.5). Volumul de reacție este de 200 μL. Reacțiile au fost monitorizate spectrofotometric la 280 nm timp de 15 minute la temperatura de 30 °C cu Tecan Microplate Reader Spark®. Măsurătorile au fost realizate în triplicat.

Valorile vitezei maxime ( $V_{max}$ ) și ale constantei Michaelis-Menten ( $K_M$ ) au fost obținute din ajustarea regresiei neliniare a curbelor Michaelis-Menten cu programul MATLAB folosind ecuația  $v = v_{max}[S]/(K_M + [S])$ . Valorile parametrilor cinetici au fost:  $K_M = 21,008$  mM și  $V_{max} = 0,012$  mM/sec

S-a recurs la reutilizarea plăcilor Corning cu 96 de godeuri, în etapele de scanare și cinetică enzimatică prin curățarea lor cu ajutorul unui spălător automat de microplăci (**PW40 8-Channel Manifold Microplate Washer**) achiziționat cu suma de **13.923 de lei** din proiectul în curs.

### Rezumatul pentru activitatea 2.2:

Analiza SDS-PAGE și cromatografia de afinitate au evidențiat prezența proteinei FDC1 dorite cât și a enzimei tPAD/PAD (figura 5), însă nereușind momentan, izolarea și purificarea enzimei în formă activă (holo-FDC1), eforturile investigațiilor s-au axat pe testarea mai multor protocole de purificare corelate fiind cu posibilele cauze ale inactivării enzimei. Dar pentru faptul că procesul în sine al purificării este unul costisitor, elaborios și un consumator mare de timp, ne-am îndreptat atenția spre folosirea sistemului enzimatic tPAD-ScFDC1 la nivel de celule întregi.

### **Activitatea 2.3 - Mutageneza situs-directionata a aminoacizilor din situsul catalitic ScFDC1**

Pe parcursul acestei activități am avut în vedere realizarea mutațiilor proiectate rational cu scopul de a extinde domeniul de substrat. S-au realizat modificări la nivelul buzunarului aromatic al situsului de legare cu obținerea de mutații unice și mutații multiple prin înlocuirea unor resturi de aminoacizi precum Ile398, Ile189, Ile330, Leu442, Leu187, Met282, Phe440 cu reziduri mai puțin voluminoase (Ala și Val).

**Tabelul 2.** Alinierea reziduurilor din site-ului activ (marcate cu galben) în ScFDC (albastru) și AnFDC (roșu). Trei reziduuri diferite ale situsului activ (marcate cu albastru) sunt: P319, F397 și I398 de ScFDC, care corespunde reziduurilor C316, Y394 și T395 din AnFDC.

	175	187	188	189	190	191	192	283	284	285	286	287	319	326	330	397	398	440	441	442
<b>ScFDC</b>	R	L	V	K	P	Q		F	G	E	M	H	P	I	I	F	I	F	P	L
Uniprot ID: Q03034																				
<b>AnFDC</b>	R	L	V	I	P	P	Q	F	G	E	M	H	C	I	I	Y	T	F	P	L
Uniprot ID: A2QHE5	173	185	186	187	188	189	190	280	281	282	283	284	316	323	328	394	395	437	438	439

