

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Marko VERCE

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE
LAKAZE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Marko VERCE

IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE LAKAZE

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A BACTERIAL
LACCASE**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes – Field Biotechnology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Biotehnologija. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić-Mulec in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčić.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčić

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Kristina Sepčić
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisani se strinjam z objavo svoje magistrske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Marko Verce

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 604.4:577.15:575.112(043)=163.6
KG encimi/lakaze/bakterijska lakaza/karakterizacija lakaz/bioinformatika/molekularno kloniranje/heterologno izražanje/anaerobni mikroorganizmi
AV VERCE, Marko, dipl. bioteh. (UN)
SA MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/SEPČIĆ, Kristina (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2013
IN IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE LAKAZE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija)
OP XII, 95 str., 32 pregl., 30 sl., 166 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Bioinformatika je razkrila prisotnost domnevnih lakaznih genov v genomih različnih bakterij, med katerimi je striktni anaerob *Geobacter metallireducens* GS-15. Lakaze (benzendiol:kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2) so encimi, ki katalizirajo oksidacijo mnogih fenolnih in nefenolnih substratov in redukcijo molekularnega kisika do vode. Slednje je razlog za dvom v integriteto lakaznih genov pri anaerobih. Naš cilj je bil preveriti, če eden od domnevnih lakaznih genov *G. metallireducens* GS-15 kodira funkcionalno lakazo, in morebitno lakazo biokemijsko okarakterizirati. S tehnologijo rekombinantne DNA smo v gostitelju *Escherichia coli* heterologno izrazili Gmet_2154, enega od petih domnevnih lakaznih genov *G. metallireducens* GS-15, in protein izolirali s pomočjo histidinskega označevalca. Očiščeni encim je oksidiral nekatere tipične lakazne substrate, kot so ABTS, 2,6-DMP in siringaldazin. Njegov temperaturni optimum smo ocenili na 60 °C, pH optimuma za oksidacijo ABTS in 2,6-DMP pa na 5,0 in 8,0. Kot je značilno za druge lakaze, je encimsko aktivnost inhibirala prisotnost halidnih anionov. Možno je, da se Gmet_2154 izraža tudi *in vivo*, vendar njegova fiziološka vloga v *G. metallireducens* še ni znana. Gre za prvo znano lakazo pri striktno anaerobnem organizmu. To delo poudarja pomen bioinformatike za iskanje novih lakaznih genov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 604.4:577.15:575.112(043)=163.6
CX enzymes/laccases/bacterial laccase/laccase characterization/bioinformatics/
molecular cloning/heterologous expression/anaerobic microorganisms
AU VERCE, Marko
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/SEPČIĆ, Kristina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2013
TY ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A BACTERIAL LACCASE
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes – Field Biotechnology)
NO XII, 95 p., 32 tab., 30 fig., 166 ref.
LA sl
AI sl/en

AB Bioinformatics has revealed the presence of putative laccase genes in genomes of diverse bacteria, including the strictly anaerobic *Geobacter metallireducens* GS-15. Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) are enzymes that catalyse the oxidation of many phenolic and nonphenolic substrates coupled to the reduction of molecular oxygen to water. For this reason, integrity of laccase genes in anaerobes has been questioned. Our goal was to show if one of the putative laccase genes of *G. metallireducens* GS-15 encodes a functional laccase and, if so, to characterize it. Gmet_2154, one of the five putative laccase genes of *G. metallireducens* GS-15, was heterologously expressed in *Escherichia coli* and the resulting protein isolated by using His-tag. The purified enzyme oxidized some of the typical laccase substrates, such as ABTS, 2,6-DMP and syringaldazine. Its temperature optimum was estimated to be 60 °C, and pH optima for ABTS and 2,6-DMP oxidation 5,0 and 8,0, respectively. As with other laccases, the enzymatic activity was inhibited by halide anions. It is possible that Gmet_2154 is also expressed *in vivo*, but its physiological role in *G. metallireducens* has not yet been determined. This laccase is the first known laccase originating from a strictly anaerobic microorganism. This work emphasizes the role of bioinformatics in finding novel bacterial laccases.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJI IN NAMEN DELA	2
1.3 HIPOTEZE.....	3
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 NEBAKTERIJSKI VIRI LAKAZ.....	4
2.1.1 Rastline.....	4
2.1.2 Glive.....	4
2.1.3 Žuželke.....	4
2.1.4 Arheje.....	5
2.2 ODKRIVANJE BAKTERIJSKIH LAKAZ.....	5
2.2.1 Prve bakterijske lakaze.....	5
2.2.2 Lakaze bakterij rodu <i>Bacillus</i>	6
2.2.3 Lakaze proteobakterij.....	7
2.2.4 Lakaze bakterij rodu <i>Streptomyces</i> in drugih aktinobakterij.....	10
2.2.5 Lakaza bakterije <i>Thermus thermophilus</i>	11
2.2.6 Lakaza bakterije <i>Aquifex aeolicus</i>	12
2.2.7 Lakaze cianobakterij.....	12
2.2.8 Lakaze iz bakterijskih metagenomov.....	12
2.2.9 Raznolikost bakterijskih lakaz v okolju in podatkovnih bazah.....	13
2.3 LASTNOSTI BAKTERIJSKIH LAKAZ.....	14
2.3.1 Struktura bakterijskih lakaz.....	14
2.3.2 Struktura aktivnega mesta.....	15
2.3.3 Kataliza reakcije.....	16
2.3.4 Substrati.....	16
2.3.5 pH optimum in toleranca.....	17
2.3.6 Temperaturni optimum.....	17
2.3.7 Inhibitorji.....	18
2.3.8 Funkcije lakaz.....	18
2.4 UPORABNOST LAKAZ.....	19
2.4.1 Papirna industrija - delignifikacija in beljenje pulpe.....	19
2.4.2 Tekstilna industrija.....	19
2.4.3 Živilska industrija.....	20
2.4.4 Bioremediacija tal.....	20
2.4.5 Sinteza organskih spojin.....	20
2.4.6 Biosenzorji.....	20
2.4.7 Druge uporabe lakaz.....	21
2.5 IZVORNI ORGANIZEM (<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15).....	21
3 MATERIALI IN METODE.....	23

3.1 MATERIALI.....	23
3.1.1 Bakterijski sevi.....	23
3.1.2 DNA.....	23
3.1.3 Encimi.....	24
3.1.4 Protitelesa.....	24
3.1.5 Kemikalije.....	25
3.1.6 Raztopine in pufri.....	26
3.1.7 Oprema.....	27
3.1.8 Laboratorijske naprave.....	28
3.2 METODE.....	28
3.2.1 Molekularno kloniranje.....	28
3.2.1.1 Priprava gojišč.....	29
3.2.1.2 Raztpljanje začetnih oligonukleotidov.....	30
3.2.1.3 Pomnoževanje genskih različic s PCR (verižna reakcija s polimerazo).....	30
3.2.1.4 Agarozna elektroforeza.....	32
3.2.1.5 Izolacija DNA iz gela.....	32
3.2.1.6 Restrikcija molekul DNA.....	33
3.2.1.7 Ligacija.....	33
3.2.1.8 Transformacija.....	34
3.2.1.9 Preverjanje uspešnosti transformacije in vstavitev inserta v plazmid.....	35
3.2.1.10 Izolacija plazmidov.....	35
3.2.1.11 Sekvenciranje vstavljenih genov v ekspresijskih plazmidov.....	35
3.2.1.12 Priprava trajne kulture.....	35
3.2.2 Proizvodnja različic domnevne lakaze.....	36
3.2.2.1 Izolacija različic lakaze iz bakterijske biomase.....	36
3.2.2.2 Menjava pufra v vzorcih.....	37
3.2.2.3 SDS-PAGE.....	37
3.2.2.4 Prenos western.....	38
3.2.3 Testiranje lakazne aktivnosti.....	39
3.2.3.1 Cimografija - encimski test v poliakrilamidnem gelu.....	39
3.2.3.2 Spektrofotometrične meritve encimske aktivnosti	39
3.2.4 Bioinformatska orodja.....	42
4 REZULTATI.....	43
4.1 MOLEKULARNO KLONIRANJE.....	43
4.1.1 Molekularno kloniranje GeoLacc-NHis.....	43
4.1.2 Molekularno kloniranje GeoLacc-noSP in GeoLacc-CHis.....	44
4.1.3 Sekvenciranje ekspresijskih plazmidov.....	46
4.2 PRODUKCIJA IN IZOLACIJA LAKAZ.....	48
4.2.1 Producija in izolacija GeoLacc-NHis.....	48
4.2.2 Producija in izolacija GeoLacc-noSP.....	49
4.2.3 Producija in izolacija GeoLacc-CHis	50
4.2.4 Primerjava heterologne produkcije in izolacije različic GeoLacc.....	52
4.2.5 Kontrola gostiteljske lakaze.....	53
4.2.6 Vpliv hitrosti mešanja na prekonočno produkcijo GeoLacc-CHis.....	55
4.3 ENCIMSKA KARAKTERIZACIJA LAKAZE <i>Geobacter metallireducens</i> GEOLACC-CHIS.....	57
4.3.1 pH optimum GeoLacc-CHis.....	57

4.3.2 Vpliv CuSO₄ na aktivnost GeoLacc-CHis.....	59
4.3.3 Vpliv temperature na aktivnost GeoLacc-CHis.....	60
4.3.4 Substrati GeoLacc-CHis.....	61
4.3.4.1 Razpon substratov.....	61
4.3.4.2 Kinetika oksidacije ABTS in 2,6-DMP.....	62
4.3.5 Inhibicija lakaze.....	64
4.3.5.1 Inhibicija GeoLacc-CHis z NaCl.....	64
4.3.5.2 Inhibicija GeoLacc-CHis z različnimi solmi.....	64
4.4 BIOINFORMATSKA ANALIZA LAKAZ <i>Geobacter metallireducens</i> GS-15.....	65
4.4.1 Primerjava zaporedja Gmet_2154 z zaporedji v podatkovnih bazah z algoritmom BLAST.....	66
4.4.2 Primerjava zaporedij ostalih domnevnih lakaznih genov <i>G. metallireducens</i> z zaporedji v podatkovnih bazah z algoritmom BLAST.....	68
5 RAZPRAVA	71
5.1 HETEROLOGNO IZRAŽANJE IN ČIŠČENJE LAKAZE BAKTERIJE <i>Geobacter metallireducens</i> GS-15.....	71
5.2 KATALITIČNA AKTIVNOST GEOLACC-CHIS.....	74
5.2.1 Vpliv bakra na aktivnost GeoLacc-CHis.....	75
5.2.2 Vpliv pH na aktivnost GeoLacc-CHis.....	76
5.2.3 Vpliv temperature na aktivnost GeoLacc-CHis.....	78
5.2.4 Substratna specifičnost GeoLacc-CHis.....	80
5.2.5 Vpliv ionov na aktivnost GeoLacc-CHis.....	81
5.3 PRIMERJAVA GEOLACC-CHIS Z DRUGIMI LAKAZAMI.....	82
5.4 BIOTEHNOLOŠKI POMEN LAKAZE GEOLACC-CHIS.....	83
6 SKLEPI.....	84
7 POVZETEK.....	84
8 VIRI.....	85

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam dsDNA molekul uporabljenih pri laboratorijskem delu in njihov namen.....	23
Preglednica 2: Seznam začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje domnevnega lakaznega gena Gmet_2154.....	24
Preglednica 3: Seznam encimov uporabljenih za različne namene med laboratorijskim delom.....	24
Preglednica 4: Protitelesa uporabljena za detekcijo heterologno izražene lakaze na membrani po prenosu western.....	24
Preglednica 5: Seznam uporabljenih kemikalij po namenu uporabe in proizvajalcu.....	25
Preglednica 6: Elektroforezni pufer za SDS-PAGE.....	26
Preglednica 7: Pufer za prenos western.....	26
Preglednica 8: Pufer za spiranje membrane po prenosu western.....	26
Preglednica 9: Pufer za razvijanje.....	26
Preglednica 10: Pufri za lizo celic, vezavo na kolono in izolacijo encima.....	26
Preglednica 11: Citrat-fosfatni pufri iz 0,2 M Na ₂ HPO ₄ in 0,1 M citronske kisline s končnim volumenom 20 ml.....	27
Preglednica 12: Seznam uporabljeni opreme po namenu in proizvajalcih.....	27
Preglednica 13: Seznam laboratorijskih naprav po proizvajalcu.....	28
Preglednica 14: Sestava reakcijske mešanice za eno reakcijo pomnoževanja gena GeoLacc-NHis.....	30
Preglednica 15: Sestava reakcijske mešanice za eno reakcijo pomnoževanja gena GeoLacc-noSP ali GeoLacc-CHis.....	31
Preglednica 16: Program za pomnoževanje različic lakaznega gena z genomske DNA.....	31
Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice za PCR na osnovi kolonije za preverjanje vstavitve pomnožkov PCR v pGEM-T Easy (oligonukleotid SP6) in prisotnosti plazmidov pHisTag+GeoLacc-noSP (oligonukleotid Geo1R) ter pET21-c(+)GeoLacc-CHis (oligonukleotid GeopET-R).....	31
Preglednica 18: Programi za PCR na osnovi kolonije za različice lakaznih genov.....	32
Preglednica 19: Sestava agaroznih elektroforeznih gelov za različne namene.....	32
Preglednica 20: Sestava restrikcijskih mešanic za različne kombinacije encimov in čas njihove inkubacije pri 37 °C	33
Preglednica 21: Sestava ligacijskih mešanic za različne kombinacije plazmidov in insertov ter pogoji inkubacije.....	34
Preglednica 22: Količine pufrov porabljeni med izolacijo proteina in volumni elucijskih frakcij.....	37
Preglednica 23: Sestava 10 % ločevalnega in 4 % nanašalnega poliakrilamidnega gela za SDS-PAGE.....	38
Preglednica 24: Uporabljeni lakazni substrati in valovne dolžine, pri katerih smo merili absorpcijo za spremljanje njihove oksidacije.....	39
Preglednica 25: Sestava reakcijskih mešanic za spektrofotometrično ugotavljanje lakazne aktivnosti in lastnosti lakaz.....	40
Preglednica 26: Preizkušeni substrati s kvalitativno oceno sposobnosti njihove oksidacije z GeoLacc-CHis.....	61
Preglednica 27: Identičnost in podobnost GeoLacc s homologi in nekaterimi okarakteriziranimi bakterijskimi lakazami na nivoju aminokislinskega zaporedja.....	67

Preglednica 28: Prisotnost signalnih peptidov in motivov pri GeoLacc, njegovih homologih in nekaterih okarakteriziranih lakazah.....	67
Preglednica 29: Na aminokislinski ravni najbolj podobni homologi ostalih domnevnih lakaznih genov bakterije <i>Geobacter metallireducens</i> GS-15.....	69
Preglednica 30: Nekatere vrednosti K_m za ABTS in 2,6-DMP pri različnih bakterijskih lakazah iz literature.....	75
Preglednica 31: pH optimumi bakterijskih lakaz iz literature.....	77
Preglednica 32: T optimumi bakterijskih lakaz iz literature.....	79

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz aminokislinskega zaporedja domnevne lakaze GeoLacc in treh heterologno izraženih različic.....	29
Slika 2: Agarozna elektroforeza pomnožkov PCR GeoLacc-NHis pri različnih temperaturah naleganja.....	43
Slika 3: Agarozna elektroforeza rezanega in nerezanega izoliranega pomnožka GeoLacc-NHis ter rezanega in nerezanega plazmida pHisTag.....	44
Slika 4: Agarozna elektroforeza pomnožkov PCR GeoLacc-CHis in GeoLacc-NHis pri različnih temperaturah naleganja.....	45
Slika 5: Agarozna elektroforeza PCR na osnovi kolonij transformant za preverjanje prisotnosti insertov v plazmidih pGEM-T Easy.....	46
Slika 6: Agarozna elektroforeza izoliranih lineariziranih plazmidov pHisTag in pET21-c(+) ter rezanih fragmentov GeoLacc-noSP in GeoLacc-CHis.....	46
Slika 7: Poravnavo aminokislinskih zaporedij različic GeoLacc.....	47
Slika 8: Analiza vzorcev GeoLacc-NHis z SDS-PAGE in prenosom western.....	48
Slika 9: Analiza vzorcev GeoLacc-NHis z SDS-PAGE in cimografijo z ABTS.....	49
Slika 10: Analiza vzorcev GeoLacc-noSP z SDS-PAGE.....	50
Slika 11: Analiza vzorcev GeoLacc-CHis z SDS-PAGE in prenosom western.....	51
Slika 12: Analiza vzorcev GeoLacc-CHis z SDS-PAGE in cimografijo z ABTS.....	51
Slika 13: Primerjava lakazne aktivnosti različnih vzorcev odvzetih med procesiranjem biomase in izolacijo heterologno proizvedenih različic lakaze.....	52
Slika 14: SDS-PAGE analiza vzorcev iz produkcije in izolacije GeoLacc-CHis in netransformiranega gostiteljskega seva <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE.....	54
Slika 15: Primerjava lakazne aktivnosti vzorcev produkcije in izolacije GeoLacc-CHis in netransformiranega gostiteljskega seva <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE.....	54
Slika 16: SDS-PAGE analiza vzorcev iz prekonočne produkcije (pri 85 RPM ali 200 RPM) in izolacije GeoLacc-CHis iz tako nagojene biomase.....	56
Slika 17: Primerjava lakazne aktivnosti vzorcev procesiranja biomase in izolacije GeoLacc-CHis iz biomase gojene prekonočno pri 85 RPM ali 200 RPM.....	56
Slika 18: Primerjava lakazne aktivnosti vzorcev procesiranja biomase in izolacije GeoLacc-CHis iz biomase gojene prekonočno pri 85 RPM ali 200 RPM z aktivnostmi vseh izolacijskih frakcij (od W20 do EL7) standardiziranimi na biomaso.....	57
Slika 19: Relativna aktivnost GeoLacc-CHis pri oksidaciji ABTS in 2,6-DMP v odvisnosti od pH.....	58
Slika 20: Aktivnost GeoLacc-CHis v odvisnosti od koncentracije bakrovega sulfata v reakcijski mešanici v območju od 0 do 1000 mM.....	59
Slika 21: Začetna aktivnost GeoLacc-CHis pri temperaturah med 40 in 90 °C.....	60
Slika 22: Rezidualna aktivnost GeoLacc-CHis po inkubaciji pri temperaturah med 40 in 90 °C za 15, 30, 45 ali 60 min.....	61
Slika 23: Strukturne formule preizkušenih substratov.....	62
Slika 24: Reprezentativen graf aktivnosti GeoLacc-CHis v odvisnosti od koncentracije substrata ABTS [mM].....	63
Slika 25: Reprezentativen graf aktivnosti GeoLacc-CHis v odvisnosti od koncentracije substrata 2,6-DMP [mM].....	63
Slika 26: Hitrost oksidacije 10 mM ABTS z GeoLacc-CHis v odvisnosti od koncentracije NaCl.....	64

Slika 27: Vpliv različnih soli na aktivnost GeoLacc-CHis.....	65
Slika 28: Filogenetsko drevo aminokislinskih zaporedij vseh (deloma) okarakteriziranih bakterijskih lakaz s homologi GeoLacc.....	70
Slika 29: pH optimumi za oksidacijo ABTS (levo) in 2,6-DMP (desno) za bakterijske ($N_{ABTS} = 24$, $N_{2,6\text{-DMP}} = 20$) in glivne ($N_{ABTS} = 52$, $N_{2,6\text{-DMP}} = 41$; Baldrian, 2006) lakaze.....	78
Slika 30: Temperaturni optimumi bakterijskih ($N = 34$) in glivnih ($N = 39$; Baldrian, 2006) lakaz.....	80

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2,6-DMP	2,6-dimetoksifenol
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
APS	amonijev persulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, algoritem za iskanje podobnih zaporedij
BSA	goveji serumski albumin (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	dvostranski deoksiribonukleinska kislina
EBI	European Bioinformatics Institute
EC	Enzyme Commission number
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina, kelator
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
IPTG	izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid, analog alolaktoze
L-DOPA	tudi DOPA; L-3,4-dihidroksifenilalanin, nevrotransmiter
LMS	sistem lakaze in mediatorja (ang. <i>laccase mediator system</i>)
MCO	oksidaza z več atomi bakra (ang. <i>multicopper oxidase</i>)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ni-NTA	nitrilotriocetna kislina s koordiniranim nikljevim atomom
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PVDF	poliviniliden fluorid
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
TEMED	tetrametiletilendiamin

1 UVOD

Encimi so biološki katalizatorji, ki s svojim delovanjem in prisotnostjo omogočajo potek metabolnih reakcij v živih organizmih. Velika večina encimov je proteinov, informacija o njihovi strukturi in funkciji pa je shranjena v genomu organizma. S pomočjo tehnologije rekombinantne DNA lahko danes z znanim genom proizvedemo poljubno količino encima.