**Tabelul 3.** Lista mutanților ScFDC obținuți și primerii utilizați pentru mutageneza dirijată.

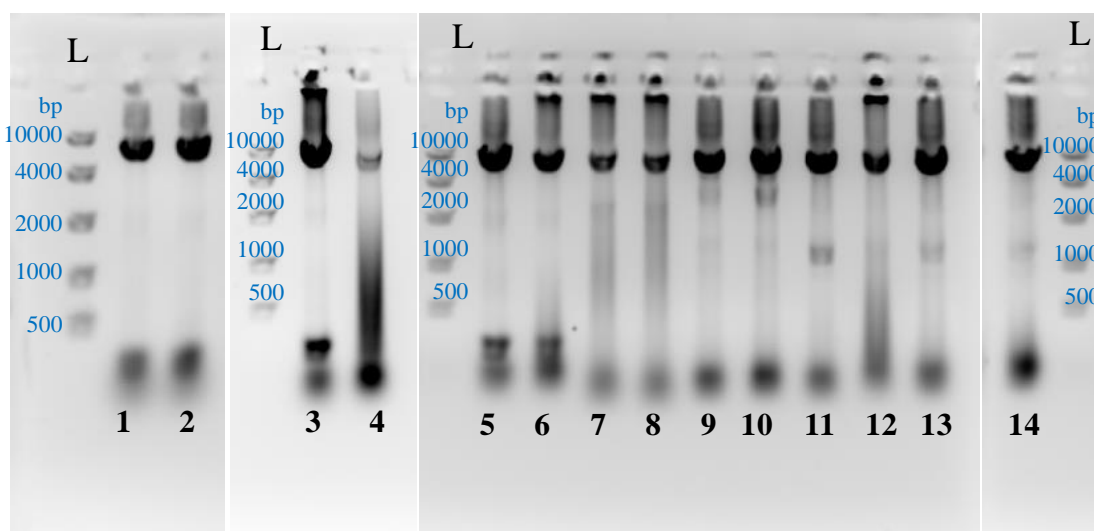
Entry	Primer name	Sequence (5'-3') of primers used for mutagenesis	T <sub>m pp</sub> (°C)	T <sub>m no</sub> (°C)	T <sub>m full</sub> (°C)
1	I189A	FP: 5'TCTGGTAGCTAAACCACAACATATTAGACAAATTGCTGAC3'	52	62	75
		RP: 5'TGGTTTAGCTACCAGACCAGTGATATGCTTGTCATC3'	52	61	77
2	I189V	FP: 5'GTCTGGTAGTTAAACCACAACATATTAGACAAATTGCTGACTCTTG3'	53	61	70
		RP: 5'GTGGTTAACTACCAGACCAGTGATATGCTTGTCATCTACAAC3'	53	61	71
3	Q192N	FP: 5'TTAAACCAAATCATATTAGACAAATTGCTGACTCTTGGG3'	53	61	75
		RP: 5'GTCTAATATGATTTGGTTTAAATTACCAGACCAGTGATATGC3'	53	61	73
4	Q192S	FP: 5'TTAAACCATCACATATTAGACAAATTGCTGACTCTTGGG3'	54	61	76
		RP: 5'GTCTAATATGTGATGGTTTAAATTACCAGACCAGTGATATGC3'	54	61	74
5	Q192A	FP: 5'TAAACCAGCACATATTAGACAAATTGCTGACTCTTGG3'	51	61	75
		RP: 5'CTAATATGTGCTGGTTTAAATTACCAGACCAGTGATATGC3'	51	61	74
6	M286A	FP: 5'GTGAGGCGCATGGATATGTTTCAAAAAGCCAAGGTCATC3'	55	62	74
		RP: 5'CCATGCGCCTCACCAAATGGGCCTTCCAGATGTG3'	55	63	77
7	M286V	FP: 5'GGTGAGGTGCATGGATATGTTTCAAAAAGCCAAGGTCATC3'	54	62	73
		RP: 5'CCATGCACCTCACCAAATGGGCCTTCCAGATGTG3'	54	62	77
8	I330A	FP: 5'CCTTGGCTGGTTCAGTAGTGGCTACTGAGGCC3'	54	61	80
		RP: 5'GAACCAGCCAAGGTATGTGTCTCATCCGTACAAAG3'	54	62	79
9	I330V	FP: 5'CCTTGGTTGGTTCAGTAGTGGCTACTGAGGCCAAG3'	56	65	80
		RP: 5'GTGAACCAACCAAGGTATGTGTCTCATCCGTACAAAGAC3'	56	64	80
10	I398A	FP: 5'GGTTTTGCAGTCCATGAAATAATTTTGGTGGCAGATG3'	52	57	70
		RP: 5'ATGGACTGCAAAACCAACTTTTGTCTTAAAGTAAATATCAC3'	52	57	69
11	I398V	FP: 5'GGTTTTGTAGTCCATGAAATAATTTTGGTGGCAGATGATATC3'	52	59	69
		RP: 5'TCATGGACTACAAAACCAACTTTTGTCTTAAAGTAAATATCAC3'	52	59	69
12	F397V	FP: 5'GTTGGTGTATAGTCCATGAAATAATTTTGGTGGCAGATG3'	51	59	69
		RP: 5'TGGACTATAACCAACTTTTGTCTTAAAGTAAATATCACCTACC3'	51	60	70
13	F397A	FP: 5'GTTGGTGTATAGTCCATGAAATAATTTTGGTGGCAGATG3'	52	60	70
		RP: 5'GGACTATAGCACCACACTTTTGTCTTAAAGTAAATATCACCTACC3'	52	60	70
14	F397Y	FP: 5'GTTGGTGTATAGTCCATGAAATAATTTTGGTGGCAGATG3'	51	56	75
		RP: 5'CATGGACTATATAACCAACTTTTGTCTTAAAGTAAATATCAC3'	51	56	72
15	F397V/I398A	FP: 5'GGTGTGTCAGTCCATGAAATAATTTTGGTGGCAGATGATATCG3'	56	61	72
		RP: 5'CATGGACTGCAACCAACTTTTGTCTTAAAGTAAATATCACCTAC 3'	56	61	72
16	F397V/I398V	FP: 5'GGTGTGTAGTCCATGAAATAATTTTGGTGGCAGATGATATC3'	52	59	70
		RP: 5'CATGGACTACAACCAACTTTTGTCTTAAAGTAAATATCAC3'	52	59	70
17	L442V/F440A	FP: 5'CTTCTGCTCTGTGGCTCCCTTTGTTTCGCAGTC3'	54	60	75
		RP: 5'CCACAGGAGCAGAAGTGACATCAAAAAGCCATCTG3'	54	60	73
18	Duet_DOWN1	- sequencing primer 5'GATTATGCGCCGTGTACAA3'			
19	T7promoter	- sequencing primer 5'GTAATACGACTCACTATAGGG3'			

Variantele mutante de FDC1 (Tabelul 3) au fost obținute prin mutageneză direcționată utilizând metoda PCR descrisă de Liu și Naismith.<sup>12</sup>

Prin urmare volumul total de 50 μL a reacției de PCR, a conținut 10 μL de tampon 5X Phusion HF, 4 ng de ADN matriță (genă Scfdcl clonată în vectorul pCDFDuet), concentrația finală de 2 μM a perechii de primeri corespunzătoare (Tabelul 3), dNTPs (200 μM) și 2 U de ADN polimerază (Phusion High-Fidelity DNA polymerase).