Raznolikost encimske kataliziranih reakcij in sposobnost proizvodnje velike količine encimov sta spodbudila zanimanje za uporabo encimov v industrijah, kjer so pogosto potrebni ostri pogoji, npr. visoke temperature, ekstremni pH (velika poraba kislin in baz) in strupeni reagenti. Taki postopki so pogosto obremenjujoči za okolje, energetsko potratni in dragi, zato so alternative dobrodošle. Raba encimov je zaradi specifičnosti reakcij dobrodošla tudi v sintezi spojin, saj lahko zmanjšajo nastajanje stranskih produktov, rabo strupenih reagentov in omogočijo sintezo spojin, ki jih ni mogoče specifično sintetizirati s kemijskimi metodami. Med encimi, ki lahko vodijo do okolju bolj prijaznih industrijskih postopkov, so tudi lakaze - oksidoreduktaze, ki s pomočjo koordiniranih bakrovih atomov katalizirajo oksidacijo (poli)fenolnih in nefenolnih spojin ob redukciji kisika do vode (Claus, 2003).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Kot industrijsko pomembne encime lakaze obravnavamo zaradi širokega spektra substratov in razpona reakcij, ki jih z ustvarjanjem radikalov katalizirajo, npr. kovalentno povezovanje fenolov, razgradnja polimerov in cepitev aromatskega obroča. Za katalizo ne potrebujejo dragih kofaktorjev. Uporabne so za predobdelavo pulpe v papirni industriji, razbarvanje barvil v tekstilni industriji, bioremediacijo in sintezo različnih spojin (Dwivedi in sod., 2011).

Lakaze so že konec 19. stoletja odkrili pri rastlinah in glivah (Yoshida, 1883; cit. po Morozova in sod., 2007). Glivne lakaze so danes daleč najbolj raziskane, posebno tiste iz gliv bele trohnobe. Mnoge so visoko aktivne, a je njihova uporaba zaradi pH preference in termostabilnosti omejena na kisle reakcijske pogoje in mezofilne temperature. Ker so glivne lakaze močno glikozilirane, jih ne moremo proizvajati v bakterijskih ekspresijskih sistemih (Gunne in Urlacher, 2012). Lakaze z drugačnimi biokemijskimi lastnostmi lahko razširijo uporabo teh encimov na dodatna industrijska področja oziroma povečajo njihovo učinkovitost.

Več kot 100 let po odkritju prve lakaze so Givaudan in sodelavci (1993) oznanili obstoj

bakterijskih lakaz, potem ko so lakazno aktivnost zaznali pri bakteriji *Azospirillum lipoferum* (Givaudan in sod., 1993). Po postopnem odkrivanju lakaz v posameznih vrstah je z razmahom genomike in bioinformatike nastopilo obdobje širšega odkrivanja bakterijskih lakaz. Rezultati BLAST analiz genomskev baz so dali slutiti, da so lakaze pri bakterijah bolj razširjene, kot je veljalo do tedaj (Alexandre in Zhulin, 2000). Med najbolj znanimi bakterijskimi lakazami je CotA iz endospor vrste *Bacillus subtilis* (Hullo in sod., 2001; Martins in sod., 2002), za katero so določili tudi kristalno strukturo (Enguita in sod., 2003). Karakterizacija bakterijskih lakaz je pokazala drugačne lastnosti kot pri znanih glivnih lakazah, npr. delovanje tudi v bazičnem območju pH, visoka termostabilnost in odpornost na kloridne ione (Sharma in sod., 2007).

Odkritje bakterijskih lakaz je ponovno odprlo tudi vprašanje o funkciji lakaz. Pri glivah so jih sprva obravnavali kot ekstracelularne encime za razgradnjo polimerov, vendar igrajo vlogo tudi v morfogenezi in patogenezi (Arora in Sharma, 2010). Pri bakterijah so jih sprva povezovali s sintezo pigmentov (Martins in sod., 2002) in oksidacijo kovin (Singh in sod., 2004). Raznolikost in razširjenost bakterijskih lakaz v bakterijskih genomih je razkrila bioinformatska analiza, ki so jo leta 2011 izvedli Ausec in sodelavci. Pri analizi genomov 2211 organizmov so odkrili 1240 domnevnih lakaznih genov pri 807 (36 %) mikroorganizmih najrazličnejših skupin, kar nakazuje na raznolikost funkcij. Med vrstami z domnevнимi geni za lakaze je tudi *Geobacter metallireducens* (Ausec in sod., 2011b). Da v genomu *Geobacter metallireducens* GS-15 najdemo domnevne lakazne gene, je zanimivo, saj gre za striktno anaeroben organizem, lakaza pa kot prejemnik elektronov uporablja kisik. Zanimivost te lakaze je očitna tako z biotehnoškega kot biološkega vidika, zato so ekspresija, izolacija in karakterizacija tega encima smiselnii.

1.2 CILJI IN NAMEN DELA

Cilj magistrskega dela je z molekularnim kloniranjem prenesti domnevni lakazni gen Gmet_2154 iz genoma bakterije *Geobacter metallireducens* GS-15 v ekspresijski vektor z zapisom za heksahistidinski označevalec, gen izraziti v gostiteljski bakteriji *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE, nastali protein izolirati in biokemijsko okarakterizirati njegovo lakazno aktivnost.

Namen tega dela je preveriti, če domnevni lakazni gen iz striktno anaerobnega mikroorganizma kodira funkcionalno lakazo, in morebitno lakazo izolirati in okarakterizirati. Rezultati tega dela so lahko biotehnoško zanimivi in lahko vodijo do novih doganj o bakterijskih lakazah.

1.3 HIPOTEZE

- Kodirajoči del gena Gmet_2154 iz genoma *Geobacter metallireducens* GS-15 kodira funkcionalno lakazo.
- Lakazo bakterije *G. metallireducens* GS-15 s histidinskim označevalcem je možno heterologno izraziti v gostitelju *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE v topni obliki.
- Heterologno izraženo lakazo lahko z Ni-NTA agarozo izoliramo v aktivni nativni obliki.

2 PREGLED OBJAV

Lakaze (benzendiol: kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2) so oksidoreduktaze, ki z enoelektronskimi prenosi oksidirajo različne fenolne in polifenolne substrate in s štirimi elektroni reducirajo kisik do molekule vode. Pri oksidaciji substrata nastajajo reaktivni radikali (Claus, 2003). Najdemo jih v vseh domenah življenja. Čeprav so bile rastlinske lakaze že v 19. stoletju med prvimi identificiranimi encimi, njihovi naravnvi substrati ostajajo neznani in funkcije nejasne, še posebno pri bakterijah (Singh G. in sod., 2011).

2.1 NEBAKTERIJSKI VIRI LAKAZ

2.1.1 Rastline

Prva lakaza je bila odkrita v kraljestvu rastlin, saj jo je že leta 1883 Yoshida identificiral v eksudatu loščevca (*Rhus vernicifera*, danes *Toxicodendron vernifluum*). Ime "lakaza" izvira iz angleškega imena tega drevesa - "lacquer tree". Lakaze so prisotne v smolah vseh predstavnic družine Anacardiaceae, kamor spada omenjeni loščevevec. Z zaznavanjem aktivnosti, molekularnimi metodami in bioinformatiko so lakaze odkrili tudi pri drugih rastlinah (Alcalde, 2007).

2.1.2 Glive

Kmalu po odkritju lakaze pri loščevcu sta leta 1896 Bertrand in Laborde neodvisno pokazala, da lakaze najdemo tudi pri glivah (Bertrand, 1896; Laborde, 1896; cit. po Madhavi in Lele, 2009). Lakazno aktivnost so od takrat pokazali pri več kot 60 bazidiomicetah, askomicetah in deuteromicetah. Opažena je bila pri praktično vsaki glivi, kjer so aktivnost preverjali (Alcalde, 2007). Večina v literaturi opisanih lakaz je bila izolirana iz višjih gliv (Morozova in sod., 2007). Lakazna aktivnost je posebno visoka pri glivah bele trohnobe, ki razgrajujejo lignin (npr. *Trametes versicolor*). Najdemo jih tudi pri rastlinskih patogenih (npr. *Botrytis cinerea*) in človeškem oportunističnem patogenu *Cryptococcus neoformans* (Dwivedi in sod., 2011).

2.1.3 Žuželke

Pri žuželkah so lakazno aktivnost oksidacije dimetil-p-fenilendiamina odkrili v kutikuli bube mušice *Drosophila virilis*. V 70. in 80. letih 20. stoletja so izolirali in okarakterizirali lakaze iz kutikul drugih žuželk, npr. sviloprejke (*Bombyx mori*) in puščavske kobilice (*Schistocerca gregaria*) (Yatsu in Asano, 2009). Opazili so jih pri več kot ducat rodovih

(Madhavi in Lele, 2009). Najverjetneje igrajo vlogo pri sklerotizaciji kutikule (Yatsu in Asano, 2009), pri komarjih *Anopheles* pa so jih našli v prebavilih (Lang in sod., 2012).

2.1.4 Arheje

Odkritju lakaznih genov pri arhejah je botrovalo odkritje bakterijskih lakaz na koncu 20. stoletja in sekvenciranje arhejskih genomov v prvem desetletju 21. stoletja. Sharma in Kuhad (2009) sta z bioinformatiko pokazala prisotnost domnevnih lakaznih genov v arhejah *Pyrobaculum aerophilum*, *Haloarcula marismortui*, *Natronomonas pharaonis*, *Halorubrum lacusprofundi* in *Nitrosopumilus maritimus*. Arhejske lakaze so morda prednica nitritne reduktaze, ceruloplazmina in askorbat oksidaze (Sharma in Kuhad, 2009). Leto kasneje je bila prvič okarakterizirana arhejska lakaza, ki so jo izolirali iz *Haloferax volcanii* in je ena od redkih arhejskih glikoproteinov. Majhno število odkritih lakaz pri arhejah je lahko posledica tega, da večina genomskih zaporedij arhej do leta 2010 pripada anaerobom, lakaza pa za aktivnost potrebuje molekularni kisik (Uthandi in sod., 2012). Lakazam podoben encim je tudi termostabilna oksidaza z več atomi bakra (ang. *multi-copper oxidase* ali MCO) odkrita pri arheji *Pyrobaculum aerophilum*, ki oksidira lakazna substrata ABTS in siringaldazin, poleg kisika pa lahko celo bolj učinkovito reducira didušikov oksid (Fernandes in sod., 2010).

2.2 ODKRIVANJE BAKTERIJSKIH LAKAZ

2.2.1 Prve bakterijske lakaze

Leta 1993 so pri negibljivem melanogenem sevu proteobakterije *Azospirillum lipoferum* iz rizosfere riža poročali o prvi bakterijski lakazni aktivnosti (Givaudan in sod., 1993). Kasneje so jo zaznali tudi pri vrstah *A. brasiliense*, *A. irakense* in *A. amazonense* (Nikitina in sod., 2010).

Med prvimi odkritimi bakterijskimi lakazami je tudi lakaza bakterije *Bacillus sphaericus*, katere aktivnost je močno korelirala s sporulacijo (Claus in Filip, 1997). Istega leta so poročali o prisotnosti lakaze pri sredozemski melanogeni bakteriji (Solano in sod., 1997), ki so jo kmalu uvrstili v novo vrsto *Marinomonas mediterranea* MMB-1 (Fernández in sod., 1999). Njen ekstrakt je oksidiral substrate lakaz in tirozinaz vključno z encimsko specifičnima substratoma siringaldazinom in L-tirozinom. Z SDS-PAGE so opazili kolokalizacijo obeh aktivnosti (Solano in sod., 1997). S heterologno ekspresijo gena *ppoA* so potrdili lakazno in tirozinazno aktivnost v enem encimu (Sanchez-Amat in sod., 2001).

Mnenje, da so morda lakaze razširjene po celotni domeni bakterij, sta okrepila Alexandre in Zhulin (2000), ki sta z algoritmom BLAST v različnih bakterijskih genomih našla prepričljive homologe glivnih lakaz in s tem spodbudila iskanje novih.

2.2.2 Lakaze bakterij rodu *Bacillus*

Pri bakteriji *Bacillus subtilis* so podobno kot pri *B. sphaericus* našli lakazno aktivnost v endosporah, za katero je odgovoren protein CotA iz njihovega plašča. Podobnost CotA z oksidazami z več atomi bakra je bila znana že prej, da gre res za lakazo, pa so pokazali eksperimentalno. CotA ustvarja pigment, ki je glavna zaščita spor pred UV sevanjem in vodikovim peroksidom (Hullo in sod., 2001). Kristalni strukturi CotA je bila od znanih najbolj podobna struktura CueO, ki je oksidaza z več atomi bakra in jo najdemo pri bakteriji *Escherichia coli* (Enguita in sod., 2003). CotA so kristalizirali tudi v prisotnosti substrata ABTS in okarakterizirali vezavno mesto za substrat in molekularni kisik (Enguita in sod., 2004), kar je omogočilo deloma tarčno laboratorijsko evolucijo lakaz (Gupta in Farinas, 2010; Gupta in sod., 2010).

Lakaza CotA je ena od najbolje okarakteriziranih bakterijskih lakaz. Različne študije so raziskale razpon substratov, katerih oksidacijo katalizira CotA. Pokazali so oksidacijo različnih mono- in dimetoksifenolov (Hirose in sod., 2003) in celo sposobnost oksidacije bilirubina (Sakasegawa in sod., 2006). Tako kot CotA je termostabilna in alkalotolerantna tudi lakaza seva *Bacillus subtilis* WD23 iz gozdne prsti iz enega od kitajskih rezervatov. Njegove spore niso bile pigmentirane, je pa sev odporen na baker, kar kaže na možno funkcijo njegove lakaze (Wang in sod., 2010).

Lakaze endospor so prisotne tudi v drugih bakterijah rodu *Bacillus*. Nekatere od njih so našli s pomočjo bioinformatike. Leta 2004 so s pomočjo algoritma BLAST našli lakazni gen alkalifilne bakterije *B. halodurans* (Ruijssenaars in Hartmans, 2004). Preiskovanje podatkovnih baz je vodilo tudi k odkritju lakaze bakterije *B. licheniformis* (Koschorreck in sod., 2008). Lakazna gena *B. halodurans* in *B. licheniformis* so z namenom karakterizacije klonirali in heterologno izrazili v *E. coli*. Enako so storili tudi z lakazo bakterije *B. licheniformis* LS04 izolirane iz vzorcev iz istega rezervata kot omenjeni *B. subtilis* WD23 (Lu in sod., 2012). Lakazo bakterije *B. pumilus* so odkrili z raziskovanjem njenega genoma. Razpon substratov, katerih oksidacijo katalizira heterologno proizvedeni encim, so preverili kar s 37 spojinami (Reiss in sod., 2011). Med drugim lahko lakaza *B. pumilus* oksidira tudi bilirubin (Durand in sod., 2012).

Eden od iranskih izolatov iz rizosfere in rizoplana krompirja, HR03, je bližnji sorodnik *B.*

atrophaeus in tako kot MMB-1 kaže tirozinazno in lakazno aktivnost (Dalfard in sod., 2006). Lakaza tega seva je 98,2 % identična in 98,8 % podobna CotA *B. subtilis*, s katerim sta primerljiva tudi pH profil aktivnosti in termostabilnost z *E. coli* proizvedenega encima (Mohammadian in sod., 2010). Na podlagi strukture CotA so jo uspešno mutirali (Mollania in sod., 2011). Med izolati iz odlagališč odpadkov tekstilne industrije so našli sev *B. vallismortis* z lakazno aktivnostjo brez pigmentiranih spor (Zhang in sod., 2012). Na podlagi oksidacije ABTS so domnevno lakazno aktivnost spor morskega izolata *Bacillus* primerjali z aktivnostjo izolatov identificiranih kot *Sporosarcina halophila*, *B. amyloliquefaciens* in *B. firmus* (Abari in sod., 2012). Lakazo *B. amyloliquefaciens* so sicer leto prej okarakterizirali Pan in sod. (2011).

Bakterije rodu *Bacillus* lahko proizvajajo tudi ekstracelularne lakaze. Taka je 66 kDa lakaza *Bacillus sp.* ADR, ki je sposobna razgrajevanja tekstilnih barvil in ne oksidira bolj znanih substratov, kot so ABTS, siringaldazin in katehol (Telke in sod., 2011). Taki primeri so že znani iz sveta gliv.

Delno očiščena je bila tudi lakaza bakterije *Brevibacillus laterosporus*, ki skupaj z rodom *Bacillus* spada v družino Bacillaceae (Gomare in sod., 2009). Nekateri sevi *Staphylococcus aureus*, ki spada v red Bacillales, vsebujejo homologe oksidaz z več atomi bakra. Heterologno izražen produkt gena *mco* oksidira 3,3'-dimetoksibenzidin (Sitthisak in sod., 2005).

2.2.3 Lakaze proteobakterij

Kljub temu, da je *Azospirillum lipoferum* tudi proteobakterija, je daleč najbolj okarakterizirana proteobakterijska lakaza CueO (prej YacK) γ -proteobakterije *Escherichia coli*. Protein je bil najprej znan kot zaščitni faktor pred bakrom, vendar je bila opažena podobnost z oksidazami z več atomi bakra, na katero sta opozorila tudi Alexandre in Zhulin (2000). Encim oksidira tipične lakazne substrate in Fe(II), fenolatne siderofore, ki so potencialne naravne tarče lakaz, pa oksidira ne glede na prisotnost železovih ionov (Kim in sod., 2001). S potrditvijo oksidazne aktivnosti so YacK preimenovali v predhodno predlagani CueO (“copper efflux oxidase”) (Grass in Rensing, 2001). Kristalna struktura CueO je podobna strukturam ostalih lakaz. Glavna razlika je vijačna z metionini bogata regija 45 aminokislin na začetku tretje domene, ki pokriva mesto za vezavo substrata (Roberts in sod., 2002) in je odgovorna za oksidacijo bakra (Kataoka in sod., 2007). Ta vijačnica vsebuje še vsaj tri dodatna vezavna mesta za Cu(I). Mutacija šestega in sedmega mesta 4-krat zmanjša oksidacijo bakra (Singh S. K. in sod., 2011).

Večina okarakteriziranih proteobakterijskih lakaz prihaja iz γ -proteobakterij (npr. *E. coli*, *M. mediterranea* MMB-1 in bakterije rodu *Azospirillum*). Halofilna lakaza γ -proteobakterije JB je ena od tistih, pri katerih so pokazali razbarvanje industrijskega barvila indigo karmin (Singh in sod., 2007). Sev “ γ -proteobakterija JB” sicer pripada rodu *Rheinheimera* (Virk in sod., 2012). Aminokislinsko zaporedje okarakterizirane lakaze enterobakterije *Klebsiella* sp. 601 je 90 % podobno CueO (Li in sod., 2008). Wu in sod. so poročali o prisotnosti lakazne aktivnosti v bakteriji *Shewanella oneidensis* WL-7, določene zgolj na podlagi oksidacije ABTS, in možni vpletjenosti lakaz v razbarvanje azo barvil z nekaterimi sevi rodu *Shewanella*, vendar encima še niso izolirali (Wu in sod., 2009). Potrjena je bila aktivnost domnevne periplazemske lakaze v genomu antarktične vodne bakterije *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (Papa in sod., 2009). Lakazno aktivnost so opazili tudi pri tunizijskem izolatu *Stenotrophomonas maltophilia* (Galai in sod., 2009), kjer je lakaza CopA vpletena v odpornost na baker (Galai in sod., 2011). Pri γ -proteobakteriji *Lysobacter* sp. T-15 (najbolj soroden je *Lysobacter brunescens*), izolirani iz aktivnega blata, so odkrili prvo lakazo z urat oksidazno aktivnostjo, ki oksidira tudi bilirubin (Tamaki in sod., 2010). Okarakterizirali so tudi lakazo seva *Aeromonas hydrophila* WL-11 iz aktivnega blata čistilne naprave odplak industrije tekstila in barvil (Wu in sod., 2010). Produkt gena *cueO* pri patogeni enterobakteriji *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *in vitro* oksidira baker in železo z večjo afiniteto kot CueO *E. coli*, niso pa preverili oksidacije lakaznih substratov (Achard in sod., 2010). *A. chroococcum* SBUG 1484 ob začetku fiksacije dušika tvori barvilo in proizvaja lakazo (Herter in sod., 2011).

Rod *Pseudomonas* ima več vrst z opisano lakazno aktivnostjo. Homologi CumA, ki naj bi oksidiral Mn^{2+} , so prisotni pri mnogih. Francis in Tebo sta na podlagi podobnosti z glivnimi lakazami protein CumA povezala s sposobnostjo oksidacije organskih substratov. Vsi Mn^{2+} oksidirajoči sevi (*P. putida* MnB1 in GB-1, PCP, PCP2, GP11 in SI85-2B) oksidirajo tudi ABTS, ne oksidirajo pa ga sevi, ki Mn^{2+} slabo oksidirajo ali sploh ne (Francis in Tebo, 2001). Geszvain in Tebo sta sicer kasneje ugotovila, da za oksidacijo Mn^{2+} pri *P. putida* GB-1 ni odgovoren CumA, pač pa dvokomponentna regulatorna pot *MnxS1/MnxS2/MnxR* (Geszvain in Tebo, 2010). O lakazni aktivnosti so poročali pri vrsti *P. stutzeri* (Kumar in sod., 2005), pri *P. putida* F6 pa so odkrili lakazno in tirozinazno aktivnost, kar so pri bakterijah opazili le še pri *Marinomonas mediterranea* MMB-1, *Ralstonia solanacearum*, *Streptomyces* spp., *Sinorhizobium meliloti* (McMahon in sod., 2007) in *Bacillus* sp. HR03 (Dalfard in sod., 2006). Proizvodnjo ekstracelularne lakaze so opazili pri *Pseudomonas* sp. LBC1 izolirani z odlagališča odplak tekstilne industrije (Telke in sod., 2009).

Analiza genomov bakterijskih patogenov je pokazala prisotnost oksidaz z več atomi bakra, ki so morda odgovorne za oksidacijo železa med njegovim privzemom. Hipotezo so preizkusili z bakterijo *P. aeruginosa*, kjer so našli gen *pcoA*. Ekstrakt *P. aeruginosa* oksidira Fe(II) in *p*-fenilendiamin, ne pa Mn(II). PcoA je pri aerobnih pogojih izrednega pomena za privzem Fe(II), ne vpliva pa na odpornost na baker (Huston in sod., 2002). V genomu γ -proteobakterije *Legionella pneumophila*, fakultativnega intracelularnega patogena, so našli gen za oksidazo z več atomi bakra, ki je morda prav tako vpletena v metabolizem železa, ki je za rast in patogenezo te bakterije zelo pomembno (Huston in sod., 2008). Izolirali, okarakterizirali in mutirali so tudi lakazo *Wlac* patogene γ -proteobakterije *Shigella dysenteriae* (Shao in sod., 2009). Zadnjih dveh niso bolj podrobno okarakterizirali. Zaradi neuspele heterologne proizvodnje in nezadostne količine proizvedene z brezceličnim sistemom za sintezo proteinov tudi CopA rastlinskega patogena *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* niso okarakterizirali. *copA* je najpomembnejši gen za patogenost in odpornost proti bakru. Celični ekstrakt divjega tipa oksidira 2,6-DMP, mutanta *copA* pa precej manj (Hsiao in sod., 2011).

Lakazo α -proteobakterije *Sinorhizobium meliloti* so odkrili med preučevanjem interakcije riža z bakterijami rodu *Azospirillum* in sevi *S. meliloti*, kjer so pri melanogenih sevih *S. meliloti* opazili lakazno in tirozinazno aktivnost (Castro-Sowinski in sod., 2002). Lakazo melanogenih sevov *S. meliloti* iz nodulov lucerne so kasneje delno izolirali in okarakterizirali (Rosconi in sod., 2005).

Prva okarakterizirana lakaza vijolične nežveplove fotosintetske bakterije je lakaza α -proteobakterije *Rhodobacter capsulatus*. Predstavniki te skupine α -proteobakterij so metabolno zelo raznoliki. Lakaza CutO je pomembna za odpornost *R. capsulatus* na baker v aerobnih in anaerobnih pogojih, CueO pri *E. coli* pa samo v aerobnih (Wiethaus in sod., 2006). *Pedomicrobium* sp. ACM 3067 je α -proteobakterija, ki lahko oksidira Mn²⁺ v netopni manganov oksid. Za oksidacijo mangana in ABTS je potreben produkt gena *moxA*, homolog oksidaz z več atomi bakra in CumA iz *Pseudomonas putida* (Ridge in sod., 2007). α -proteobakterijski sev Q-1 kaže od kisika odvisno jodid oksidirajočo aktivnost. Eden od dveh aktivnih encimov vsebuje baker in cink, kaže tudi lakazno aktivnost, ne oksidira Mn²⁺ in ne kaže peroksidazne ali haloperoksidazne aktivnosti. To je do takrat najučinkovitejša jodid oksidaza (Suzuki in sod., 2012). Iz mikrobično erodiranih bambusovih plasti so izolirali α -proteobakterijo *Novosphingobium* sp. B-7 (Chen in sod., 2012a) in β -proteobakterijo *Comamonas* sp. B-9 (Chen in sod., 2012b), ki lahko rasteta z lakaznimi substrati, npr. gvajakol, vanilinska kislina in cimetna kislina, kot edinimi viri ogljika. Pri obeh so opazili produkcijo lakaze in manganove peroksidaze med degradacijo

Kraft lignina. Lakaz samih niso okarakterizirali (Chen in sod., 2012a; Chen in sod., 2012b).

Prvo lakazo β -proteobakterij je razkrilo sekvenciranje genoma *Ralstonia solanacearum*, ki nosi zapisa za tri polifenol oksidaze z lakazno, krezolazno in katehol oksidazno aktivnostjo. Mnoge bakterije in glice s polifenol oksidazno aktivnostjo interagirajo z rastlinami, kjer del obrambe pred patogeni predstavlja lokalen dvig koncentracije fenolnih spojin in različnih obrambnih sekundarnih metabolitov (Hernández-Romero in sod., 2005). Bakterijske vrste, ki interagirajo z rastlinami, pogosto vsebujejo več domnevnih lakaznih genov (Ausec in sod., 2011b). Lakaza Rsp1530 ima homologe pri različnih bakterijah, nekatere od teh pa prav tako interagirajo z rastlinami (Hernández-Romero in sod., 2005). Oksidazo z več atomi bakra β -proteobakterije *Nitrosomonas europaea* so odkrili že leta 1985, vendar so jo opisali kot *p*-fenilendiamin oksidazo. Ob oksidaciji citokroma c-552 ta oksidaza reducira nitrit, kar kaže na verjetno evolucijsko povezanost lakaz in nitrit reduktaz (Nakamura in Go, 2005). Kristalno strukturo tega dvodomenskega proteina so določili leta 2009 (Lawton in sod., 2009). Istega leta so izolirali in okarakterizirali lakazo bakterije *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 (Kalme in sod., 2009), ki so jo kasneje v različnih mikrobnih zbirkah reklassificirali v vrsto *Delftia acidovorans*, ki spada med β -proteobakterije.

ϵ -proteobakterija *Campylobacter jejuni*, človeški oportunistični patogen, vsebuje 38 % identičen homolog CueO (Hall in sod., 2008). Njegova glavna funkcija je verjetno oksidacija Cu(I). Po kristalni strukturi sodeč mesto za vezavo substrata kot pri CueO prekriva regija bogata z metioninom, kar lahko pojasni manjšo aktivnost proti fenolnim substratom (Silva in sod., 2012).

Lakaze δ -proteobakterij še niso bile okarakterizirane. Pri bakteriji *Myxococcus xanthus* so sicer deloma okarakterizirali tri oksidaze z več atomi bakra, ki oksidirajo baker in celice pred njim ščitijo, vendar ne oksidirajo tipičnih lakaznih substratov, kot sta ABTS in 2,6-DMP (Sánchez-Sutil in sod., 2007).

2.2.4 Lakaze bakterij rodu *Streptomyces* in drugih aktinobakterij

Fenolne oksidaze rodu *Streptomyces* so raziskovali zaradi morebitne vpletene v morfogenezo in proizvodnjo antibiotikov. Morfogeneza korelira s pigmentacijo, kamor je poleg tirozinaze vpletena še vsaj ena fenolna oksidaza. Pri *Streptomyces griseus* so potrdili prisotnost lakaze, ki je odvisna od regulacije morfogeneze. Iz micelija so izolirali lakazo

EpoA in jo okarakterizirali (Endo in sod., 2002) kot prvo homotrimerno lakazo. Po oksidaciji substrata DOPA z EpoA nastane pigment, katerega brezbarvna frakcija med 500 in 1000 Da vpliva na morfogenezo (Endo in sod., 2002). Tudi heterologno izraženo lakazo EpoA so okarakterizirali (Endo in sod., 2003). Leto kasneje so okarakterizirali glavno ekstracelularno lakazo *Streptomyces coelicolor* – majhno dvodomensko lakazo, imenovano SLAC (“small laccase”). Heterologno proizvedeni encim ni aktiven kot monomer in oksidira različne fenolne in nefenolne substrate (Machczynski in sod., 2004). SLAC je tako kot EpoA relativno odporen na inhibitorje (Dubé in sod., 2008). Analiza kristalne strukture je pokazala, da je SLAC v raztopini homotrimer (Skálová in sod., 2009). Ekstracelularna lakaza SilA *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 je 90 % in 73 % identična SLAC oziroma EpoA. Aktiven je dimer. SilA je ena od najbolj halotolerantnih lakaz (Molina-Guijarro in sod., 2009). Drugo halotolerantno oziroma celo halofilno lakazo proizvaja sev *Streptomyces psammoticus* MTCC 7334 iz mangrov (Niladevi in Prema, 2005). Je glikoprotein, pri katerem 10 % mase predstavlja sladkorji (Niladevi in sod., 2008). Še neokarakterizirano lakazo proizvaja tudi *Streptomyces cinnamomensis* (Jing in Wang, 2012).

S pomočjo podatkovne baze LccED (Sirim in sod., 2011) so pri *Streptomyces sviceus* identificirali lakazo Ssl1 (Gunne in Urlacher, 2012). Genom *S. sviceus* vsebuje dva gena za lakazi – eno homologno CueO in drugo, Ssl1, homologno SLAC, ki spada v isto družino dvodomenskih lakaz SUBfamily K kot EpoA (*S. griseus*), SLAC (*S. coelicolor*) in SilA (*S. ipomoea*). Menijo, da je tudi Ssl1 v raztopini homotrimer (Gunne in Urlacher, 2012).

Oksidacijo ABTS in s tem potencialno lakazno aktivnost so sicer pri *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 opazili že Berrocal in sod. (1997), vendar so jo kot lakazno aktivnost okarakterizirali šele kasneje (Arias in sod., 2003). Pri talni bakteriji *Streptomyces lavendulae* REN-7 so odkrili termostabilno lakazo STSL (*Streptomyces* thermostable laccase) (Suzuki in sod., 2003).

Iz prebavnega trakta termitov so izolirali 39 sevov aktinobakterij, od katerih jih je 15 oksidiralo substrate lakaz. Velika večina izoliranih sevov pripada rodu *Streptomyces*, oba seva, ki pripadata rodu *Nocardia*, pa sta tudi proizvajala lakazo (Le Roes-Hill in sod., 2011).

2.2.5 Lakaza bakterije *Thermus thermophilus*

Thermus thermophilus HB27 je hipertermofilna bakterija, ki raste pri temperaturah do 85 °C, optimalno pri 68 °C. V njenem genomu so našli domnevni lakazni gen, pri sorodnem

sevu *T. thermophilus* HB8 pa ne (Miyazaki, 2005). Tako kot CueO tudi lakaza *T. thermophilus* vsebuje z metioninom bogato območje. Njen temperaturni optimum je 92 °C, kar je najvišja znana vrednost do zdaj. Po 10 min inkubaciji pri 100 °C še vedno ohrani dve tretjini aktivnosti. Razpolovna doba aktivnosti je pri 80 °C 868 min, kar je sedemkrat dlje kot pri CotA (Miyazaki, 2005). Leta 2011 so ugotovili kristalno strukturo apo in holo oblike encima (Serrano-Posada in sod., 2011).

2.2.6 Lakaza bakterije *Aquifex aeolicus*

V genomu hipertermofilnega mikroaerofila *Aquifex aeolicus* se nahaja gen za oksidazo z več atomi bakra McoA. Lociran je v bližini 6 genov, od katerih jih 5 kodira produkte, ki so ortologi proteinov za odpornost na baker v *E. coli*. McoA verjetno deluje *in vivo* kot metalooksidaza za razstrupljanje kovin. Metioninska regija je ključen dejavnik pri katalitičnem mehanizmu in verjetno veže bakrove ione, ki sodelujejo pri katalizi (podobno kot pri CueO) (Fernandes in sod., 2007).

2.2.7 Lakaze cianobakterij

O lakazni aktivnosti so pri cianobakterijah poročali že leta 1996. Izmerili so jo pri heterocistični bakteriji *Anabaena azollae* (Dwivedi in sod., 2011). Sekvenciranje genomov je razkrilo širšo prisotnost domnevnih lakaznih genov tudi pri tej skupini bakterij. Lakazno aktivnost so zaznali pri štirih od 10 sevov morskih cianobakterij, ki do neke mere razbarvajo poliantrakinonsko barvilo Poly R-478. Posamezne lakaze niso bile bolj podrobno okarakterizirane (Palanisami in sod., 2009). *Oscillatoria willei* BDU 130511 proizvaja dve izoformi lakaze, ki oksidirata ABTS (Saha in sod., 2010).

2.2.8 Lakaze iz bakterijskih metagenomov

Potencialno lakazo RL5 so odkrili v fagni knjižnici metagenoma govejega vampa, ki so jo presejali z aktivnostnim testom za lakaze. Gen kodira produkt z molekulsko maso 28,3 kDa. Njena homologa YfiH (*Escherichia coli*) in BT4389 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) sta majhna proteina (25 kDa in 30 kDa) z dimerno kvartarno strukturo in podobnimi lastnostmi. Je prvi funkcionalno okarakteriziran predstavnik nove lakazne družine in ima veliko višjo aktivnost in afinitete do substratov kot do zdaj opisane lakaze (Beloqui in sod., 2006), vendar do sedaj še ni bilo neodvisne potrditve, da je ta majhen protein dejansko lakaza. Z metagenomskim pristopom so odkrili tudi alkalotolerantno lakazo Lac591 v metagenomski knjižnici tal iz gozdov mangrov, ki je najbolj identična (52 %) lakazi *Bacillus halodurans* C-125 (Ye in sod., 2010). Z naključno mutagenezo Lac591 so dobili

štirikratno mutanto s povišano specifičnostjo za 2,6-DMP, optimalno temperaturo in pH in izboljšanim delovanjem pri razbarvanju tekstilnih barvil (Liu in sod., 2011).

Leta 2009 so v metagenomskih zaporedjih našli gen, ki kodira dvodomensko lakazo poimenovano mgLAC (Komori in sod., 2009). Njeno aminokislinsko zaporedje ima največje podobnosti z dvodomenskimi oksidazami z več atomi bakra bakterij *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter hamburgensis* in *Sphingomonas wittichii*. Druge znane dvodomenske lakaze prihajajo iz rodu *Streptomyces*, vendar so drugega tipa (tip B) kot mgLAC (tip C). Po strukturi je podobna drugim proteinom z več atomi bakra in nitritnim reduktazam.

Funkcionalni presejalni test metagenoma bakterij Južnega kitajskega morja ni obrodil sadov, a so na podlagi ohranjenih zaporedij v istem metagenomu odkrili gen *lac15*, ki kodira alkalotolerantno lakazo odporno na kloridne ione (Fang in sod., 2011). Koncentracije NaCl do 700 mM so aktivnost heterologno izraženega Lac15 povečale na okoli 200 %. Encimska aktivnost se je razpolovila šele pri 1,5 M NaCl. Istega leta so poročali o kristalni strukturi Lac15 (Ge in sod., 2011). V metagenomu Južnega kitajskega morja so na podlagi ohranjenih zaporedij odkrili tudi topotno neobstojno halofilno trodomensko lakazo Lac21, ki je bila inaktivirana po 15 min inkubaciji pri 55 °C. Aktivnost se je povečala na okoli 140 % v prisotnosti 80 mM NaCl, 500 mM NaCl pa jo je razpolovil (Fang Z.-M. in sod., 2012).

Odkritje mikrobine lakazne aktivnosti v metagenomu iztrebkov lahko pojasni prebavo lignina v prebavilih velikega pande, ki se prehranjuje z bambusom, a ima prebavila tipična za mesojede. Na podlagi zaporedij so v metagenomu iztrebkov velikega pande našli dva lakazna gena podobna tistim iz rodu *Pseudomonas*. Enega od genov, *lac51*, so heterologno izrazili in okarakterizirali. Lac51 je trodomenska lakaza brez metioninske regije. Pri 38 °C in v pH območju med 7,5 in 8,0 oksidira lakazne substrate oziroma ligninske skupine, zato morda res sodeluje pri razgradnji lignina. V prisotnosti mediatorjev encim spremeni absorpcijski spekter lignina (Fang W. in sod., 2012).

2.2.9 Raznolikost bakterijskih lakaz v okolju in podatkovnih bazah

Kellner in sod. (2008) so z molekularnimi metodami potrdili sume Alexandrejeve in Zhulina, da so lakaze oziroma lakazam podobne oksidaze z več atomi bakra razširjene po celotni domeni bakterij. Z začetnimi oligonukleotidi specifičnimi za encimska mesta za vezavo bakra v bakterijskih lakazah so s pomnoževanjem s PCR in kloniranjem pokazali prisotnost lakaznih genov v različnih bakterijah. V različnih vzorcih prsti je skupno več kot

200 pomnožkov pripadalo petim bakterijskim razredom (Actinomycetales, Bacillales, Pseudomonadales, Rhizobiales, Xanthomonadales). Verjetno s to metodo ni možno pomnožiti lakaznih genov iz vseh rodov (Kellner in sod., 2008). Ausec in sod. (2011) so s podobnim pristopom pokazali prisotnost raznolikih bakterijskih lakaznih genov v šotnih tleh Ljubljanskega barja. Gen so pomnoževali tudi med zapisoma za prvo in četrtto vezavno mesto za baker, ti daljši fragmenti pa so pokazali, da so v šotah prisotni geni za dvo- in trodomenske lakaze (Ausec in sod., 2011a).

Boljšo oceno prave razširjenosti lakaznih genov po domeni bakterij je podala bioinformatska študija (Ausec in sod., 2011b), kjer so potencialne bakterijske lakazne gene s skritimi modeli Markova (HMM) iskali po 2211 mikrobnih genomih in 4 metagenomskih bazah. Našli so 221 domnevnih genov za dvodomenske in 1019 domnevnih genov za trodomenske lakaze – skupaj 1240 domnevnih lakaznih genov v 807 različnih mikroorganizmih. Tri četrtnine naj bi vsebovale signalne peptide. Pri 252 organizmih so identificirali več kot en domnevni lakazni gen, pri sedmih pa celo več kot 5 genov. Največ so jih odkrili pri α -proteobakteriji *Xanthobacter autotrophicus* Py2, ki na kromosому vsebuje 7 genov za dvo- in trodomenske lakaze, 3 geni pa so na plazmidu. Večino domnevnih lakaznih genov je potrebno eksperimentalno dokazati. Študija je za biotehnologijo zanimiva, saj imajo produkti lakaznih genov v raznolikih skupinah bakterij verjetno zelo različne lastnosti. Našli so jih namreč tudi pri alkalotolerantnih bakterijah, avtotrofih, nitrifikatorjih in anaerobih, kot je *Geobacter metallireducens* (Ausec in sod., 2011b).