Protocolul PCR a constat în (1) predenaturarea matriței la 95 °C timp de 3 minute, în (2) denaturarea la 95 °C timp de 1 minut, (3) atașarea primerilor la temperatura T<sub>m no</sub> -5 °C timp de 1 min și (4) extensia la 72 °C timp de 15 minute. Pașii 2, 3 și 4 au fost repetați sub forma a 20 de cicluri de amplificare. Pasul (5) a constat în atașarea primerilor folosind T<sub>m pp</sub>-5 °C timp de 1 minut și o (6) etapă finală de extensie la 72 °C timp de 30 de minute. 8 μL din fiecare reacție PCR au fost introduși într-un gel de agaroză (figura 8) pentru a confirma succesul amplificării ADN-ului. În continuare, 15 μL din fiecare reacție de PCR au fost supuși digestiei cu 5 unități de enzimă de restricție, DpnI la 37 °C timp de

1 oră pentru a îndepărta ADN-ul șablon. 3-5  $\mu\text{L}$  din produsul digestat au fost transformați în 50-100  $\mu\text{L}$  celule *E. coli* XL1-Blue competente din punct de vedere chimic prin șoc termic. Deoarece primerii au fost bine construiți și toate substraturile de reacție au fost proaspete, reacția de PCR nu a necesitat repetare sau adăugarea de aditivi. Introducerea mușțiilor s-a realizat utilizând **CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Manufacturer: Bio-Rad)** în achiziționat în valoare de **100.000 de lei din care 26.077 de lei cotă parte din proiectul PN-III-P1-1.1-PD-2019-1222/ PD 98.**



**Figura 8** Gelul de agaroză de 1% pentru producții de PCR ai mutațiilor **1-14** conform tabelului 3, **L**=DNA ladder: 10000, 4000, 2000, 1000, 500 bp). Detectarea produșilor s-a realizat cu ajutorul instrumentului ChemiDoc™ Sistem de la Bio-RAD.

Pentru restul de 6 mușții duble: I330V/I398A, I330A/I398A, I398V/I189A, I398A/I189A, F397Y/I189V, F397Y/I189A, s-a utilizat constructul cu mutație singulară ca rol de matriță.

Celulele transformate au fost răspândite pe o placă LB-agar (LB) cu conținut de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin și 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tetraciclină și incubate la 37 °C timp de 16 ore. Pentru izolarea AND-ului plasmidic au fost selectate două colonii și respectiv multiplicare în mediu lichid LB (incubare la 37 °C/14-16 ore, 200 rpm).

Prezența mutațiilor a fost verificată prin secvențierea ADN de către firma Biomi Ltd. (Gödöllő, Ungaria) urmate de transformarea prin șoc termic a plasmidelor corespunzătoare în gazda de expresie *E. coli* Rossetta (DE3) pLysS respectiv *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, utilizate ulterior în testele pe plăci și în biotransformările cu celule întregi.

### **Rezumatul pentru activitatea 2.3:**

Modificările raționale au dus la obținerea până în prezent a unei colecții de enzime mutante sub formă de celule în număr de 23.



## Activitatea 2.4 - Screeningul de activitate biocatalitică al celulelor întregi de ScFDC1

Un aspect de maximă importanță în reușita acestui studiu a constat în dezvoltarea unui test de activitate folosind celule întregi, un assay premergător etapei de testare prin HPLC. În timp ce assay-ul inițial are un caracter calitativ, fiind util în a distinge mutații inactivi de cei activi, deci de a alege mutații potriviți pentru analiza HPLC, aceasta din urmă a fost de natura cantitativă, stabilind exact valoarea conversiei în reacțiile investigate.

### A. Screeningul de activitate folosind metoda de testare de fază solidă

Pentru toate experimentele de mai jos, au fost utilizate celule întregi de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS ca celule gazdă de expresie pentru plasmida pCDFDuet-1 purtând cele două gene: *fdc1* și *tpad*.

2  $\mu$ L de suspensie celulară din fiecare mutant au fost transferați cu atenție pe plăci Petri LB-agar care conțineau doar cloramfenicol (34,0  $\mu$ g/mL). Plăcile au fost incubate peste noapte la 37 °C. A doua zi, coloniile formate, au fost transferate (*sugativate*) pe o membrană de Blotting PVDF, pregătită în prealabil (spălare cu metanol timp de 1 min și 2x tampon fosfat de sodiu 100 mM (PBS), pH=7, timp de 1 min).