2.3 LASTNOSTI BAKTERIJSKIH LAKAZ

2.3.1 Struktura bakterijskih lakaz

Glavni vir informacij o strukturi lakaz so bile v preteklosti glivne lakaze, vendar je do zdaj že veliko znanega tudi o bakterijskih lakazah. Prvi ugotovljeni strukturni bakterijskih lakaz pripadata CotA (*B. subtilis*; Enguita in sod., 2003) in CueO (*E. coli*; Roberts in sod., 2002). Tako kot glivne lakaze sta sestavljena iz treh kupredoksinu podobnih domen. Kupredokskinski vzorec zvitja v glavnem sestavlja sendvič dveh štiritračnih β -plošč. N-terminalna kupredokskinska domena 1 je pri CotA in CueO drugačna kot pri glivnih lakazah. Na N-koncu ima vijačno strukturo, ki povezuje domeni 1 in 2. Glavnina domene 2, mostu med domenama 1 in 3, je 12-tračni β -sodček. Domena 3 vsebuje vezavni mestni za enojedrni baker in substrat ter prispeva k nastanku trojedrnega bakrovega centra na stičišču domen 1 in 3 (Sharma in sod., 2007).

Poleg trodomenskih lakaz obstajajo tudi dvodomenske lakaze, ki so jih Nakamura in sod. (2003) predpostavili v hipotezi o evoluciji oksidaz z več atomi bakra iz kupredoksin. Trodomenske lakaze so običajno monomerne, dvodomenske pa same ne morejo tvoriti meddomenskih bakrovih centrov, zato morajo oligomerizirati. To so potrdila poročanja o dvodomenskih lakazah streptomicet in kristalni strukturi lakaz SLAC (Skálová in sod., 2009) in mgLAC (Komori in sod., 2009).

Molekulska masa večine evkarionskih monomerov lakaz sega od 50 do 130 kDa (Morozova in sod., 2007). Okarakterizirane bakterijske lakaze so nekoliko manjše, saj je večina manjših od 80 kDa. Najmanjše so do zdaj lakaza RL5 iz metagenoma govejega vampa (28 kDa) ter njena homologa YfiH (*E. coli*; 30 kDa) in BT4389 (*Bacteroides thetaiotaomicron*; 26 kDa) (Beloqui in sod., 2006), vendar v teh primerih ne gre za lakaze s klasično strukturo s (tremi) kupredokinskimi domenami in enostavno prepoznavnimi vezavnimi mesti za baker v primarni strukturi. Med največjimi je 120 kDa velika lakaza γ -proteobakterije JB (Singh in sod., 2007). Ausec in sod. (2011b) so poročali tudi o skupini večjih domnevnih bakterijskih lakaz, ki so jih odkrili s skritim modelom Markova in naj bi dosegale velikosti do 180 kDa, vendar za zdaj ostajajo še neokarakterizirane.

Pomembna lastnost evkarionskih lakaz je glikoziliranost. Kovalentno vezani ogljikovi hidrati običajno predstavljajo do 20 % molekulske mase lakaze pri glivah in do 45 % pri rastlinah. Glikozilacija naj bi bila pomembna za stabilnost strukture in odpornost na proteolizo in proste radikale (Morozova in sod., 2007). Pri bakterijskih lakazah ne poročajo o glikoziliranosti razen pri redkih izjemah, kot je lakaza *Streptomyces psammoticus*, kjer sladkorji predstavljajo 10 % njene mase (Niladevi in sod., 2008).

2.3.2 Struktura aktivnega mesta

Kljub njihovi raznolikosti vsebujejo lakaze visoko ohranjena mesta za vezavo bakra. Za aktivnost potrebujejo vsaj štiri bakrove atome (Claus, 2003), ki se razlikujejo po spektralnih lastnostih in elektronski paramagnetni resonanci. Tako bakrove atome prisotne v lakazah razdelimo v tri tipe:

- tip T1 – “modri” baker
- tip T2 – “navadni” baker
- tip T3 – dvojedrni bakrov center (prek hidroksidnega mostu antiferomagnetno sparjena bakrova iona) (Morozova in sod., 2007)

Na mestu T1 je baker koordiniran z dvema histidinoma in enim cisteinom. Odstranitev

mesta T2 z enim bakrovim atomom bistveno zmanjša aktivnost encima. Mesto T3 je dvojedrni bakrov center, kjer sta bakrova iona antiferomagnethno sparjena prek hidroksidnega mostu. Gručo T2/T3 koordinira 8 histidinov (Morozova in sod., 2007). Obstajajo tudi drugačna aktivna mesta. Aktivno mesto ene od lakaz bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) vsebuje bakrov ion, železov ion in dva cinkova iona. Takim encimom pravijo "lakazam podobni encimi". Za njih ni potrjeno, da je končni produkt redukcije kisika voda (Morozova in sod., 2007).

2.3.3 Kataliza reakcije

Za katalitično aktivnost lakaz so koordinirani bakrovi atomi bistveni. Lakaza odvzame en elektron substratu in ga tako pretvorji v prosti radikal. Z oksidacijo substrata se reducira baker T1, pridobljeni elektroni pa se lahko prenesejo v trojedrno gručo T2/T3. Po prejemu štirih elektronov lahko lakaza na mestu T2/T3 reducira molekularni kisik do vode (Dwivedi in sod., 2011).

2.3.4 Substrati

Specifičnost lakaz za prejemnika elektronov (kisik) je visoka, razpon donorjev elektronov pa je zelo velik. Ker ta variira od ene do druge lakaze, je težko točno definirati lakazno aktivnost. Ker se precej prekriva z razponom substratov tirozinaze, je eden od kriterijev za definicijo lakaze, da ne oksidira tirozina (Alcalde, 2007). Tirozinazo in lakazo tradicionalno ločujejo po specifičnih substratih in inhibitorjih. Najpomembnejša razlika med encimoma je ta, da samo tirozinaza kaže krebolazno aktivnost in sposobnost oksidacije tirozina in samo lakaza lahko oksidira nekatere večje aromatske kromofore, kot je siringaldazin (Solano in sod., 1997).

Poleg mono- in polifenolov lahko lakaze oksidirajo različne aromatske spojine, kot so substituirani fenoli, diamini, aromatski amini in tioli, in celo nekatere anorganske spojine, kot so jod, $\text{Mo}(\text{CN})_8^{4-}$ in $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Orto-substituirane spojine so najboljši substrati za večino lakaz. Siringaldazin (4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid azin) in ABTS (2,2-azinobis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)) naj bi bila v odsotnosti peroksida za lakaze specifična substrata (Dwivedi in sod., 2011).

Zaradi velikosti ali previsokega redoks potenciala lakaza pogosto ne more direktno oksidirati želenih substratov. To omejitev preseže uporaba mediatorjev – lakaznih substratov, ki v oksidirani obliki lahko reagirajo z večimi substrati ali substrati z visokim redoks potencialom. Leta 1990 so uporabili ABTS kot prvi umetni mediator za

delignifikacijo pulpe. Od takrat so testirali več kot 100 spojin (Riva, 2006). Kljub učinkovitosti večjo rabo sistemov lakaz in mediatorjev (ang. *laccase-mediator system* oziroma LMS) na industrijski ravni otežujeta visoka cena in možna strupenost umetnih mediatorjev. Naravne mediatorje, kot so fenoli ligninskega izvora (npr. siringaldehid in acetosiringon), je po drugi strani možno z nizkimi stroški v veliki količini pridobiti iz črne lužnice (ang. *black liquor*) po pulpanju evkalipta po postopku kraft (Cañas in Camarero, 2010). Da siringaldehid in acetosiringon lahko delujejo kot mediatorja tudi z bakterijskimi lakazami, so med drugimi pokazali Reiss in sod. (2011) z lakazo *Bacillus pumilus*.

2.3.5 pH optimum in toleranca

Afiniteta lakaze do substrata je odvisna od pH. Za substrate, katerih oksidacija ne vključuje izmenjave protonov, lakazna aktivnost pogosto pada z naraščanjem pH. pH optimum za oksidacijo substratov, katerih oksidacija vključuje izmenjavo protonov, je pogosto bolj odvisen od vira lakaze kot od substrata (Dwivedi in sod., 2011). Glivne lakaze imajo običajno pH optimume in najvišjo stabilnost v kislem območju. Njihovi pH optimumi za oksidacijo ABTS so večinoma manjši od 4, fenolne spojine (npr. 2,6-DMP, gvajakol in siringaldazin) pa oksidirajo pri pH med 4,0 in 7,0 (Baldrian, 2006). Nižji pH optimum pri glivah je morda prilagoditev na dobro rast gliv v kislih pogojih, pH optimum intracelularnih rastlinskih lakaz pa je bližji fiziološkim pogojem (Dwivedi in sod., 2011). Iz podatkov, ki smo jih za okarakterizirane bakterijske lakaze našli v literaturi, smo izračunali, da je mediana pH optimumov za oksidacijo ABTS 4,0, za oksidacijo siringaldazina 7,0 in oksidacijo 2,6-DMP 7,4. pH optimum za oksidacijo 2,6-DMP je pri nekaterih bakterijskih lakazah 9,0 ali več, npr. pri lakazi SLAC (*Streptomyces coelicolor*), kjer poročajo o vrednosti 9,4 (Machczynski in sod., 2004). Lac591 ima alkalne pH optimume za vse testirane substrate vključno z ABTS, v alkalnem pa je tudi stabilna, saj po inkubaciji med 7,0 in 10,0 ohrani več kot 80 % aktivnosti (Ye in sod., 2010).

2.3.6 Temperaturni optimum

Temperaturni optimumi lakaz se večinoma gibljejo med 50 in 70 °C. Njihova termostabilnost je močno odvisna od temperaturnega območja rasti izvornega organizma. Glivne lakaze imajo ponavadi nižjo termostabilnost kot bakterijske (Dwivedi, 2011). Izračun iz podatkov karakterizacije lakaz v literaturi pove, da je pri polovici okarakteriziranih bakterijskih lakaz, ki so jim merili temperaturni optimum, ta višji od 55 °C. Do zdaj ima najvišji temperaturni optimum (92 °C) lakaza hipertermofila *Thermus thermophilus* (Miyazaki, 2005).

2.3.7 Inhibitorji

Med inhibitorji lakaz so majhni anioni, kot so halidi (razen jodida), azid, cianid in hidroksid, ki naj bi z vezavo na baker T2 in T3 onemogočili notranji prenos elektronov. Drugi inhibitorji so kovinski ioni (npr. Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} in Zn^{2+}), maščobne kisline, sulfhidrilni reagenti, hidroksiglicin, koji kislina, EDTA, L-cistein, DTT, glutation, tiourea in kationski kvartarni amonijevi detergenti. Te spojine kelirajo baker, modificirajo aminokislinske ostanke ali povzročijo konformacijske spremembe (Dwivedi in sod., 2011).

Med bakterijskimi lakazami najdemo primere halotolerantnih in celo halofilnih lakaz. V nasprotju z večino glivnih lakaz, ki izgubijo aktivnost pri koncentracijah NaCl nad 100 mM, sta lakazi Lbh1 (*B. halodurans*) (Ruijssemaars in Hartmans., 2004) in Lac15 (Fang in sod., 2011) optimalno aktivni pri koncentracijah nad 100 mM NaCl do 450 mM oziroma 700 mM NaCl. Lakaza iz bakterije *Marinomonas mediterranea* pri pH 7 ohrani več kot 70 % aktivnost do koncentracije 1 M NaCl (Jimenez-Juarez in sod., 2005). Lakaza SilA pri 1 M NaCl pri pH 8 ohrani celotno aktivnost in je relativno odporna tudi na natrijev azid (Molina-Guijarro in sod., 2009). Lakaza *Streptomyces psammoticus* je optimalno aktivna pri 0,8 M NaCl in je stabilna do 1,2 M NaCl (Niladevi in sod., 2008)

2.3.8 Funkcije lakaz

Funkcija glivnih lakaz naj bi bila v glavnem depolimerizacija komponent rastlinske celične stene. Vpletene naj bi bile tudi v pigmentacijo, nastajanje plodilnih teles, morfogenezo, detoksifikacijo, sporulacijo in patogenezo. Rastlinski patogeni naj bi se z lakazami branili pred obrambnimi spojinami rastlin. Pri oportunističnem človeškem patogenu *Cryptococcus neoformans* je lakaza virulenčni faktor, saj naj bi gostiteljeve kateholamine pretvarjala v zaščitni melanin. Rastlinske lakaze sodelujejo pri polimerizaciji lignina, celjenju ran in oksidaciji železa (Dwivedi in sod., 2011).

Bakterijske lakaze so sprva v glavnem povezovali s pigmentacijo in oksidacijo kovin. Lakaza CotA s pigmentacijo pri *B. subtilis* poveča odpornost endospor na UV žarke in vodikov peroksid (Hullo in sod., 2001). Lakaza CueO bakterije *E. coli* je z oksidacijo Cu(I) in kateholatnih sideroforov odgovorna za odpornost na baker. Kateholatni siderofori namreč lahko reducirajo Cu(II) v strupeni Cu(I) (Grass in sod., 2004). Homologi CueO imajo vlogo v metabolizmu in homeostazi bakra in železa pri patogenih *Campylobacter jejuni* (Hall in sod., 2008), *Salmonella typhimurium* serovar Typhimurium (Achard in sod., 2010) in *Legionella pneumophila* (Huston in sod., 2008). Lakaza EpoA pri *Streptomyces*

griseus sodeluje pri morfogenezi zračnega micelija (Endo in sod., 2002). Lakazno aktivnost so opazili tudi pri bakterijah, ki interagirajo z rastlinami, npr. pri rastlinskem patogenu *Ralstonia solanacearum* (Hernández-Romero in sod., 2005). Lakaz ne proizvajajo samo patogeni, saj tudi simbiotska bakterija *Sinorhizobium meliloti* proizvaja več polifenol oksidaz, prvo bakterijsko lakazo pa so našli v bakteriji rodu *Azospirillum*, katerega predstavniki tudi lahko pozitivno vplivajo na rastline (Rosconi in sod., 2005).

2.4 UPORABNOST LAKAZ

Prednost lakaze pred kemikalijami ali drugimi encimi je s stališča uporabnosti v široki specifičnosti za substrate. Probleme visoke cene proizvodnje, izolacije encima, slabega recikliranja in nestabilnosti lahko reši imobilizacija encima. V industriji se zaenkrat givne lakaze uporabljo bolj kot bakterijske in rastlinske (Dwivedi in sod., 2011).

2.4.1 Papirna industrija - delignifikacija in beljenje pulpe

Bourbonnais in Paice sta sicer že leta 1990 pokazala, da lahko lakaze preko mediatorja oksidirajo nearomatske komponente lignina in tako sodelujejo pri njegovi razgradnji (Bourbonnais in Paice, 1990). Biobeljenje je alternativa kemijskemu procesiranju lesne pulpe, ki lahko pripomore k nastanku milejših in bolj čistih strategij delignifikacije in hkrati ne vpliva na celulozo (Dwivedi in sod., 2011). Zaporedno delovanje ksilanaz in sistema lakaza-mediator vodi do znatnega povečanja svetlosti pulpe in zmanjša uporabo kemikalij. Uporabnost bakterijskih lakaz v takih postopkih so med drugim pokazali Virk in sod. (2012) z alkalifilno lakazo bakterije rodu *Rheinheimera* (γ -proteobakterija JB).

2.4.2 Tekstilna industrija

Tekstilna industrija je velik porabnik barvil, ki so pogosto odporna na bledenje ali razgradnjo. Nekatera so zdravju škodljive aromatske spojine. Lakaze lahko pripomorejo k razgradnji barvil z različnimi kemijskimi strukturami (Couto in Herrera, 2006), nabor pa še razširi uporaba mediatorjev. Lakaza SilA sama ne more razbarvati azo barvila Orange II, v prisotnosti acetosiringona pa pride do popolnega razbarvanja in razstrupljenja barvila, ki sicer ne sovpada vedno z razbarvanjem (Molina-Guijarro in sod., 2009). Lakaze se lahko uporablja za izboljšanje beline bombaža, doseganje učinka ponošenega ali izpranega tekstila (ang. *biostoning*), posvetlitev z indigom obarvane tkanine in povečanje odpornosti volne na krčenje (Dwivedi in sod., 2011).

2.4.3 Živilska industrija

V vinu, sadnih sokovih in pivu prisotne polifenolne snovi lahko med skladiščenjem povzročijo neželeno spremembo barve, motnost, megle ali spremembe okusa. Lakaze jih lahko stabilizirajo, izboljšajo okus rastlinskih olj in čajnega proizvoda ter ojačajo glutenske strukture v testu ali pečenih proizvodih (Dwivedi in sod., 2011). Koristne so tudi v bioremediaciji odplak živilske industrije (npr. proizvodnja oljčnega olja) z večjo vsebnostjo za okolje škodljivih polifenolov (Minussi in sod., 2002).

2.4.4 Bioremediacija tal

Fenolne spojine so prisotne v odplakah različnih industrijskih procesov, npr. procesiranje premoga, rafiniranje nafte in proizvodnja organskih spojin. Lakaze jih lahko oksidativno spojijo v netopne kompleksne strukture. Poročali so o oksidaciji alkenov, karbazola, N-etilkarbazola, fluorena in dibenzotiofena v prisotnosti glivne lakaze in mediatorja. Delujejo lahko tudi na stupene, karcinogene, in mutagene policiklične aromatske ogljikovodike (PAH), ki se v okolju težje razgradijo in imajo težnjo po bioakumulaciji (Dwivedi in sod., 2011). Sodelujejo lahko pri vezavi metabolitov trinitrotoluena na snovi prisotne v prsti, npr. ferulično kislino in katehol (Nyanhongo in sod., 2006), in razgradnji 2,4-DCP (2,4-diklorofenol), derivata herbicida 2,4-D (2,4-diklorofenoksiocetna kislina) (Duran in Esposito, 2000).

2.4.5 Sinteza organskih spojin

Dwivedi in sod. (2011) v svojem pregledu povzemajo tudi uporabo lakaz v sintezi organskih spojin. S polimerizacijo naravnih fenolnih spojin lahko nastanejo različni pigmenti in barve za lase. Patentirana je uporaba lakaz v deodorantih, zobnih pastah, ustnih vodicah in detergentih. Lakaze so lahko uporabne pri sintezi tekstilnih barvil, arom, pesticidov in heterocikličnih spojin. Izražanje lakaze glive *Trametes versicolor* v *Saccharomyces cerevisiae* omogoči proizvodnjo etanola iz koniferil alkohola, kar lahko bistveno izboljša proizvodnjo etanola za goriva iz lignocelulozne biomase. Lakaze so lahko pomembno orodje v kombinatorni biokemiji (Dwivedi in sod., 2011).

2.4.6 Biosenzorji

Lakaze so lahko biološke zaznavne enote v biosenzorjih za različne aplikacije - ocenjevanje količine kateholov v čaju (Ghindilis in sod., 1992), okoljski monitoring odpadnih voda papirne industrije (Freire in sod., 2002), merjenje koncentracije

kateholaminov za kontrolo kakovosti v farmaciji (Leite in sod., 2003), diagnostika – z lakaznim biosenzorjem je možno meriti količino kateholaminov v urinu in plazmi (Silva in sod., 2009). Lakazni biosenzorji lahko merijo tudi koncentracijo kisika v vzorcu (Gardiol in sod., 1996) ali koncentracijo zdravju škodljivih lakaznih inhibitorjev. Tako so razvili biosenzor za natrijev azid (Trudeau in sod., 1997) in fluorid ter cianid (Mousty in sod., 2007).

2.4.7 Druge uporabe lakaz

Lakaze so uporabne pri sintezi kompleksnih farmacevtskih učinkovin in heteromolekulskih dimerov antibiotikov ter zdravil proti raku. Poročajo tudi o močni inhibitorni aktivnosti lakaz proti reverzni transkriptazi virusa HIV-1. Oksidacijo jodida z lakazami se lahko izkoristi za sterilizacijo pitne vode in bazenov ter dezinfekcijo manjših ran (Dwivedi in sod., 2011). Lakaze so lahko uporabne pri kovalentnem povezovanju polisaharidov, pri imunokemijskih testih kot markerski encimi v konjugatih s protitelesi ali antigeni (Dwivedi in sod., 2011) in pri funkcionalizaciji lignoceluloznih materialov za kovalentno vezavo funkcionalnih molekul, npr. protiglivne spojine in barvila (Kudanga in sod., 2009).