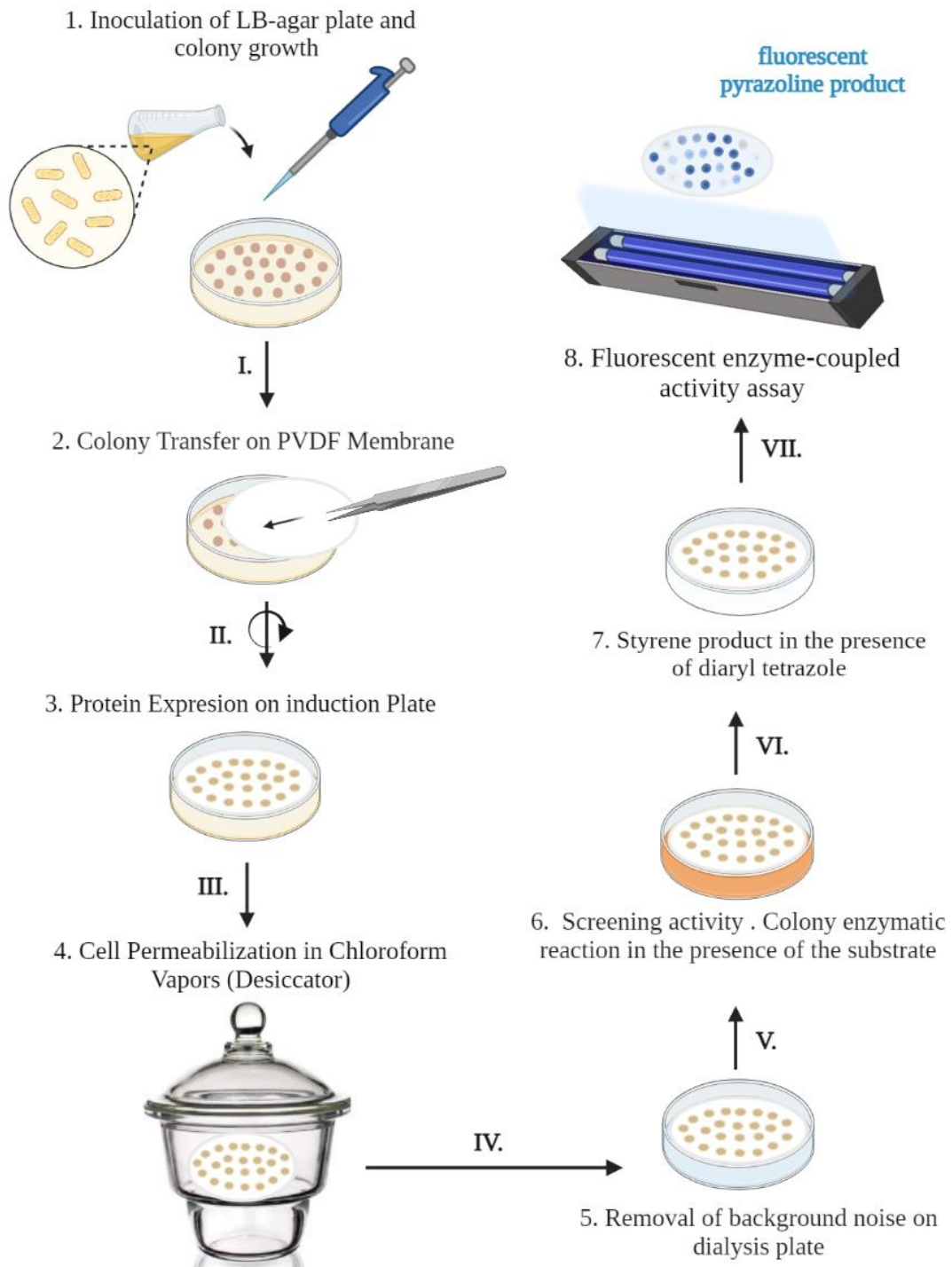
De pe membrana cu coloniile dispuse pe fața superioară a acesteia, celulele au fost supuse transferului pe o placă de inducere-LB agar (1 mM IPTG și cloramfenicol) timp de 8 ore la 30 °C pentru exprimarea genelor mutante. În continuare s-a realizat permeabilizarea coloniilor într-un mediu închis (desicatoare) sub vapori de cloroform timp de 45 de secunde. Aceasta a fost urmată de o etapă de dializă pe placă de agaroză 0,4% în tampon fosfat de sodiu 100 mM, pH=7, la 4 °C, peste noapte.

A doua zi, membrana care conține coloniile dializate a fost transferată pe un mediu de reacție și și incubată la 35 °C timp de 4 ore. Mediul de reacție consta dintr-o soluție de agaroză de 1% în PBS, 1mM de substrat (**1a-p**) dizolvat în DMSO, turnată într-o placă Petri. Reacția finală s-a realizat prin aducerea în contact a membranei cu o hârtie de filtru umezită cu o soluție de 100  $\mu$ M tetrazol în PBS, pH=7 și incubată la întuneric, timp de 1 oră la 37 °C.

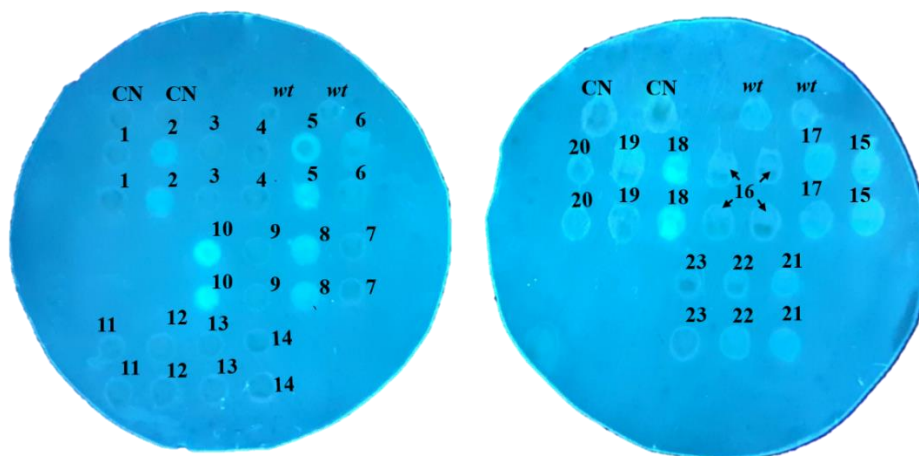
Pentru a detecta coloniile care prezintă activitate decarboxilazică pentru un anumit substrat, membrana a fost iradiată timp de 1 minut cu lumină UV la 302 nm, utilizând un sistem UVP Bioimaging Analytik Jena.

*Observație! De la transferul coloniilor pe membrana PVDF până în ultima etapă, membranele s-au păstrat cu coloniile în sus, în contact cu atmosfera de lucru. (figura 9)*