2.5 IZVORNI ORGANIZEM (*Geobacter metallireducens* GS-15)

Geobacter metallireducens GS-15 je bil kot izvorni organizem domnevнega lakaznega gena Gmet_2154 izbran na podlagi rezultatov bioinformatske študije, ki so jo izvedli Ausec in sod. (2011b). O lakazni aktivnosti pri tem organizmu še niso poročali, izolirana in okarakterizirana pa še ni bila nobena lakaza δ -proteobakterije. Poleg tega je *G. metallireducens* GS-15 anaerobni mikroorganizem, lakaze pa kot prejemnik elektronov uporablja kisik. Edina lakaza iz potencialno striktno anaerobnega mikroorganizma je lakaza RL5 iz metagenoma vampa, ki naj bi izhajala iz organizma rodu *Bacteroides* (Beloqui in sod., 2006), vendar gre v tem primeru za netipično lakazo, ki nima običajne zgradbe iz kupredoksinskih domen in tipičnih aminokislinkih ostankov za vezavo bakra v aktivni center encima.

O izolaciji *Geobacter metallireducens* iz anaerobne obogatitvene kulture sedimentov reke Potomac so poročali leta 1988. Izolirali so ga z acetatom in kvasnim ekstraktom kot donorjem elektronov ter železovim (III) oksidom in ogljikovim dioksidom kot prejemnikoma elektronov. Redukcija Fe(III) je ena najbolj signifikantnih kemijskih sprememb med razvojem anaerobnih prsti in sedimentov. *G. metallireducens* je striktno anaerobna gramnegativna δ -proteobakterija, ki oksidira nekatere kratke maščobne kisline, alkohole in monoaromatske spojine ob redukciji Fe(III), pa tudi Mn(IV), U(VI), nitrata

(Lovley in sod., 1993), V(V) (Ortiz-Bernad in sod., 2004) in Pu(IV) (Boukhalfa in sod., 2007). Donor elektronov je lahko ob redukciji nitrata grafitna elektroda (Gregory in sod., 2004).

Pri redukciji netopnega železovega Fe(III) oksida lahko humične spojine prejemajo in prenašajo elektrone ter omogočajo rast. Dodatek analoga humičnih spojin antrakinon-2,6-disulfonata močno stimulira rast *G. metallireducens* s Fe(III). Pri tem v glavnem sodelujejo kinonske skupine (Lovley in sod., 1998). Celice same ne proizvajajo prenašalcev elektronov, ampak netopni Fe(III) oksid direktno reducirajo (Nevin in Lovley, 2000). Netopne delce Fe(III) in Mn(IV) oksidov najdejo kemotaktično, pri čemer uporabljajo bičke in pile (Childers in sod., 2002). Mobilni *G. metallireducens* netopno železo reducira 17-krat hitreje od nemobilnega sorodnika *G. sulfurreducens*. Za redukcijo netopnih Fe(III) oksidov so ključni lateralni pili tipa IV (Tremblay in sod., 2012).

Benzoat, benzaldehid, benzil alkohol, *p*-hidroksibenzoat, *p*-hidroksibenzaldehid, *p*-hidroksibenzil alkohol, fenol, *p*-krezol in toluen lahko omogočajo rast *G. metallireducens* (Lovley in sod., 1993). Metabolizem aromatskih spojin je eden od bolje preučenih aspektov *G. metallireducens*. Aerobni mikroorganizmi aromatski obroč dearomatizirajo in odprejo z oksigenazami, fakultativni anaerobi pa z od ATP odvisno reduktazo dearomatizirajo aktiviran ključni intermedijat benzoil-CoA. Pri *G. metallireducens* podobno kot pri fakultativnih anaerobih reduktivni dearomatizaciji benzoil-CoA sledijo reakcije β-oksidacije do enot acetil-CoA (Wischgoll in sod., 2005), vendar reduktivno dearomatizacijo izvaja volfram vsebujoči proteinski kompleks BamBC (Kung in sod., 2009).

Genomska analiza je pokazala obstoj 300 kb genomskega otoka (Butler in sod., 2007), ki ima zelo malo ortologov v *G. sulfurreducens* in vsebuje gene za katabolizem fenola, *p*-krezola, benzil alkohola in toluena, ki poteka prek ključnega intermedijata benzoil-CoA. Mnogi geni z otoka so najbolj podobni genom za razgradnjo aromatskih spojin pri nitratnih reducentih *Thauera aromatic*a in *Azoarcus* sp. EbN1. Geni na otoku so vrstno specifični in se nahajajo v večjih diskretnih enotah obdanih z geni z netipično nukleotidno zgradbo, geni za tRNA in fagnim-podobnimi integrizami. Območje kaže znake potencialne genetske mobilnosti, a se je v primeru horizontalnega prenosa iz oddaljenih sorodnikov medtem že zgodila amelioracija genov (Butler in sod., 2007).

G. metallireducens lahko razbarva azo barvila. Kromatografska analiza kaže, da verjetno razbarvanje poteka po reduktivni poti. Dodatek nizkih koncentracij humične kisline ali 2-hidroksi-1,4-naftokinona izboljša razbarvanje (Liu in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Za molekularno kloniranje smo uporabljali seva *E. coli* DH5 α in komercialne kompetentne celice *E. coli* JM109 (Promega). Za proizvodnjo proteinov smo uporabljali *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Sev ima znižano proteolitično aktivnost in je lizogen za profag lambda, ki vsebuje z IPTG inducibilen gen za T7 RNA polimerazo. Plazmid pLysE vsebuje gen za odpornost na kloramfenikol in gen za T7 lizocim, naravni inhibitor T7 RNA polimeraze za izboljšan nadzor nad transkripcijo (Sigma-Aldrich, 2013).

3.1.2 DNA

V Preglednici 1 so naštete dvostranske molekule DNA (matrična DNA in plazmidi), ki smo jih uporabili pri sestavljanju ekspresijskih plazmidov. Nukleotidno zaporedje uporabljeni genomske DNA, ki nam jo je priskrbel laboratorij dr. Dereka R. Lovleya z Univerze v Massachusettsu, lahko na spletnih bazah najdimo pod akcesijsko številko NC_007517.1. V Preglednici 2 so našteti uporabljeni začetni oligonukleotidi s pripadajočimi nukleotidnimi zaporedji v smeri 5' proti 3'.

Preglednica 1: Seznam dsDNA molekul uporabljenih pri laboratorijskem delu in njihov namen.

Molekula	Opis
gDNA <i>Geobacter metallireducens</i> GS-15 (NC_007517.1)	Matrica za pomnoževanje domnevnega lakaznega gena Gmet_2154
pGEM-T Easy	Plazmid za kloniranje pomnožkov PCR (Promega)
pHisTag	Plazmid za heterologno proizvodnjo proteinov z N-terminalnim histidinskim označevalcem
pET-21c(+)	Plazmid za heterologno proizvodnjo proteinov s C-terminalnim histidinskim označevalcem (Novagen)

Preglednica 2: Seznam začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje domnevnega lakaznega gena Gmet_2154.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje
Geo1F	5' TTTCTCGAGCAAAAAAGAGGAATGAACCGCAG 3'
Geo1R	5' AAAACGCGTTACATCATGCCGATGTCCC 3'
GeopET-F	5' ATACATATGAAAAAAAGAGGAATGAACCGCAG 3'
GeopET-R	5' TTTCTCGAGCATCATGCCGATGTCCC 3'
GeoF2-noSP	5' TCACTCGAGCACTCTGCATGCCGGCGTGG 3'
T7 promotor	5' TAATACGACTCACTATAAGGG 3'
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3'

3.1.3 Encimi

Preglednica 3: Seznam encimov uporabljenih za različne namene med laboratorijskim delom

Namen	Proizvajalec	Encim
PCR	Promega	DNA polimeraza GoTaq
	Kapa Biosystems	DNA polimeraza KAPA2G Fast
restrikcija	Fermentas	XhoI, MluI, FastDigest NdeI, FastDigest XbaI
ligacija	Promega	T4 DNA ligaza
liza bakterijske biomase	Sigma-Aldrich	lizocim
	Fermentas	DNaza, RNaza

3.1.4 Protitelesa

Preglednica 4: Protitelesa uporabljena za detekcijo heterologno izražene lakaze na membrani po prenosu western.

Protitelesa	Opis
primarna protitelesa	QIAexpress Anti-His Antibodies (mouse monoclonal IgG1) (QIAGEN)
sekundarna protitelesa	goat anti-mouse IgG-HRP: sc2005 (Santa Cruz Biotechnology, inc.)

3.1.5 Kemikalije

Preglednica 5: Seznam uporabljenih kemikalij po namenu uporabe in proizvajalcu.

Namen	Proizvajalec	Kemikalija
gojenje biomase	Sigma-Aldrich	LB, LB agar, ampicilin, kloramfenikol, IPTG
	Zorka Šabac	CuSO ₄ x 5H ₂ O
	Fermentas	X-gal
PCR	Fermentas	dNTP
	KAPA Biosystems	5x 2G Kappa buffer A
	Promega	MgCl ₂ , 5x pufer (Colorless GoTaq Flexi)
	Sigma-Aldrich	BSA, voda brez nukleaz
restrikcija	Fermentas	10x pufer Tango, 10x pufer R, 10x FastDigest Green Buffer
ligacija	Promega	10x pufer za T4 DNA ligazo, 2x pufer za hitro ligacijo
agarozna elektroforeza	Fermentas	6x nanašalno barvilo za DNA
	Sigma-Aldrich	agaroza, 50x TAE
	Thermo Scientific	Iestvica za DNA (GeneRuler DNA Ladder Mix)
	(neznan)	etidijev bromid
izolacija encima	Sigma-Aldrich	imidazol
	Merck	NaCl
	kemika	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O
	QIAGEN	Ni-NTA agaroza
	Roche	proteazni inhibitorji (cOmplete EDTA free)
SDS-PAGE in prenos western	Fermentas	5x nanašalni pufer za proteinske vzorce, barvilo Page Blue Protein stain
	Fluka	SDS, glicin
	Merck	NaCl
	Promega	EDTA
	Sigma-Aldrich	akrilamid/bisakrilamid (40 % raztopina), Tris-HCl, metanol, 4-Cl-1-naftol
	Thermo Scientific	PageRuler Prestained Protein Ladder (10 – 200 kDa)
encimski testi	kemika	K ₂ SO ₄ , NaF, KBr
	Merck	citronska kislina x H ₂ O, FeSO ₄ , NaCl, L-tirozin
	Sigma-Aldrich	2,6-DMP, ABTS, CaCl ₂ , ferulična kislina, gvajakol, katehol, KCl, K ₄ [Fe(CN) ₆] x 3H ₂ O, MgCl ₂ x 6H ₂ O, pirogalol, siringaldazin, siringaldehid, siringična kislina, Tris, vanilinska kislina
	Zorka Šabac	Na ₂ SO ₄ x 10H ₂ O

3.1.6 Raztopine in pufri

Preglednica 6: Elektroforezni pufer za SDS-PAGE

Sestavina	Koncentracija
Tris	25 mM
Glicin	192 mM
SDS	0,1 %

* pH že uravnан na 8,3

Preglednica 7: Pufer za prenos western

Sestavina	Koncentracija
Tris	25 mM
Glicin	192 mM
SDS	0,1 %
Metanol	20 %

* pH že uravnан на 8,3

Preglednica 8: Pufer za spiranje membrane po prenosu western

Sestavina	Koncentracija
NaCl	50 mM
EDTA	1 mM
Tris-HCl	10 mM

* pH 7,4

Preglednica 9: Pufer za razvijanje

Sestavina	Koncentracija
NaCl	14 mM
Tris-HCl	25 mM
Na ₂ HPO ₄	0,7 mM

Preglednica 10: Pufri za lizo celic, vezavo na kolono in izolacijo encima

Sestavine	Pufer za lizo/vezavo	W20	W50	W100	W250
NaH ₂ PO ₄ [mM]	50	50	50	50	50
NaCl [mM]	300	300	300	300	300
imidazol [mM]	0	20	50	100	250
pH	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0

Preglednica 11: Citrat-fosfatni pufri iz 0,2 M Na_2HPO_4 in 0,1 M citronske kisline s končnim volumnom 20 ml (prilagojeno po McIlvaine, 1921). Volumni komponenti za sestavo pufrov z lihimi pH vrednostmi so bili ocenjeni z linearno interpolacijo. pH pufrov smo natančneje umerili z dodajanjem posameznih komponent ob merjenju s pH elektrodo.

pH	0,2 M Na_2HPO_4 [ml]	0,1 M citronska kislina [ml]
2,5	1,71	18,29
3,0	4,11	15,89
3,5	6,07	13,93
4,0	7,71	12,29
4,5	9,09	10,91
5,0	10,30	9,70
5,5	11,38	8,63
6,0	12,63	7,37
6,5	14,20	5,80
7,0	16,47	3,53
7,5	18,45	1,55
8,0	19,45	0,55

3.1.7 Oprema

Preglednica 12: Seznam uporabljene opreme po namenu in proizvajalcih.

Namen	Proizvajalec	Oprema
gojenje celic	Golias	petrijevke
	Brand, Schott	erlenmajerice
pipetiranje	Eppendorf, Brand	pipete
izolacija encima	BioRad	plastična kolona za Ni-NTA agarozo
koncentriranje encima, menjava pufra	Millipore	Amicon Ultra (10K in 30K)
SDS-PAGE	BioRad	oprema za delanje akrilamidnih gelov
prenos western	Millipore	PVDF membrana (Immobilon-P Transfer Membrane)
encimski testi	Brand	mikrotitrskie plošče s 96 jamicami

3.1.8 Laboratorijske naprave

Preglednica 13: Seznam laboratorijskih naprav po proizvajalcu.

Proizvajalec	Naprave
Biometra	ciklični termostat
BioRad	komora za agarozno elektroforezo, komora za SDS-PAGE (Mini PROTEAN Tetra System), komora za prenos western (Mini Transblot)
Eppendorf	namizna centrifuga (Centrifuge 5424)
ESCO	laminarij (Laminar Flow cabinet), laminarij za PCR (PCR cabinet)
IKA	vrtinčniki MS 3 digital
Julabo	vodna kopel
Kambič Laboratorijska oprema	avtoklav
Metrel	fotometer MA 9510
MSE	ultrazvočni dezintegrator
Sigma Laboratory Centrifuges	centrifuga 3K30
Thermo Electron Corporation	spektrofotometer za mikrotitrski plošče (Multiskan Spectrum)
ThermoScientific	NanoDrop 1000
WTW	pH elektroda

3.2 METODE

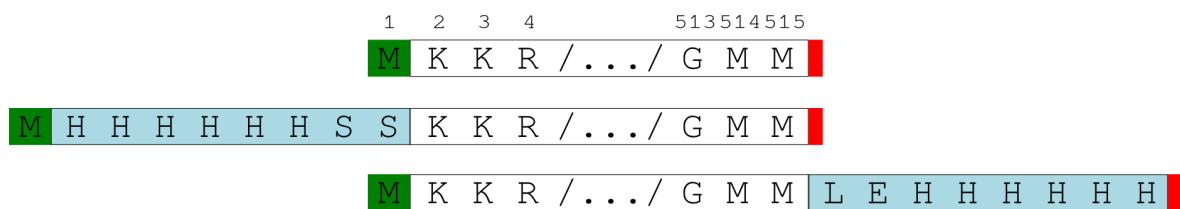
3.2.1 Molekularno kloniranje

Izrazili smo tri različice domnevnega lakaznega gena Gmet_2154 bakterije *Geobacter metallireducens* GS-15 (Slika 1), zato smo ga iz njenega genoma pomnožili s tremi pari začetnih oligonukleotidov in pomnožke vstavili v dva različna ekspresijska plazmida. Proteinski produkt divjega tipa gena Gmet_2154 smo poimenovali GeoLacc.

Gen brez start kodona pomnožen z začetnima oligonukleotidoma Geo1F in Geo1R, ki sta vsebovala restrikcijski mesti za *Xba*I in *Mlu*I, smo vstavili v ekspresijski plazmid pHisTag, ki je bil odprt z omenjenima restrikcijskima encimoma in je za start kodonom vseboval zapis za N-terminalni heksahistidinski označevalec. Konstrukt in njegov produkt smo poimenovali GeoLacc-NHis.

Z vstavitvijo gena pomnoženega z začetnima oligonukleotidoma GeoF2-noSP in Geo1R v plazmid pHisTag smo podobno kot GeoLacc-NHis pripravili konstrukt GeoLacc-noSP. Produkt ne vsebuje prvih 24 aminokislin divjega tipa encima.

Gen brez start in stop kodonov pomnožen z začetnima oligonukleotidoma GeopET-F in GeopET-R, ki sta vsebovala restriktijski mesti za *NdeI* in *XbaI*, smo vstavili v ekspresijski plazmid pEt-21c(+), ki je bil odprt z istima restriktijskima encimoma in je pred stop kodonom vseboval zapis za C-terminalni heksahistidinski označevalcev. Konstrukt in njegov produkt smo poimenovali GeoLacc-CHis.



Slika 1: Shematski prikaz aminokislinskega zaporedja domnevne lakaze GeoLacc in treh heterologno izraženih različic. GeoLacc je proteinski produkt divjega tipa domnevnega lakaznega gena Gmet_2154 bakterije *Geobacter metallireducens*. Od zgoraj navzdol: GeoLacc, GeoLacc-NHis (GeoLacc z N-terminalnim histidinskim označevalcem), GeoLacc-CHis (GeoLacc s C-terminalnim histidinskim označevalcem) in GeoLacc-noSP (GeoLacc brez domnevnega signalnega peptida z N-terminalnim histidinskim označevalcem)

3.2.1.1 Priprava gojišč

Za gojenje gostiteljskih sevov *E. coli* za molekularno kloniranje smo uporabljali trdna (agarska) in tekoča gojišča na osnovi LB, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca (Sigma-Aldrich). Sestavine smo v erlenmajericah raztopili v ustrezeni količini demineralizirane vode in gojišča sterilizirali z avtoklaviranjem. Po avtoklaviraju smo erlenmajerice postavili v vodno kopel s temperaturo 60 °C, da se gojišča ustreznno ohladijo pred morebitnim dodajanjem antibiotikov.

Za gojenje *E. coli* DH5α smo uporabljali gojišča brez antibiotikov, za gojenje *E. coli* BL21(DE3)pLysE pa gojišča s kloramfenikolom (20 µg/ml). Ker so vsi uporabljeni plazmidi nosili gen za odpornost na ampicilin, smo v gojišča za vse transformante dodali še ampicilin (100 µg/ml). Za modro-belo selekcijo transformant s plazmidom pGEM-T Easy s pomnožki PCR smo uporabili trdna gojišča, po katerih smo razmazali 20 µl X-gal (50 mg/ml) in 100 µl 100 mM IPTG.

3.2.1.2 Razapljanje začetnih oligonukleotidov

Liofilizirane začetne oligonukleotide smo najprej 5 min centrifugirali pri najvišji hitrosti namizne centrifuge in v laminariju za pripravo PCR mešanic dodali sterilno vodo brez nukleaz do koncentracije 100 µM. Po nekajminutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo centrifugirke z raztopino premešali na vrtinčniku in na kratko centrifugirali. Pri verižni reakciji s polimerazo smo uporabljali 10 µM alikvot pripravljen z redčenjem s sterilno vodo brez nukleaz v laminariju za pripravo PCR mešanic. Raztopine začetnih oligonukleotidov smo shranjevali pri -20 °C.

3.2.1.3 Pomnoževanje genskih različic s PCR (verižna reakcija s polimerazo)

Z verižno reakcijo s polimerazo oziroma PCR (ang. *polymerase chain reaction*) smo pomnoževali variante domnevnega lakaznega gena in preverjali njihovo vstavitev v plazmid. Reakcijske mešanice smo pripravljali in razparcelirali v laminariju za PCR, matrično DNA pa smo naknadno dodajali aseptično ob gorilniku. Sestava reakcijskih mešanic in programi za posamezne reakcije so navedeni v Preglednicah od 14 do 18. Negativnim kontrolam smo namesto matrice dodali ustrezno količino sterilne vode.

Preglednica 14: Sestava reakcijske mešanice za eno reakcijo pomnoževanja gena GeoLacc-NHis. V zadnjem stolpcu je podan volumen reagentov za 1 reakcijo.

Sestavina	Začetna konc.	Končna konc.	V za 1 reakcijo
sterilna voda brez nukleaz			13,3 µl
pufer (Colorless GoTaq Flexi)	5x	0,94x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,89 mM	2 µl
BSA	10 mg/ml	0,38 mg/ml	1 µl
dNTP	10 mM	0,38 mM	0,5 µl
Geo1F	10 µM	0,38 µM	1 µl
Geo1R	10 µM	0,38 µM	1 µl
Polimeraza Taq	5U/µl	0,038 U/µl	0,2 µl
matrica (genomska DNA)			2,5 µl
		Skupno	26,5 µl

Vstavitev gena GeoLacc-NHis v pHisTag in prisotnost želenega plazmida v produkcijskem sevu smo preverili z enako reakcijsko mešanico kot v Preglednici 14, le da smo namesto genomske DNA kot matrico v reakcijsko mešanico dodali odtis kolonije z zobotrebca – PCR na osnovi kolonije.

Preglednica 15: Sestava reakcijske mešanice za eno reakcijo pomnoževanja gena GeoLacc-noSP ali GeoLacc-CHis. V zadnjem stolpcu je podan volumen reagentov za 1 reakcijo.

Sestavina	Začetna konc.	Končna konc.	V za 1 reakcijo
sterilna voda brez nukleaz			14,3 µl
pufer (Colorless GoTaq Flexi)	5x	1x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2 µl
BSA	10mg/ml	0,40 mg/ml	1 µl
dNTP	10mM	0,40 mM	0,5 µl
GeoF2-noSP ali GeopET-F	10 µM	0,20 µM	0,5 µl
Geo1R ali GeopET-R	10 µM	0,20 µM	0,5 µl
Polimeraza <i>Taq</i>	5 U/µl	0,04 U/µl	0,2 µl
matrica (genomska DNA)			1 µl
Skupno			25 µl

Preglednica 16: Program za pomnoževanje različic lakaznega gena z genomske DNA. Koraki 2, 3 in 4 se ciklično odvijejo 30x.

Program pomnoževanja			Temperaturni gradient pri koraku 3	
Št. koraka	T [°C]	Trajanje	Stolpec	T [°C]
1	94	5 min	1	49,0
2	94	30 s	2	49,1
3	49 – 53	30 s	4	49,8
4	72	90 s	7	51,3
5	72	5 min	9	52,2
6	16	---	11	52,9

Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice za PCR na osnovi kolonije za preverjanje vstavitve pomnožkov PCR v pGEM-T Easy (oligonukleotid SP6) in prisotnosti plazmidov pHisTag+GeoLacc-noSP (oligonukleotid Geo1R) ter pET21-c(+)GeoLacc-CHis (oligonukleotid GeopET-R). V zadnjem stolpcu je podan volumen reagentov za 1 reakcijo.

Sestavina	Začetna konc.	Končna konc.	V za 1 reakcijo
sterilna voda			7,95 µl
pufer (5x 2G Kappa buffer A)	5x	1x	2,5 µl
dNTP	10 mM	0,21 mM	0,25 µl
T7 (začetni oligonukleotid)	10 µM	0,20 µM	0,63 µl
SP6, Geo1R ali GeopET-R	10 µM	0,20 µM	0,63 µl
Kapa2G Fast	5 U/µl	0,021 U/µl	0,05 µl
Skupno			12 µl

Preglednica 18: Programi za PCR na osnovi kolonije za različice lakaznih genov. Koraki 2, 3 in 4 se ciklično odvijejo 30x.

	pHisTag GeoLacc-NHis (DH5α, BL21)	pGEM-T Easy PCR pomnožki (JM109)	pHisTag GeoLacc- noSP (DH5α)	pHisTag GeoLacc- noSP (BL21)	pET-21c(+) GeoLacc-CHis (DH5α)					
Korak	T [°C]	Trajanje	T [°C]	Trajanje	T [°C]	Trajanje	T [°C]	Trajanje	T [°C]	Trajanje
1	95	360 s	95	180 s	95	180 s	95	240 s	95	195 s
2	94	30 s	95	15 s	95	15 s	95	15 s	95	15 s
3	54	30 s	55	15 s	54	15 s	53,5	15 s	54	15 s
4	72	90 s	72	15 s	72	15 s	72	15 s	72	15 s
5	72	300 s	72	60 s	72	60 s	72	60 s	72	60 s
6	16	---	16	---	16	---	16	---	16	---

3.2.1.4 Agarozna elektroforeza

Uspešnost pomnoževanja genskih različic smo preverjali z agarozno elektroforezo. Za pripravo gela in kot elektroforezni pufer smo uporabljali 1x pufer TAE. Agarozne gele smo pripravili z raztopljanjem ustrezne količine agaroze za elektroforezo v pufru (Preglednica 19) ob segrevanju in nato ohlajanju v modelu. Na gel smo nanašali vzorce pomešane s 6x nanašalnim pufrom. Elektroforeza je potekala pri napetosti med 75 in 100 V okoli 1 h. Gele smo 10 min namakali v raztopini etidijevega bromida (1 mg/l), sprali v vodi in slikali s fotoaparatom v komori z UV žarnico.

Preglednica 19: Sestava agaroznih elektroforeznih gelov za različne namene.

Agaroza	1x TAE	Koncentracija agaroze	Debelina žepkov	Namen
0,24 g	30 ml	0,80 %	tanki	Kontrola PCR in PCR na osnovi kolonije
0,48 g	50 ml	0,96 %	debeli	Izolacija DNA iz gela

3.2.1.5 Izolacija DNA iz gela

S pomočjo UV transiluminatorja smo s skalpelom izrezali koščke gela z želenimi fragmenti DNA (bodisi pomnožki PCR bodisi rezani fragmenti ali vektorji). Za

pridobivanje DNA iz koščkov gela smo uporabljali PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) po navodilih proizvajalca. Očiščeno DNA smo shranjevali pri -20 °C.

3.2.1.6 Restrikcija molekul DNA

Pomnožke genskih različic, plazmide s pomnožki in ekspresijske plazmide smo rezali z restrikcijskimi encimi iz Preglednice 3. Sestava restrikcijskih mešanic in čas njihove inkubacije pri 37 °C sta zapisana v Preglednici 20. Za restrikcijo z encimoma *XhoI* in *MluI* smo uporabili 10x pufer R (Fermentas), za restrikcijo s FastDigest *NdeI* in FastDigest *XhoI* pa 10x pufer FastDigest Green Buffer (Fermentas).

Preglednica 20: Sestava restrikcijskih mešanic za različne kombinacije encimov in čas njihove inkubacije pri 37 °C.

Sestavina	GeoLacc-NHis (<i>XhoI, MluI</i>)	pGEM-T Easy GeoLacc-noSP (<i>XhoI, MluI</i>)	pHisTag (<i>XhoI, MluI</i>)	pGEM-T Easy GeoLacc-CHis (<i>NdeI, XhoI</i>)	pET-21c(+) (<i>NdeI, XhoI</i>)
MQ [µl]	4	5	1	5,75	1
10x pufer [µl]	1	1	3	1	3,5
encim 1 [µl]	1	1	1,5	1	1
encim 2 [µl]	1	1	1,5	1	1
DNA [µl]	3	2	23	1,25	2
Skupni volumen [µl]	10	10	30	10	35
Čas inkubacije [min]	10 min	110 min	110 min	10 min	90 min

Po restrikciji iz gela izoliranega pomnožka PCR smo rezan fragment očistili encimov s kompletom PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Po restrikciji plazmidov z vstavljenimi pomnožki PCR in ekspresijskih plazmidov smo mešanice ločili z agarozno elektroforezo (3.2.1.4) in rezane molekule DNA ustrezne velikosti izolirali iz gela (3.2.1.5).

3.2.1.7 Ligacija

Z ligacijo smo v odprte plazmide pGEM-T Easy vstavili pomnožke PCR, v odprte ekspresijske plazmide pa različice domnevnega lakaznega gena. Uporabljali smo komponente kompleta za ligacijo pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) z dvemi različnimi pufri za ligacijo – 2x Rapid Ligation Buffer in 10x T4 DNA ligase buffer.

Ligacijske mešanice smo inkubirali pri sobni temperaturi ali pri 4 °C. Sestava ligacijskih mešanic in čas inkubacije sta navedena v Preglednici 21.

Preglednica 21: Sestava ligacijskih mešanic za različne kombinacije plazmidov in insertov ter pogoji inkubacije

Sestavina	pHisTag + GeoLacc- NHis (<i>Xba</i> I, <i>Mlu</i> I)	pGEM-T Easy + PCR GeoLacc- CHis	pGEM-T Easy + PCR GeoLacc- noSP	pHisTag + GeoLacc- noSP (<i>Xba</i> I, <i>Mlu</i> I)	pET21c + GeoLacc- CHis (<i>Nde</i> I, <i>Xba</i> I)
2x pufer [μl]	5	5	5	-	-
10x pufer [μl]	-	-	-	1	1,5
vektor [μl]	1	1	1	3	5
insert [μl]	3	3	3	5	7
T4 ligaza [μl]	1	1	1	1	1,5
Skupni volumen [μl]	10	10	10	10	15
Inkubacija	1 h, sobna T	1 h, sobna T	1 h, sobna T	prekonočno, 4 °C	prekonočno, 4 °C in 3h, sobna T

3.2.1.8 Transformacija

Z ligacijskimi mešanicami ekspresijskih vektorjev in različic domnevnega lakaznega gena smo transformirali gostiteljski sev *E. coli* DH5α po priloženem protokolu kompleta TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific). Z ligacijskimi mešanicami plazmidov pGEM-T Easy in pomnožkov PCR smo transformirali predpripravljene kompetentne celice *E. coli* JM109 (Promega) iz kompleta pGEM-T Easy Vector Systems po priloženem protokolu.

Vsi uporabljeni plazmidi so vsebovali gen za odpornost na ampicilin, zato smo transformante nacepili na trdna gojišča LB z ampicilinom (100 μg/ml).

S končnimi ekspresijskimi plazmidmi, ki so vsebovali pravilno vstavljen različice domnevnega lakaznega gena, smo po priloženem protokolu kompleta TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific) transformirali *E. coli* BL21(DE3)pLysE in tako ustvarili seve za heterologno proizvodnjo lakaze.

3.2.1.9 Preverjanje uspešnosti transformacije in vstavitve inserta v plazmid

Multiplo mesto za kloniranje se na plazmidu pGEM-T Easy nahaja v genu za β -galaktozidazo, ki s hidrolizo kromogenega X-gal povzroči modro obarvanje kolonije. Kolonije, ki vsebujejo plazmid z uspešno vstavljenim pomnožkom PCR, zaradi prekinitve gena ne razgrajujejo X-gal in se ne obarvajo modro, torej ostanejo bele (t.i. modro-bela selekcija).

Prisotnost pomnožka PCR v pGEM-T Easy v belih kolonijah smo dodatno preverili s PCR na osnovi kolonije (Preglednica 17). Dodatno smo preverili tudi prisotnost različic domnevnega lakaznega gena v ekspresijskih plazmidih pri izbranem številu kolonij *E. coli* DH5 α in BL21(DE3)pLysE. Reakcijske mešanice smo analizirali z agarozno elektroforezo (3.2.1.4).

3.2.1.10 Izolacija plazmidov

Plazmide smo izolirali iz prekonočnih kultur transformiranih gostiteljev *E. coli* DH5a po protokolu kompleta GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Koncentracijo plazmidov smo po izolaciji izmerili z napravo NanoDrop, ki lahko spektrofotometrično izmeri koncentracijo različnim biološkim molekulam. Izolirane plazmide smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.1.11 Sekvenciranje vstavljenih genov v ekspresijskih plazmidov

Pravilnost vstavitve različic domnevnih lakaznih genov v ekspresijski plazmid in odsotnost naključnih mutacij smo preverili s sekvenciranjem v podjetju Macrogen, kamor smo poslali bodisi kolonije s plazmidom na selekcijskem gojišču bodisi izolirane plazmide. Sekvenciranje gena v pHisTag je potekalo z začetnimi oligonukleotidi, ki imajo mesta naleganja na plazmidnem skeletu (nukleotidna zaporedja v Preglednici 2). Sekvenciranje genov v plazmidih pET21-c(+) je potekalo z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na promotor in terminator T7 in jih ponuja podjetje Macrogen, kjer je sekvenciranje potekalo.

3.2.1.12 Priprava trajne kulture

Iz transformant DH5 α s sekvenciranimi plazmidi in produkcijskih sevov smo z aseptičnim prenosom 750 μ l prekonočne kulture v gojišču LB v 2 ml ampolo in dodatkom 250 μ l sterilnega 100 % glicerola pripravili trajne kulture, ki smo jih shranili v zamrzovalniku pri -80 °C.

3.2.2 Proizvodnja različic domnevne lakaze

Dan pred proizvodnjo encima smo produksijski sev iz trajne kulture precepili v sterilno gojišče LB s 100 µg/ml ampicilina in 20 µg/ml kloramfenikola. Inokulum smo prekonočno inkubirali pri 37 °C s stresanjem.

Produksijsko gojišče smo pripravili tako, da smo v 250 ml predhodno pripravljenega sterilnega tekočega gojišča LB aseptično dodali sterilno filtriran CuSO₄ (končna koncentracija 0,25 mM), ampicilin (končna koncentracija 100 µg/ml) in kloramfenikol (končna koncentracija 20 µg/ml). Inokulirali smo ga z 9,5 ml prekonočne kulture produksijskega seva. Inokulirano gojišče smo inkubirali pri 37 °C na stresalniku s 180 RPM. S fotometrom smo spremljali optično gostoto kulture do območja 0,55 – 0,85, ko je kultura v eksponentni fazi rasti in je biomase dovolj za indukcijo proizvodnje. Takrat smo z dodatkom IPTG inducirali izražanje lakaznega gena na ekspresijskih plazmidih v celicah produksijskega seva.

Producijo smo izvajali pri različnih pogojih. Po indukciji smo namreč kulturo inkubirali:

- 4 h pri 37 °C in 180 RPM,
- prekonočno (okoli 15 h) pri sobni temperaturi in 80 RPM ali
- prekonočno (okoli 15 h) pri sobni temperaturi in 200 RPM

Po tem času smo s centrifugiranjem ločili bakterijsko biomaso od porabljenega tekočega gojišča. Centrifugirke s kulturo smo centrifugirali v ohlajeni centrifugi (4 °C) 10 min pri 13000 RPM (približno 17500 RCF). Rabljeno gojišče smo avtoklavirali in zavrgli, bakterijsko biomaso pa shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.2.1 Izolacija različic lakaze iz bakterijske biomase

Pred izolacijo lakaz iz bakterijske biomase z Ni-NTA agarozo smo pripravili pufre z naraščajočo koncentracijo imidazola, ki omogoči spiranje na kolono vezanih proteinov s histidinskim označevalcem (Preglednica 10). Bakterijsko biomaso smo stehtali in na g biomase dodali 3,4 ml liznega pufra, 25 x mešanico inhibitorjev proteaz (končna koncentracija 1 x) in lizocim (končna koncentracija 1 mg/ml). Po 30 min inkubaciji na ledu smo zmes obdelali z ultrazvočnim dezintegratorjem s šestimi 30 s intervali z vmesnimi premori po 30 s (amplituda 10 µm). Sonicirani suspenziji smo dodali po 1 µl RNaze (10 µg) in DNaze (3 µg) in jo na ledu inkubirali 10 min.

Lizat smo centrifugirali 10 min pri 20000 RCF in 4 °C in supernatant ločili od usedline. Ta korak smo še enkrat ponovili s supernatantom lizata. Lakaze smo izolirali iz topne frakcije proteinov, zato smo tako pridobljeni supernatant v plastični koloni združili z 1 ml 50 % Ni-NTA agaroze in zaprto kolono stresali 1,5 h pri 4 °C. Po posedanju agaroze smo zbrali nevezano frakcijo, kolono zaporedno spirali s pufrom za lizo in pufri za spiranje in elucijo (Preglednica 22) ter pri tem lovili frakcije po 0,5 ml, ki smo jih shranili pri 4 °C. Lakazno aktivnost različnih frakcij smo izmerili spektrofotometrično (3.2.3.2).

Preglednica 22: Količine pufrov porabljene med izolacijo proteina in volumni elucijskih frakcij. Količine pufrov so merjene v volumnih kolone (0,5 ml). Določene frakcije v velikosti enega volumna kolone smo zbrali za nadaljnje analize. Pri vseh spiranjih s pufri z imidazolom smo lovili prvo frakcijo ločeno od nadaljnjih treh, pri eluciji s pufrom W250 pa smo ločeno zajeli prvih 7 frakcij.

Pufer	Količina pufra [V]	Lovljene frakcije
pufer za lizo in vezavo (W0)	20	/
W20	45	1, 2-4
W50	28	1, 2-4
W100	28	1, 2-4
W250	7	1-7 posamično

3.2.2.2 Menjava pufra v vzorcih

Pri nekaterih elucijskih frakcijah smo z zaporednim redčenjem z MQ in koncentriranjem z membranskim koncentratorjem AmiconUltra dosegli vsaj 600-kratno zmanjšanje koncentracij imidazola in NaCl. Morebitno oborino smo odstranili s centrifugiranjem.

3.2.2.3 SDS-PAGE

Sestavo usedline in supernatanta lizata, ulovljenih frakcij po izolaciji in drugih proteinskih vzorcev smo analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE). Vzorce smo pripravili z dodajanjem 5 x vzorčnega pufra brez reducenta in 10 min kuhanjem v vreli vodi. Nekaterih vzorcev namenoma nismo kuhalili, da bi zaznali morebitno encimsko aktivnost neposredno v gelu (3.2.3.1).

Uporabljali smo 0,75 mm debele poliakrilamidne gele iz nanašalnega dela s 4 % akrilamidom in ločevalnega dela z 10 % akrilamidom (Preglednica 23). Elektroforeza je potekala v 1x elektroforeznem pufru pri napetosti 150 V dokler fronta ni dosegla konca gela. Za oceno molekulske mase smo vedno uporabili obarvano proteinsko lestvico (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Gel smo nato sprali z vodo in obarvali z barvilkom Page Blue Protein Stain (Fermentas) in fotografirali po razbarvanju

z vodo, razen če smo ga uporabili za prenos western (3.2.2.4) ali cimografijo (3.2.3.1), kjer potrebujemo neobarvan gel.

Preglednica 23: Sestava 10 % ločevalnega in 4 % nanašalnega poliakrilamidnega gela za SDS-PAGE. Kadar smo uporabili založno raztopino amonijev persulfata s koncentracijo 1,5 %, smo dodali temu ustrezno manj dH₂O.

Sestavina	Ločevalni gel (10 % APS)	Nanašalni gel (10 % APS)
dH ₂ O	3,659 ml	3,1575
3 M Tris pH 8,8	0,75 ml	/
0,5 M Tris pH 6,8	/	1,25 ml
10 % SDS	40 µl	50 µl
40 % akrilamid	1,5 ml	0,5 ml
10 % APS	45 µl	37,5 µl
TEMED	6 µl	5 µl
Skupni volumen	6 ml	5 ml

3.2.2.4 Prenos western

Za imunodetekcijo heterologno proizvedenega encima s histidinskim označevalcem smo uporabili mokri prenos western na PVDF membrano. Kot primarna protitelesa smo uporabili monoklonski mišji IgG1 proti histidinskemu označevalcu, kot sekundarna pa kozja protitelesa proti mišjemu IgG konjugirana s hrenovo peroksidazo. PVDF membrano smo najprej aktivirali z omočenjem v metanolu (20 s) in spiranjem z vodo. Membrano smo postavili na gel, oboje pa je bilo v sendviču s filtrirnim papirjem in gobicami. Prenos je potekal 1,5 h pri 150 mA v pufru za prenos western (Preglednica 7). Blokiranje membrane je potekalo čez noč v 5 % BSA pri 4 °C.

Membrano smo po blokiranju:

- inkubirali 2 h s primarnimi protitelesi redčenimi 1:2000 v 1 % BSA pri sobni temperaturi,
- spirali trikrat po 10 min v pufru za spiranje ,
- inkubirali 2 h s sekundarnimi protitelesi redčenimi 1:2000 v 1% BSA pri sobni temperaturi
- spirali trikrat po 10 min v pufru za spiranje

Lakaze s histidinskimi označevalci smo detektirali preko aktivnosti hrenove peroksidaze na sekundarnih protitelesih. 15 mg peroksidaznega substrata 4-Cl-1-naftola smo raztopili v 5

ml metanola, ga dodali v 25 ml pufra za razvijanje in mu tik pred uporabo dodali še 50 μl vodikovega peroksida. Po nekajminutni inkubaciji v raztopini so se na membrani pojavile vijolično obarvane lise, kjer je prišlo do vezave protiteles na histidinski označevalec. Obarvano membrano smo fotografirali.