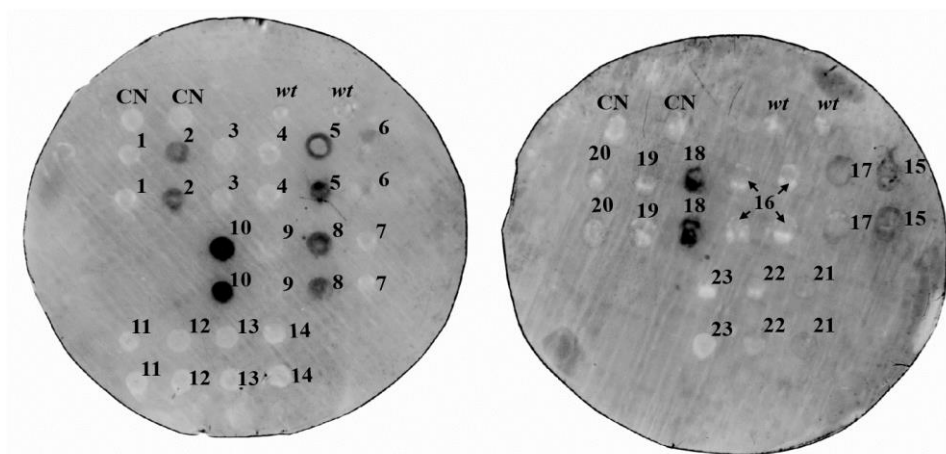
Pentru analiza și interpretarea intensității semnalelor furnizate de coloniile active s-a folosit instrumentul *ChemiDoc™ Imaging System*, cu filtru UV din aplicația Gel Green pentru acizi nucleici iar cu programul Image Lab 5.2.1, a fost analizată o suprafață de 2,8 mm<sup>2</sup> din fiecare spot corespunzător coloniilor. Din valoarea intensității coloniilor mutante s-a scăzut valoarea intensității controlului negativ (colonie de *E. coli* Rosetta lipsită de vector de exprimare a genei *fdc1*). Valoarea maximă obținută a fost considerată ca o activitate relativă de 100% și față de această valoare au fost comparate restul rezultatelor pentru un anumit substrat (Tabelul 4). Experimentele au fost realizate în duplicat pentru fiecare substrat aflat în studiu.



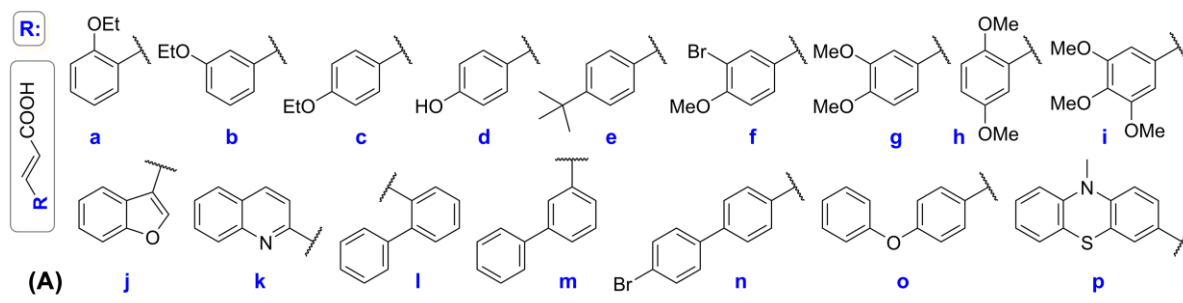
**Figura 9.** Etapele testului de fază solidă (*fluorescent cell-plate agarose assay*) ce permite identificarea rapidă a variantelor de enzime cu activitate decarboxilază îmbunătățită unde stirenul produs fiind este detectat fluorescent la reacția sa cu o sondă fluorogenică pe bază de tetrazol.



**Figura 10.** Exemplu reprezentativ al testului pe placă care prezintă activitatea relativă a 23 de mutații de ScFDC (1 la 23) proiectați rațional pentru substratul **10** ((*E*)-3-(4-fenoxifenil)acrylic). CN= control negativ: colonie de *E. coli* Rosetta (*DE3*) fără vectorul de expresie FDC, *wt*=*wild-type* (forma nativă). Imaginea colorată a fost obținută prin fotografierea manuală a membranei iradiată de un Transilluminator la 302 nm, arătând emisia cyan de fluorescență a coloniilor active.



**Figura 11.** Exemplu reprezentativ al testului pe placă care prezintă activitatea relativă a 23 de mutații de ScFDC (1 la 23) proiectați rațional pentru substratul **10** ((*E*)-3-(4-fenoxifenil)acrylic). CN= control negativ: colonie de *E. coli* Rosetta (*DE3*) fără vectorul de expresie FDC, *wt*=*wild-type* (forma nativă). Imaginea a fost obținută folosind ChemiDoc™ Imaging System, selectând filtrul UV și aplicația Gel Green pentru acizi nucleici;



**Figura 12.** Derivați de acizi cinamici, 1a-p, substraturi folosite în reacția de decarboxilare catalizată de biocatalizatorul ScFDC1.

**Tabelul 4.** Activitățile relative bazate pe intensitatea semnalului fluorescent, rezultate din testul pe plăci a bibliotecii de variante mutante de FDC1 în reacția de decarboxilare a substraturilor **1a-o**.

Nr	ScFDC	Substraturile 1a-o														
		1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g	1h	1i	1j	1k	1l	1m	1n	1o
1	wt	35	61	47	33	0	60	32	34	0	66	78	51	59	11	10
2	M1-I398A	28	75	88	42	0	9	100	97	26	81	21	8	53	56	11
3	M2-F397A	9	84	90	100	0	1	42	0	1	90	31	28	61	48	43
4	M3-M286A	0	0	1	0	0	2	4	0	1	10	18	31	0	19	10
5	M4-M286V	19	28	14	1	0	3	39	53	0	100	37	2	11	20	11
6	M5-F397V/I398A	1	51	77	66	100	9	70	99	28	61	42	9	37	65	61
7	M6-L442V/F440A	0	0	3	0	0	3	5	0	1	8	9	70	1	43	27
8	M7-I330V/I398A	13	34	11	51	0	4	78	98	26	72	27	64	29	60	8
9	M8-Q192A	15	46	33	65	0	2	43	75	0	50	61	69	19	75	73
10	M9-Q192N	5	31	100	80	0	2	51	11	0	59	66	61	26	100	12
11	M10-Q192S	8	41	63	60	0	9	30	30	0	40	79	5	24	45	100
12	M11-I330A	20	21	16	28	0	12	33	100	16	89	40	8	21	47	5
13	M12-I330V	41	42	17	33	0	15	61	36	0	29	62	33	28	63	6
14	M13-I189A	100	100	18	34	0	57	92	95	12	57	100	28	53	37	11
15	M14-I189V	98	66	25	21	0	49	75	0	8	88	21	68	75	19	10
16	M15-F397Y	95	50	28	33	0	29	70	9	4	50	18	97	31	71	53
17	M16-F397V	11	1	0	0	0	9	8	0	0	3	5	89	5	9	12
18	M17-I398V	37	54	29	47	0	48	41	31	0	61	5	100	21	23	39
19	M18-F397V/I398V	9	47	58	42	43	83	57	24	3	45	9	59	100	60	93
20	M19-I330A/I398A	9	43	1	43	0	100	11	18	50	70	8	62	59	21	8
21	M20-I398V/I189A	99	53	21	11	0	55	64	68	18	77	34	61	35	51	9
22	M21-I398A/I189A	35	46	31	51	0	31	91	100	83	55	31	11	37	82	9
23	M22-F397Y/I189V	100	48	35	35	0	40	96	99	12	62	30	13	37	59	12
24	M23-F397Y/I189A	31	47	26	9	0	95	48	100	100	61	45	60	27	15	2

Coloniile mutante de FDC1 cu proprietățile catalitice perfecționate au fost selectate din testul pe placă și confirmate prin biotransformări la scară analitică.

Screeningul de activitate a muntanților selectați s-a realizat față de biblioteca de substrat țintă (figura 12) (disponibilă în cadrul grupului de cercetare) sub formă de celule întregi prin metoda HPLC. Astfel s-au monitorizat valorile de conversie în timpul biotransformărilor la scară analitică, conform procedurilor noastre dezvoltate anterior <sup>12</sup>.

## 2. Biotransformări la scară analitică

### Pregătirea culturilor-biocatalizator

În primă etapă s-a obținut colecția de celule întregi *ScFDC1* native și mutante, **gata de utilizare** cu densitate optică ( $OD_{600}$ ) de 1, 2, 4 și 8 pentru biotransformarea la scară analitică.

Precultura, mediu LB steril (10 mL) suplimentat cu steptomycină (25  $\mu\text{g/mL}$ ) și cloramfenicol (30  $\mu\text{g/mL}$ ) a fost inoculat cu celule de *wt-ScFDC1\_E. coli* BL21(DE3) și incubat peste noapte (37°C, 200 rpm). Cu 1-2 v% din precultură s-a inoculat mediul de lucru (100 mL) care după o incubare de 2 ore la 37 ° C, 220 rpm, la un  $OD_{600} \sim 0,6$  a fost indus cu IPTG (la o concentrație finală de 0,2 mM), urmată de incubare la 25 ° C, 220 rpm până la o densitate celulară de  $OD_{600} \sim 2$ .

Celulele au fost recoltate prin centrifugare și alicotate pe 4 categorii de densitate optică:  $OD_{600}$  de 1, 2, 4 și 8, gata de utilizare. Același procedeu s-a realizat și pentru variantele celulare *E. coli* care conțin gena mutantă *fdc1*.

### Decarboxilările mediate de FDC la scară analitică

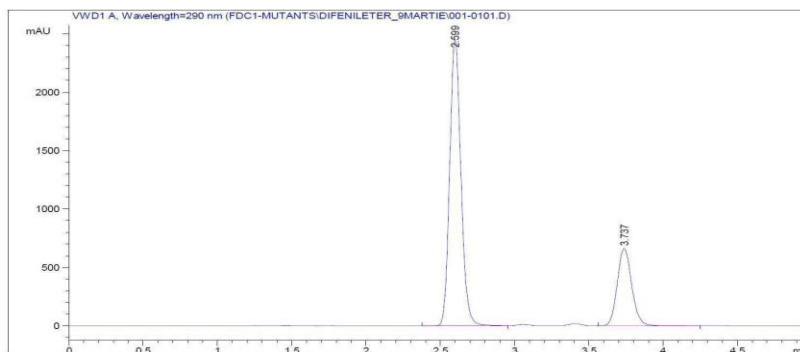
Soluțiile stoc ale fiecărui substrat dizolvat în DMSO (50 mM) au fost diluate la 2 mM sau la 1 mM cu tampon fosfat (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0). Celulele de *E. coli* gata de utilizare, au fost resuspendate în soluția de reacție la  $OD_{600}$  final de 2, urmată de incubarea amestecurilor de reacție la 35 °C, 700 rpm, timp de 16 ore.

### Monitorizare RP-HPLC

La finalul celor 16 ore, amestecul de reacție a fost supus lizei celulare prin ultrasonare, urmat de îndepărtarea prin centrifugare a resturilor celulare (13000 rpm, timp de 10 minute). Peletul celular a fost extras cu 500  $\mu\text{L}$  MeOH și amestecat cu supernatantul etapei precedente de centrifugare.

100  $\mu\text{L}$  din soluția de mai sus a fost diluată 1:1 cu o soluție de 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, acetonitril și benzalacetofenonă, utilizate ca standard intern.