3.2.3 Testiranje lakazne aktivnosti

3.2.3.1 Cimografija - encimski test v poliakrilamidnem gelu

Po ločevanju nekuhanih vzorcev z SDS-PAGE smo poliakrilamidni gel po nekaj minut spirali v vodi in nato na gel nakapljali okoli 200 μl 10 mM raztopino lakaznih substratov ABTS ali 2,6-DMP. V nekaj minutah so se v gelu pojavile obarvane lise, če je bila v vzorcu prisotna lakazna aktivnost. Gele smo fotografirali.

3.2.3.2 Spektrofotometrične meritve encimske aktivnosti

Za spektrofotometrično merjenje encimske aktivnosti smo uporabljali substrate, katerih oksidirana oblika ima drugačen absorpcijski spekter kot reducirana. Reakcije v mikrotitrskih ploščah s 96 jamicami smo spremljali pri ustreznih valovnih dolžinah (Preglednica 24).

Preglednica 24: Uporabljeni lakazni substrati in valovne dolžine, pri katerih smo merili absorpcijo za spremljanje njihove oksidacije.

Substrat	Valovna dolžina [nm]	Substrat	Valovna dolžina [nm]
ABTS	420	siringaldazin	525
2,6-DMP	468	gvajakol	468
katehol	410	vanilinska kislina	350
pirogalol	450	ferulična kislina	320
siringaldehid	365	tirozin	280
siringična kislina	360	K ₄ [Fe(CN) ₆]	405

Končni volumen reakcijskih mešanic v posameznih jamicah mikrotitrskih plošč je bil vedno 100 μl . Mešanice so bile vedno sestavljene iz pufra, vzorca (oz. ustrezne kontrole) in raztopine substrata. Ker so bili reakcijski pogoji pri različnih testih drugačni, smo reakcijske mešanice za posamezne teste povzeli v Preglednici 25.

Vzorec je bila raztopina primerno očiščenega proteina (običajno frakcija W50, W100 ali

EL). Pri meritvah lastnosti GeoLacc-CHis smo praviloma uporabljali združene frakcije 2-4 po spiranju z W50 ali združene frakcije 2-4 po eluciji z elucijskim pufrom. Pri teh smo koncentracije natrijevega dihidrogenfosfata, imidazola in NaCl zmanjšali več kot 600-krat z redčenjem z MQ in ultrafiltracijo z membranskim koncentratorjem. To frakcijo smo za potrebe karakterizacije običajno 50-krat redčili z MQ, torej je bila koncentracija NaH_2PO_4 , imidazola v reakcijah in NaCl okoli 1,6 μM , 8 μM in 10 μM .

Preglednica 25: Sestava reakcijskih mešanic za spektrofotometrično ugotavljanje lakazne aktivnosti in lastnosti lakaz.

Pufer	pH _{pufer}	V _{pufer} [μl]	V _{vzorec} [μl]	V _{substrat} [μl]	c _{substrat} [mM]	c _{CuSO₄} [mM]	Namen
citrat-fosfatni pufer (s CuSO ₄)	5,5	10	10	80	80	0,025	merjenje aktivnosti frakcij procesiranja biomase in izolacije encima (ABTS)
citrat-fosfatni pufer (s CuSO ₄)	5,5	50	10	40	40	0,5	kontrola gostiteljske lakaze, vpliv hitrosti mešanja na prekonočno produkcijo (ABTS)
citrat-fosfatni pufer (z ali brez CuSO ₄)	5,5	50	10	40	40	0 – 1	določanje vpliva bakra na aktivnost encima (ABTS)
citrat-fosfatni pufer (s CuSO ₄)	2,5-7,0	80	10	10	10	0,8	določanje pH optimuma (ABTS)
citrat-fosfatni pufer (s CuSO ₄)	5,0	640	80	80	10	0,8	določanje temperaturnega optimuma (ABTS)
citrat-fosfatni pufer (s CuSO ₄)	5,0	80	10	10	10	0,8	merjenje rezidualne aktivnosti (ABTS)
citrat-fosfatni pufer (s CuSO ₄ in NaCl)	5,0	80	10	10	10	0,8	merjenje inhibicije lakazne aktivnosti z NaCl (ABTS)
citrat-fosfatni pufer	5,0	30	10	10	10	/	merjenje inhibicije lakazne aktivnosti z različnimi solmi (ABTS)
citrat-fosfatni pufer (s CuSO ₄)	5,0	10	10	80	0,059 – 80	0,8	merjenje K _m (ABTS)
Tris	7,2 7,5-9,5	80	10	10	10	/	določanje pH optimuma (2,6-DMP)
Tris	8,5	10	10	80	0,059 – 80	/	merjenje K _m (2,6-DMP)

Encimsko aktivnost predstavlja naklon krivulje absorbance v odvisnosti od časa v linearinem delu ob začetku merjene oksidacije substrata. Vrednost smo pridobili z linearno regresijo na točkah z začetnega linearne dela, katerega razpon smo ocenili vizualno. Aktivnost smo predstavljali tudi kot relativno vrednost v odstotkih, pri čemer je 100 %

predstavljalova povprečna vrednost vrha posamezne krivulje. Meritve so bile običajno izvedene v triplikatih. V tem primeru smo izračunali tudi standardne deviacije in jih grafično prikazali. Manipulacije s podatki s spektrofotometra in njihovo vizualizacijo smo izvedli s programskim jezikom R (R version 2.15.3 (2013-03-01)) v okolju RStudio 0.96.331.

Pri določanju optimalne pH vrednosti za oksidacijo ABTS smo uporabili citrat-fosfatne pufre s pH vrednostmi med 2,5 in 7,0 s korakom 0,5 in 1 mM CuSO₄, pri določanju optimalne pH vrednosti za oksidacijo 2,6-DMP pa Tris pufre med pH 7,2 in 9,5 brez CuSO₄, saj 2,6-DMP v njegovi prisotnosti neencimsko oksidira.

Pri določanju temperaturnega optimuma smo encim dodajali v 1 ml kiveto s predogretim pufrom in spektrofotometrom ogretim na temperaturo merjenja. Začetno hitrost oksidacije ABTS smo merili pri temperaturah od 40 do 90 °C s korakom 10 °C.

Vpliv temperature na integriteto encima smo ugotavljali z merjenjem rezidualne aktivnosti na sobno temperaturo ohlajenega encima po izpostavitvi mešanice pufra in encimske frakcije temperaturam med 40 in 90 °C za 15, 30, 45 ali 60 min. 100 % relativno aktivnost predstavlja aktivnost encima pri sobni temperaturi oziroma času 0 min.

Odvisnost hitrosti oksidacije substrata ABTS z GeoLacc-CHis od koncentracije substrata smo merili v koncentracijskem območju med 80 mM in 0,059 mM ABTS. Raztopino ABTS smo redčili v citrat-fosfatnem pufru s pH 5,0 v dveh redčitvenih vrstah. Končna koncentracija je v prvi padala s faktorjem 2 od 80 mM ABTS do 0,625 mM, v drugi pa s faktorjem 4 od 60 mM ABTS do 0,059 mM. K_m smo ocenili s krivuljami kinetike Michaelis-Menten na podlagi točk devetih poskusov.

Odvisnost hitrosti oksidacije substrata 2,6-DMP z GeoLacc-CHis od koncentracije substrata smo merili v koncentracijskem območju med 0,059 mM in 20 mM 2,6-DMP. Raztopino 2,6-DMP smo pred uporabo redčili v 25 mM pufru Tris (pH 8,5) v dveh redčitvenih vrstah. Končna koncentracija je v prvi padala s faktorjem 2 od 20 mM 2,6-DMP do 0,625 mM 2,6-DMP, v drugi pa s faktorjem 4 od 15 mM do 0,059 mM. K_m smo ocenili s krivuljami kinetike Michaelis-Menten na podlagi točk štirih poskusov.

Inhibicijo GeoLacc-CHis z NaCl smo merili v koncentracijskem območju od 0 mM do 62,5 mM NaCl spektrofotometrično preko vpliva na oksidacijo 10 mM ABTS pri pH 5,0. Reakcije so potekale v prisotnosti 0,8 mM CuSO₄. Redčitvena vrsta je bila pripravljena s citrat-fosfatnim pufrom in je s faktorjem 2 padala od končne koncentracije 62,5 mM NaCl

do 0,98 mM NaCl z dodatno meritvijo v odsotnosti NaCl. Inhibicijo GeoLacc-CHis z različnimi drugimi solmi smo merili podobno, le da so bile soli raztopljljene v vodi in reakcije niso potekale v prisotnosti bakra. Meritve z ostalimi solmi niso bile ponovljene.

3.2.4 Bioinformatska orodja

Potencialne homologe GeoLacc, proteinskega produkta domnevnega lakaznega gena Gmet_2154, smo poiskali z algoritmoma blastn in blastp (Altschul in sod., 1990) na strežniku NCBI. S prvim smo iskali homologna nukleotidna zaporedja, z drugim pa aminokislinska. Identičnost in podobnost homologov z aminokislinskim zaporedjem GeoLacc smo ugotovili z orodjem EMBOSS Needle (Rice in sod., 2000) na strežniku EMBL-EBI.

Za iskanje signalnih peptidov v aminokislinskih zaporedjih smo uporabili več orodij in njihove rezultate primerjali. Z orodjem TATP 1.0 (Bendtsen in sod., 2005a) smo ugotavljali prisotnost signalnega motiva transportne poti TAT (ang. *twin-arginine translocation pathway*) in pripadajočega signalnega peptida v prvih 40 aminokislinah v posameznem zaporedju. Z orodjem SignalP 4.1 (Petersen in sod., 2011) smo ugotavljali prisotnost signalnega peptida ob predpostavki, da izbrana zaporedja ne vsebujejo transmembranskih regij. Izbrana je bila višja občutljivost, primerljiva s SignalP 3.0 (Bendtsen in sod., 2005b). V vseh primerih razen CotA, ki izhaja iz po Gramu pozitivnega *Bacillus subtilis*, smo za iskanje uporabili nastavitev "Gram-negative bacteria". Uporabili smo še orodji Phobius (Käll in sod., 2004) in PolyPhobius (Käll in sod., 2005) na strežniku Phobius (Käll in sod., 2007). PolyPhobius pri ugotavljanju signalnega peptida upošteva poravnavo s podobnimi proteinimi.

Ohranjene domene v aminokislinskih zaporedjih smo poiskali z aplikacijo CDD oz. Conserved Domain Database (Marchler-Bauer in Bryant, 2004; Marchler-Bauer in sod., 2009; Marchler-Bauer in sod., 2011). Sekundarno strukturo smo predvideli z aplikacijo Jpred3 (Cole in sod., 2008).

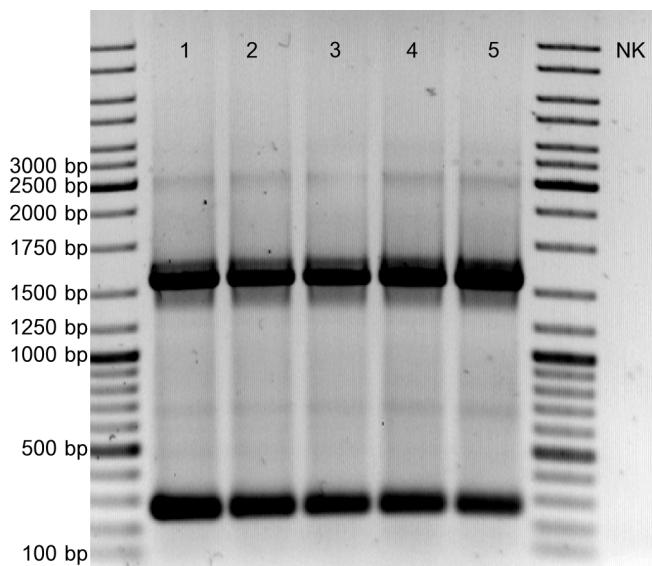
Za poravnavo aminokislinskih zaporedij vseh do sedaj okarakteriziranih bakterijskih lakaz, katerih zaporedja so na voljo, smo uporabili algoritem Muscle (Edgar, 2004) v programu MEGA5 (Tamura in sod., 2011). Na podlagi poravnave smo s programom MEGA5 z metodo povezovanja sosedov (ang. *neighbour joining*) narisali nekoreninjeno filogenetsko drevo.

4 REZULTATI

4.1 MOLEKULARNO KLONIRANJE

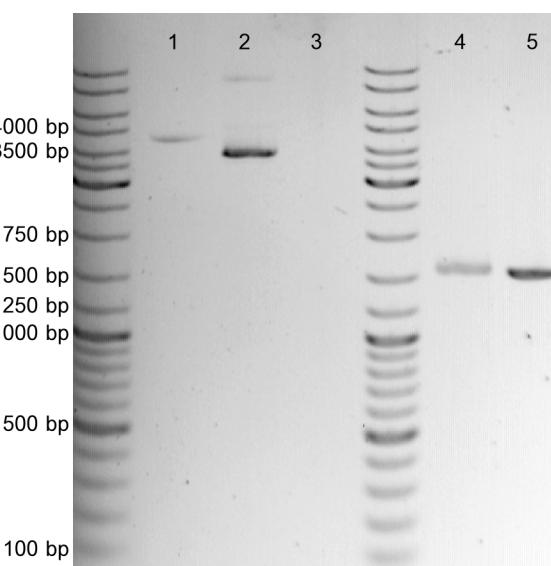
4.1.1 Molekularno kloniranje GeoLacc-NHis

Z uporabo začetnih oligonukleotidov Geo1F in Geo1R smo s PCR iz genoma bakterije *Geobacter metallireducens* GS-15 pomnožili DNA fragment velikosti nad 1500 bp imenovan GeoLacc-NHis (Slika 2), kar ustreza pričakovani dolžini 1564 bp.



Slika 2: Agarozna elektroforeza pomnožkov PCR GeoLacc-NHis pri različnih temperaturah naleganja. Pomnožki velikosti nad 1500 bp so GeoLacc-NHis - pomnožki gena Gmet_2154 z začetnimi oligonukleotidi Geo1F in Geo1R. Legenda: 1 – 49,1 °C, 2 – 49,8 °C, 3 – 51,3 °C, 4 - 52,2 °C, 5 – 52,9 °C, NK – negativna kontrola brez matrice.

Celotno vsebino reakcijskih mešanic 4 in 5, pri katerih je reakcija potekala z najvišjima temperaturama naleganja (52,2 °C in 52,9 °C), smo ločili z agarozno elektroforezo, iz gela izrezali ustrezni elektroforezni lisi in iz koščkov izolirali DNA. Del izoliranega DNA fragmenta smo rezali z restriktijskima encimoma *Xba*I in *Mlu*I. Rezan in nerezan izoliran fragment smo primerjali z gelsko elektroforezo. Izolacija pomnožka je bila uspešna, restrikcija pa se ni zgodila na nepričakovanih mestih na viden način (Slika 3). Preverili smo tudi intaktnost predhodno rezanega plazmida pHisTag in velikost tako lineariziranega plazmida primerjali z nerezanim plazmidom pHisTag (Slika 3). Plazmid predhodno rezan z *Xba*I in *Mlu*I je bil lineariziran in nerazgrajen.



Slika 3: Agarozna elektroforeza rezanega in nerezanega izoliranega pomnožka GeoLacc-NHis ter rezanega in nerezanega plazmida pHisTag. Uporabljeni so bili restriktijski encimi *Xba*I in *Mlu*I. Legenda: 1 – rezan pHisTag, 2 – nerezan pHisTag, 3 – prazno, 4 - rezan izoliran pomnožek, 5 – nerezan izoliran pomnožek.

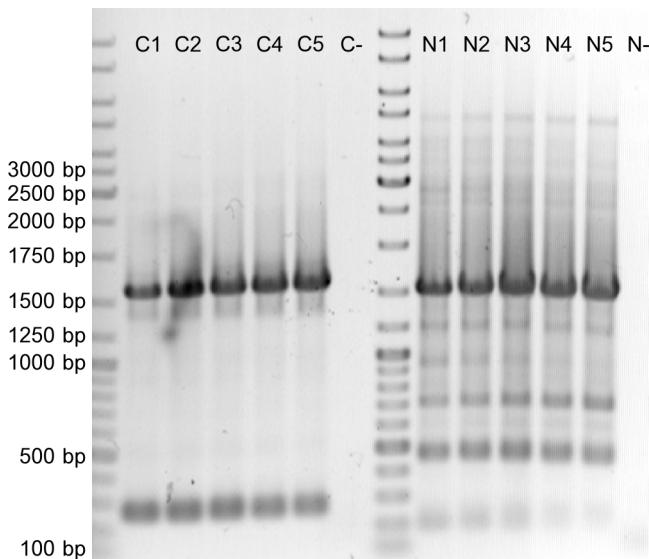
Rezan fragment smo s kompletom PCR Purification Kit očistili restriktijskih encimov in ga nato ligirali v plazmid pHisTag rezan z ustreznimi restriktijskimi encimi. Vstavitev fragmenta v plazmid in transformacijo s pravilnim plazmidom smo s PCR na osnovi kolonije uspešno pokazali pri treh kolonijah *E. coli* DH5 α zraslih po transformaciji z ligacijsko mešanicou. Iz ene od njih smo izolirali plazmid pHisTag+GeoLacc-NHis in z njim transformirali *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Uspešnost transformacije smo preverili s PCR na osnovi kolonije.

4.1.2 Molekularno kloniranje GeoLacc-noSP in GeoLacc-CHis

Z začetnimi oligonukleotidi GeopET-F in GeopET-R smo s PCR iz genoma bakterije *Geobacter metallireducens* GS-15 izolirali DNA fragment velikosti nad 1500 bp, imenovan GeoLacc-CHis, z začetnimi oligonukleotidi GeoF2-noSP in Geo1R pa DNA fragment velikosti okoli 1500 bp, imenovan GeoLacc-noSP, in nekaj neželenih produktov. Velikosti sta ustrezali pričakovanim vrednostim 1560 bp in 1495 bp (Slika 4).

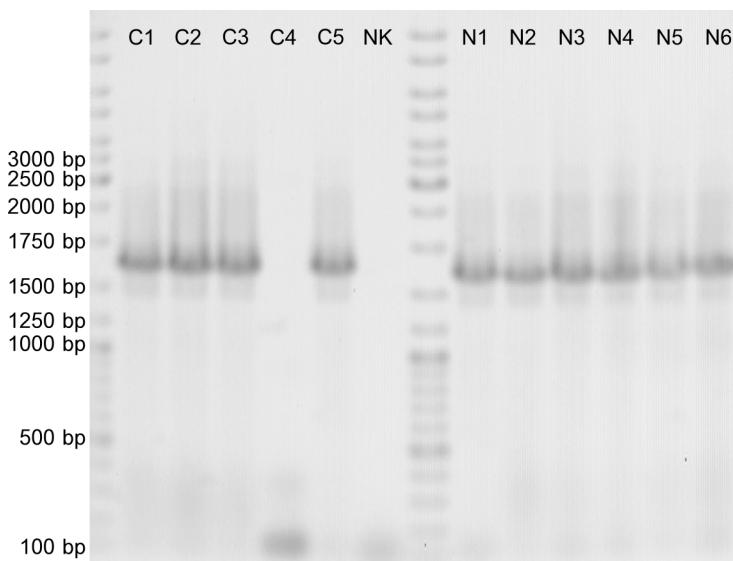
Reakcijske mešanice PCR GeoLacc-noSP in GeoLacc-CHis smo ločili z agarozno elektroforezo in iz gela izolirali pomnožke pravilnih velikosti. Te smo ligirali v plazmid pGEM-T Easy in z ligacijsko mešanicou transformirali kompetentne celice *E. coli* JM109. Uspešnost ligacije smo s PCR na osnovi kolonije preverili pri 6 belih kolonijah pGEM-T Easy+GeoLacc-noSP in 3 belih ter 2 mešanih kolonijah pGEM-T Easy+GeoLacc-CHis. Vse razen ene kolonije pGEM-T Easy+GeoLacc-CHis so vsebovale plazmide z

vstavljenimi pomnožki (Slika 5). Plazmida smo izolirali iz uspešnih transformant, z restriktijskima encimoma *Xba*I in *Mlu*I rezali plazmida pHisTag in pGEM-T Easy+GeoLacc-noSP, z restriktijskima encimoma FastDigest *Xba*I in FastDigest *Nde*I pa plazmida pET-21c(+) in pGEM-T Easy+GeoLacc-CHis. Restriktijske mešanice smo ločili z agarozno elektroforezo in iz gela izolirali linearizirane plazmide ter rezane fragmente. Ustrezanje pričakovanim velikostim smo preverili z agarozno elektroforezo (Slika 6).