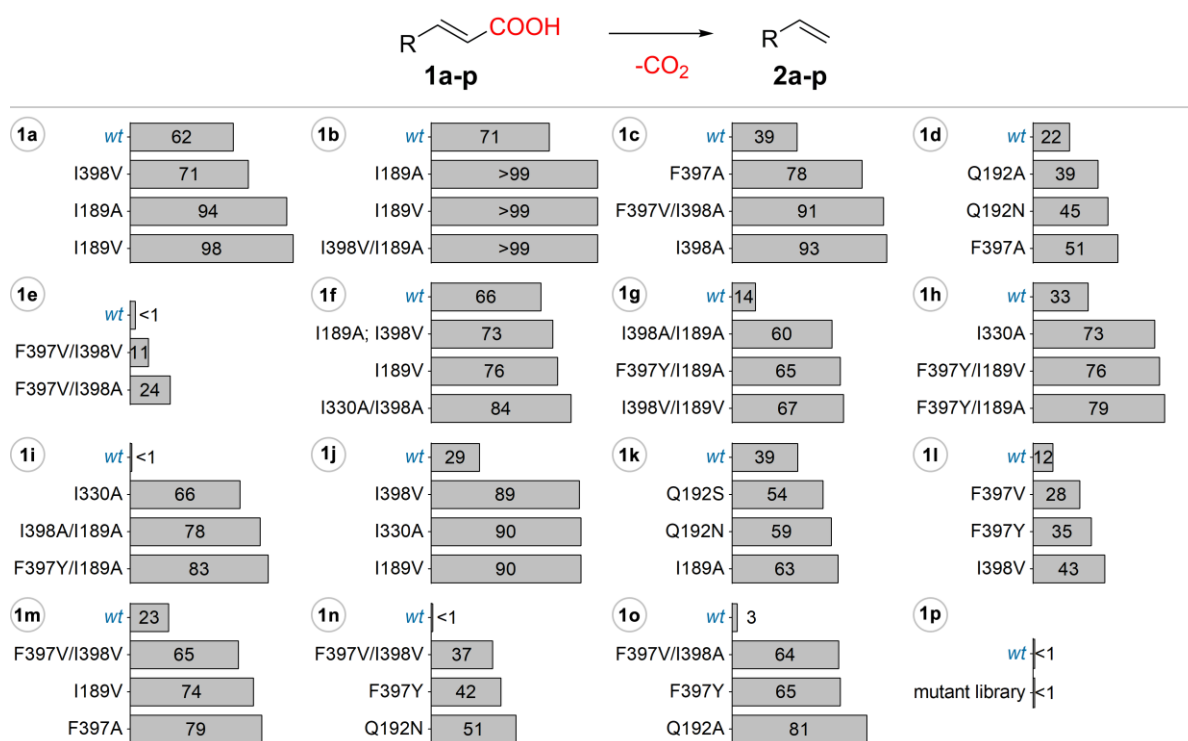
Toate analizele HPLC au fost efectuate la 25 °C folosind o coloană Phenomenex Kinetex NX-C18 150x4,5 mm, o fază mobilă de 30%  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% v/v TFA) și 70% ACN (0,1% v/v. v TFA), un debit de 1 mL/min, injectând 5  $\mu\text{L}$  din probele obținute anterior. Valorile de conversie au fost determinate prin monitorizarea epuizării concentrației de substrat, utilizând benzalacetofenona ca standard intern.



**Figure 13.** Cromatograma reprezentativă privind separarea HPLC a benzalacetofenonei (standardul intern) și substratul 1o ((*E*)-3-(4-fenoxifenil)acrylic)

**Tabelul 5.** Un exemplu reprezentativ cu valorile de conversie ale decarboxilării acidului (*E*)-3-(4-fenoxifenil)acrilic (**1o**) utilizând variantele FDC selectate din testul pe placă (figura 10 și 11).

Entry	Conversion (%)	Plate assay relative activity
<i>Wild-type</i>	3.1	10
M8 - Q192A	81.4	73
M15 - F397Y	65.3	53
M5 - F397V/I398A	64.3	61
M10 - Q192S	56.3	100
M2 - F397A	17.4	43
M18 - F397V/I398V	15.3	93
M17 - I398V	12.2	39
M3 - M286A	10.8	10
M11 - I330A	<1	5
M19 - I330A/I398A	<1	8



**Figura 14.** Valorile de conversie a panoului de substrat **1a-p** cu primii 3 cei mai performanți mutații în comparație cu enzima nativă *wt-ScFDC1*.

Pentru 15 din cele 16 substraturi investigate au fost identificați mutații cu activitate superioară celei a *ScFDC1*, excepție făcând compusul **1p**, acidul (*E*)-3-(10-metil-10H-fenotiazin-3-il)acrilic pentru care nici enzima nativă și niciun mutant nu au prezentat activitate.

#### **Rezumatul pentru activitatea 2.4:**

Rezultatele obținute confirmă existența unei îngustări la nivelul canalului de acces la situsului cauzată de resturile I330 și Q192, mutații la nivelul acestora conducând la variante mutante mai active față de substraturile voluminoase. Mai mult, s-a arătat ca I330 (dar și I189) poate intra în conflicte sterice cu substituenți *orto* sau *meta*, în timp ce mutații asupra lui Q192 cresc activitatea față de analogi ai acidului cinamic cu substituenți în poziția *para*.

Compușii substituiți în poziția *meta* au fost decarboxilați mai eficient de variante ce prezintă mutații ale I189, în timp ce resturile din pozițiile 398 și 397 dictează (alături de Q192) măsura în care compușii *para* substituiți sunt acceptați ca substraturi. În mod neașteptat, mutația F397Y a avut un efect contraintuitiv, de multe ori servind la a îmbunătăți afinitatea mutanților față de unele substraturi.

Dezvoltarea metodei de screening (fluorescent cell-plate agarose assay) care a permis identificarea calitativă a biocatalizatorilor *ScFDC1* mutanți activi dintr-o paletă de 23 de mutanți folosind un panou de 16 substraturi.

În urma prelucrării datelor experimentale, rezultatele arată că au fost identificați mutanți cu activitate superioară formei native *wt-ScFDC1* pentru 15 din cele 16 substraturi testate. Prin analiza HPLC s-a stabilit exact valoarea conversiei în reacțiile de decarboxilare investigate.

#### **Concluzie**

Obiectivul principal al acestei etape, **activitatea funcțională a decarboxilazei cu un domeniu larg de substrat**, a fost atins cu succes prin folosirea ca biocatalizator, a variantelor mutante ale *ScFDC1* sub formă de celule întregi.

#### **REZULTATELE ETAPEI 2:**

- ✓ 4 sisteme de expresie optimizate în vederea obținerii enzimei FDC1, tPAD1, PAD1 și holo-FDC1
- ✓ Probe de proteine recombinante cu puritate ridicată: o șarjă de tPDA-*ScFDC1*, o șarjă de *ScFDC1*, o șarjă de PAD-*ScFDC1* și respectiv o șarjă de tPAD și PAD.
- ✓ O colecție de 23 de variante mutante simple și multiple ale *ScFDC1*
- ✓ O colecție de celule holo-*ScFDC1* gata de utilizare cu densitate optică (OD600) variată folosite pentru biotransformările la scară analitică și preparativă
- ✓ Dezvoltarea metodei de screening (fluorescent cell-plate agarose assay) care a permis identificarea calitativă a biocatalizatorilor *ScFDC1* mutanți activi dintr-o paletă de 23 de mutanți folosind un panou de 16 substraturi.
- ✓ Diseminarea rezultatelor în cadrul Centrului de Cercetare Enzimologie și Biocataliză Aplicată, respectiv sunt în curs de publicare în revista *Scientific Reports*, cu acces online, având factorul de impact în 2020 de 4,379.

## **DISEMINAREA REZULTATELOR:**

### **Publicații științifice în pregătire:**

Rezultatele obținute au fost diseminate treptat în cadrul Centrului de Cercetare Enzimologie și Biocataliză Aplicată, respectiv sunt în curs de publicare în revista *Scientific Reports*, cu acces online, având factorul de impact în 2020 de 4,379.

- Horia Duță, Dr. Alina Filip, Dr. Levente Csaba Nagy, Dr. Emma Zsófia Aletta Nagy, Dr. Róbert Tóth, Dr. László Csaba Bencze, Toolbox for the structure-guided evolution of ferulic acid decarboxylase (FDC), *Scientific Reports* - **article under revision process.**
- Bursă de performanță - Masterand Horia Duță



## Referințe bibliografice:

1. Song, D.; Bi, F.; Zhang, N.; Qin, Y.; Liu, X.; Teng, Y.; Ma, S. Design, synthesis of novel 4,5-dihydroisoxazole-containing benzamide derivatives as highly potent FtsZ inhibitors capable of killing a variety of MDR *Staphylococcus aureus*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2020**, 28, 21, 115729
2. Garcia-Barrantes, P.M.; Lindsley, C.W. Total Synthesis of Gombamide A, *Organic Letters*, **2016**, 18, 15, 3810.
3. Flores-Noria, R. et al. Synthesis and optoelectronic properties of phenylenevinylenequinoline macromolecules, *New Journal of Chemistry*, **2014**, 38, 3, 974
4. Zhao, Z.; Britt, L.H.; Murphy, G.K. Oxidative, Iodoarene-Catalyzed Intramolecular Alkene Arylation for the Synthesis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Chemistry - A European Journal*, **2018**, 24, 64, 17002.
5. Sharma, S.; Naganaboina, R.T.; Peddinti, R.K. Expedient synthesis of nitrovinyl substituted bicyclo[2.2.2]octenone scaffolds, *RSC Advances*, **2015**, 5, 121, 100060.
6. Luo, A.Y.; Bao, Y.; Cheng, X.F.; Wang, X.S. A Neutral Metal-Free System for Head-to-Tail Dimerization of Electron-Rich Alkenes, *Synthesis*, **2017**, 49, 17, 3962.
7. Lin, F., Ferguson, K. L., Boyer, D. R., Lin, X. N. & Marsh, E. N. G. Isofunctional enzymes PAD1 and UbiX catalyze formation of a novel cofactor required by ferulic acid decarboxylase and 4-hydroxy-3-polyprenylbenzoic acid decarboxylase. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 1137–1144.
8. Marshall, S. A. *et al.* in *Methods in Enzymology*, Heterologous production, reconstitution and EPR spectroscopic analysis of prFMN dependent enzymes, Vol. 620, **2019**, 489-508.
9. Richard, P., Viljanen, K. & Penttilä, M. Overexpression of PAD1 and FDC1 results in significant cinnamic acid decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express* **5**, (2015).
10. Grubbe, W. S., Rasor, B. J., Krüger, A., Jewett, M. C. & Karim, A. S. Cell-free styrene biosynthesis at high titers. *Metabolic Engineering* **61**, 89-95, **2020**.05.009.
11. Balaikaite, A. *et al.* Ferulic Acid Decarboxylase Controls Oxidative Maturation of the Prenylated Flavin Mononucleotide Cofactor. *ACS Chemical Biology* **15**, **2020**, 2466-2475.
12. Liu, H. & Naismith, J. H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.* **2008**, 8, 91–101.
13. Nagy, E.Z.A., Nagy, C.L., Filip, A., Nagy, K., Gál, E., Tötös, R., Poppe, L., Paizs, C., Bencze, L.C. Exploring the substrate scope of ferulic acid decarboxylase (FDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*, *Sci. Rep.*, **2019**, 9, 647.

Director Proiect,  
Asist. Dr. FILIP ALINA

8.12.2021