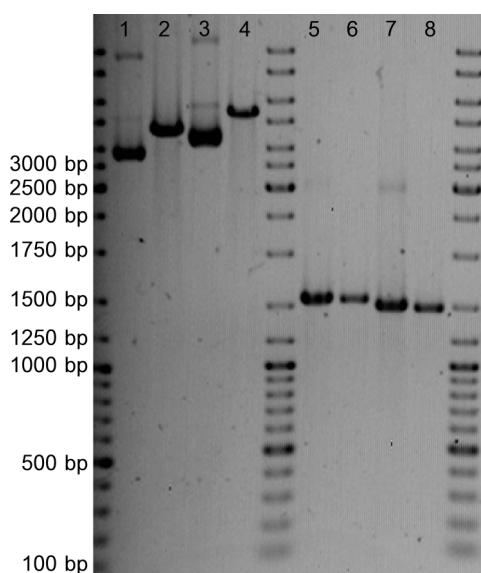


Slika 4: Agarozna elektroforeza pomnožkov PCR GeoLacc-CHis in GeoLacc-NHis pri različnih temperaturah naleganja. Želeni pomnožki so veliki okoli 1500 bp. Legenda: C1-C5 – GeoLacc-CHis, N1-N5 – GeoLacc-noSP; C1 & N1 – 49,1 °C; C2 & N2 – 50,3 °C; C3 & N3 – 51,3 °C; C4 & N4 – 52,2 °C; C5 & N5 – 52,9 °C; C- & N- - negativni kontroli brez matrice.

Restriktijski fragment GeoLacc-noSP smo z ligacijo vstavili v rezan pHisTag, fragment GeoLacc-CHis pa v pET-21c(+). Vstavitev fragmentov v plazmid in transformacijo z ustreznim plazmidom smo preverili s PCR na osnovi kolonije. Vse kolonije so dale pozitiven rezultat. Iz pozitivnih klonov smo izolirali plazmida pHisTag+GeoLacc-noSP in pET-21c(+) +GeoLacc-CHis. Z njima smo transformirali *E. coli* BL21. Uspešnost transformacije smo preverili s PCR na osnovi kolonije.



Slika 5: Agarozna elektroforeza PCR na osnovi kolonij transformant za preverjanje prisotnosti insertov v plazmidih pGEM-T Easy. Legenda: C1-C5 – transformante GeoLacc-CHis, kolonije 1-5 (3 bele, 2 mešani); N1-N6 – transformante GeoLacc-noSP, kolonije 1-6 (6 belih); NK – negativna kontrola z začetnimi oligonukleotidi T7 in SP6 brez matrice.



Slika 6: Agarozna elektroforeza izoliranih lineariziranih plazmidov pHisTag in pET21-c(+) ter rezanih fragmentov GeoLacc-noSP in GeoLacc-CHis. Legenda: 1 – nerezan pHisTag; 2 – rezan pHisTag; 3 – nerezan pET-21c(+); 4 – rezan pET-21c(+); 5 – pomnožek PCR GeoLacc-CHis; 6 – rezan fragment GeoLacc-CHis; 7 – pomnožek PCR GeoLacc-noSP; 8 – rezan fragment GeoLacc-noSP.

4.1.3 Sekvenciranje ekspresijskih plazmidov

Vključka v ekspresijskih plazmidih za produkcijo GeoLacc-NHis in GeoLacc-CHis smo sekvencirali in s tem potrdili, da sta njuni nukleotidni zaporedji enaki pričakovanim. Nukleotidno zaporedje tretjega ekspresijskega plazmida, uporabljenega za produkcijo GeoLacc-noSP, pa se je od pričakovanega razlikovalo v baznem paru 578 ($t \rightarrow c$), kar je ekvivalentno mutaciji V208A pri divjem tipu GeoLacc (Slika 7).

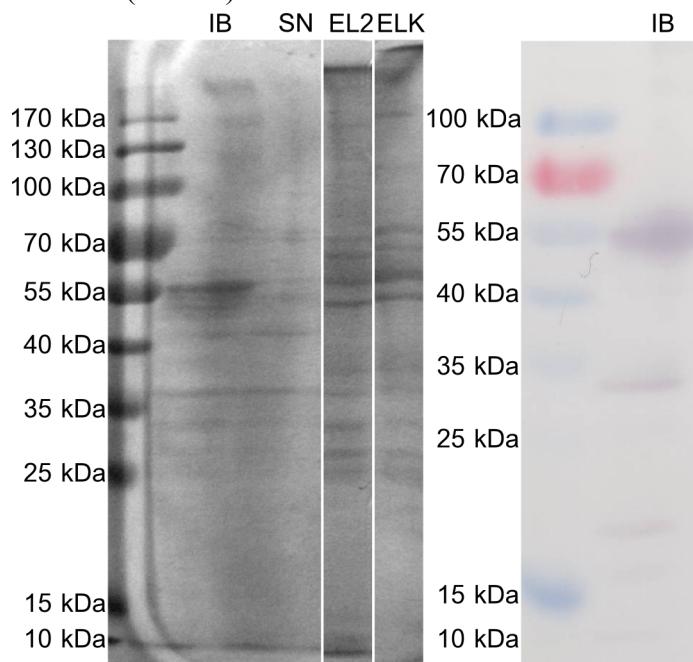
GeoLacc	-----M KKRGMNRRKFITAASVGVAGVYATLHAGVVRAAMMGSGGMGGGMGGGMGG	52
GeoLacc-NHis	MHHHHHHSSKKRGMNRRKFITAASVGVAGVYATLHAGVVRAAMMGSGGMGGGMGGGMGG	60
GeoLacc-noSP	-----MHHHHHHSSLHAGVVRAAMMGSGGMGGGMGGGMGG	37
GeoLacc-CHis	-----M KKRGMNRRKFITAASVGVAGVYATLHAGVVRAAMMGSGGMGGGMGGGMGG	52
	: ****	
GeoLacc	TTTTIVDPPPGASFFDIPNATKNSAGAYELLVKEARRLRNGTAVTLLTYNGMYPGPVIRA	112
GeoLacc-NHis	TTTTIVDPPPGASFFDIPNATKNSAGAYELLVKEARRLRNGTAVTLLTYNGMYPGPVIRA	120
GeoLacc-noSP	TTTTIVDPPPGASFFDIPNATKNSAGAYELLVKEARRLRNGTAVTLLTYNGMYPGPVIRA	97
GeoLacc-CHis	TTTTIVDPPPGASFFDIPNATKNSAGAYELLVKEARRLRNGTAVTLLTYNGMYPGPVIRA	112
	: ****	
GeoLacc	ARGDMLKVRMVNMLPKTTASNILGHVRNITNIHTGLHVTPSGMDNMMMTAAPGTELNY	172
GeoLacc-NHis	ARGDMLKVRMVNMLPKTTASNILGHVRNITNIHTGLHVTPSGMDNMMMTAAPGTELNY	180
GeoLacc-noSP	ARGDMLKVRMVNMLPKTTASNILGHVRNITNIHTGLHVTPSGMDNMMMTAAPGTELNY	157
GeoLacc-CHis	ARGDMLKVRMVNMLPKTTASNILGHVRNITNIHTGLHVTPSGMDNMMMTAAPGTELNY	172
	: ****	
GeoLacc	EYDLALEEPGHLNFYHPVHGSAEQQYWGGLAGPLVIDDAAGSPLSGYETHVMFIKDLTI	232
GeoLacc-NHis	EYDLALEEPGHLNFYHPVHGSAEQQYWGGLAGPLVIDDAAGSPLSGYETHVMFIKDLTI	240
GeoLacc-noSP	EYDLALEEPGHLNFYHPVHGSAEQQYWGGLAGPLAIDDAAGSPLSGYETHVMFIKDLTI	217
GeoLacc-CHis	EYDLALEEPGHLNFYHPVHGSAEQQYWGGLAGPLVIDDAAGSPLSGYETHVMFIKDLTI	232
	: ****	
GeoLacc	ANGLPEPYTSNSDFMRGKEGNLVMVNGQVNPVLSIRPGQVQRWQIVNACNARFLKSLDR	292
GeoLacc-NHis	ANGLPEPYTSNSDFMRGKEGNLVMVNGQVNPVLSIRPGQVQRWQIVNACNARFLKSLDR	300
GeoLacc-noSP	ANGLPEPYTSNSDFMRGKEGNLVMVNGQVNPVLSIRPGQVQRWQIVNACNARFLKSLDR	277
GeoLacc-CHis	ANGLPEPYTSNSDFMRGKEGNLVMVNGQVNPVLSIRPGQVQRWQIVNACNARFLKSLDR	292
	: ****	
GeoLacc	HSLWLVTGTDGGLLDKPYKLSTILLAPGERVDLVKADQGGGNFKLLSLPYARGGSLQQV	352
GeoLacc-NHis	HSLWLVTGTDGGLLDKPYKLSTILLAPGERVDLVKADQGGGNFKLLSLPYARGGSLQQV	360
GeoLacc-noSP	HSLWLVTGTDGGLLDKPYKLSTILLAPGERVDLVKADQGGGNFKLLSLPYARGGSLQQV	337
GeoLacc-CHis	HSLWLVTGTDGGLLDKPYKLSTILLAPGERVDLVKADQGGGNFKLLSLPYARGGSLQQV	352
	: ****	
GeoLacc	TLLTLAYGGISAGDTLPTAVNPAAARLNMNLSLLPQQRQISLSLMMGRGYINGISYTDMDH	412
GeoLacc-NHis	TLLTLAYGGISAGDTLPTAVNPAAARLNMNLSLLPQQRQISLSLMMGRGYINGISYTDMDH	420
GeoLacc-noSP	TLLTLAYGGISAGDTLPTAVNPAAARLNMNLSLLPQQRQISLSLMMGRGYINGISYTDMDH	397
GeoLacc-CHis	TLLTLAYGGISAGDTLPTAVNPAAARLNMNLSLLPQQRQISLSLMMGRGYINGISYTDMDH	412
	: ****	
GeoLacc	AYTISSSGLGTYEVWEIVNQSGMDIPFQVNNSCQVLSQLGGDPDYASLYTTIPAWKDVV	472
GeoLacc-NHis	AYTISSSGLGTYEVWEIVNQSGMDIPFQVNNSCQVLSQLGGDPDYASLYTTIPAWKDVV	480
GeoLacc-noSP	AYTISSSGLGTYEVWEIVNQSGMDIPFQVNNSCQVLSQLGGDPDYASLYTTIPAWKDVV	457
GeoLacc-CHis	AYTISSSGLGTYEVWEIVNQSGMDIPFQVNNSCQVLSQLGGDPDYASLYTTIPAWKDVV	472
	: ****	
GeoLacc	IPKMGSATILVPVKDYDGTMFHICHIVEIEDIGMMGVWDIGMM*------	515
GeoLacc-NHis	IPKMGSATILVPVKDYDGTMFHICHIVEIEDIGMMGVWDIGMM*------	523
GeoLacc-noSP	IPKMGSATILVPVKDYDGTMFHICHIVEIEDIGMMGVWDIGMM*------	500
GeoLacc-CHis	IPKMGSATILVPVKDYDGTMFHICHIVEIEDIGMMGVWDIGMMLEHHHHHH*	523
	: ****	

Slika 7: Poravnava aminokislinskih zaporedij različic GeoLacc. S svetlo modro so označeni histidinski označevalci, z rožnato območje nizke kompleksnosti bogato z glicinom in metioninom, z zeleno štiri vezavna mesta za baker, z oranžno pa mutacija v različici GeoLacc-noSP.

4.2 PRODUKCIJA IN IZOLACIJA LAKAZ

4.2.1 Producija in izolacija GeoLacc-NHis

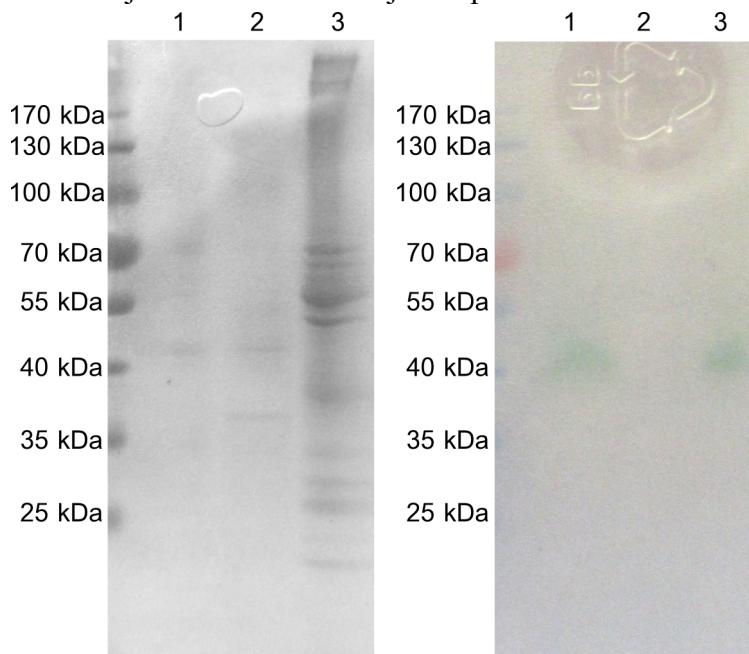
Po procesiranju lizata biomase produkcijskega seva *E. coli* BL21 pHisTag+GeoLacc-NHis smo odvzeli vzorec usedline lizata z vidno belo frakcijo, ki je verjetno vsebovala inkluzijska telesca, in supernatanta lizata za analizo z SDS-PAGE. Odvzeli smo tudi vzorce elucijskih frakcij med izolacijo lakaze GeoLacc-NHis ter vzorec koncentriranega izolata z razredčenim pufrom. Vzorce smo analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo in prenosom western. Elektroforezno liso pričakovane velikosti (okoli 56 kDa) smo opazili pri vzorcu inkluzijskih teles ter izoliranem proteinu (Slika 8). Pri supernatantu lizata ni bilo možno opaziti izstopajoče lise. Pri prenosu western, kjer smo uporabili primarna protitelesa specifična proti histidinskemu označevalcu in sekundarna protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo, smo dobili signal samo pri vzorcu usedline lizata oziroma inkluzijskih teles (Slika 8).



Slika 8: Analiza vzorcev GeoLacc-NHis z SDS-PAGE in prenosom western. Levo: SDS-PAGE. Desno: prenos western. Legenda: IB – usedlina lizata z inkluzijskimi telesci, SN – supernatant lizata, EL2 – elucijska frakcija 2, ELK – koncentrirana elucijska frakcija z redčenim pufrom.

Z nekuhanimi vzorci supernatanta lizata in koncentrirane elucijske frakcije smo naredili cimografijo s substratom ABTS (Slika 9, desno). Poleg nekuhanih vzorcev smo na gel nanesli 10 min kuhan vzorec supernatanta lizata. Poliakrilamidni gel z enakimi vzorci smo obarvali z barvilom Page Blue Protein Stain (Slika 9, levo). S cimografijo smo zaznali lakazno aktivnost v proteinski lisi z molekulsko maso približno 40 kDa, kar je nižje od pričakovane molekulske mase 55 kDa. Zaznali smo jo v nekuhanih vzorcih, kar podpira

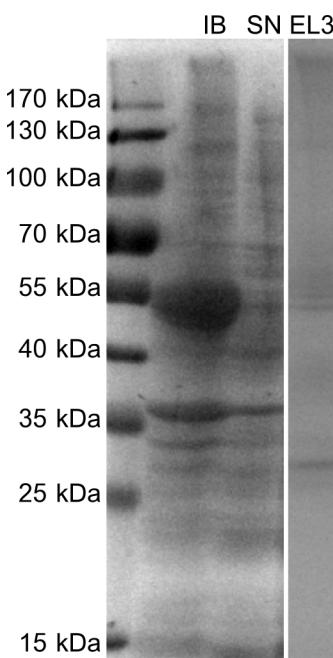
predpostavko, da jo izkazuje izraženi protein. Spremenjena mobilnost je verjetno posledica obdelave vzorca, kjer natrijev dodecil sulfat v vzorcih brez kuhanja ni denaturiral proteinov in se vezal na njih v enakem razmerju kot pri kuhanih.



Slika 9: Analiza vzorcev GeoLacc-NHis z SDS-PAGE in cimografijo z ABTS. Levo: SDS-PAGE. Desno: cimogram z ABTS. Legenda: 1 – nekuhan supernatant lizata, 2 – kuhan supernatant lizata, 3 – koncentrirana elucijska frakcija z redčenim pufrom.

4.2.2 Producija in izolacija GeoLacc-noSP

Kot pri GeoLacc-NHis smo tudi pri GeoLacc-noSP po procesiranju lizata biomase in izolaciji jemali vzorce, ki smo jih analizirali z SDS-PAGE (Slika 10). Tudi tu smo opazili liso pričakovane velikosti (okoli 54 kDa) pri vzorcu inkluzijskih teles, kjer je bila posebej izrazita, in pri vzorcu elucijske frakcije. Pri supernatantu lizata ni jasno vidnih lis pričakovane velikosti, saj proizvodnja tega proteina ni tako učinkovita, da bi lahko njegova količina pomenila znaten delež vseh topnih proteinov v celici. Kljub temu se v topni obliki proizvede dovolj proteina, da ga je možno iz supernatanta izolirati.



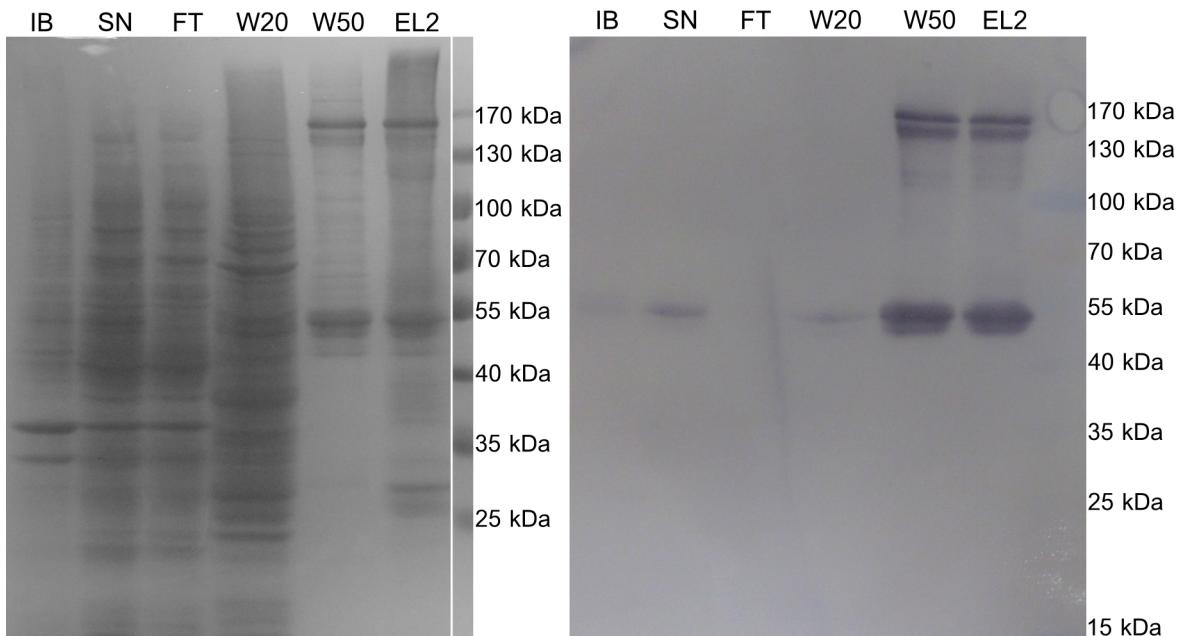
Slika 10: Analiza vzorcev GeoLacc-noSP z SDS-PAGE. Opazna je tvorba inkluzijskih teles. Legenda: IB – usedline lizata z inkluzijskimi telesci, SN – supernatant lizata, EL3 – elucijska frakcija 3.

4.2.3 Producija in izolacija GeoLacc-CHis

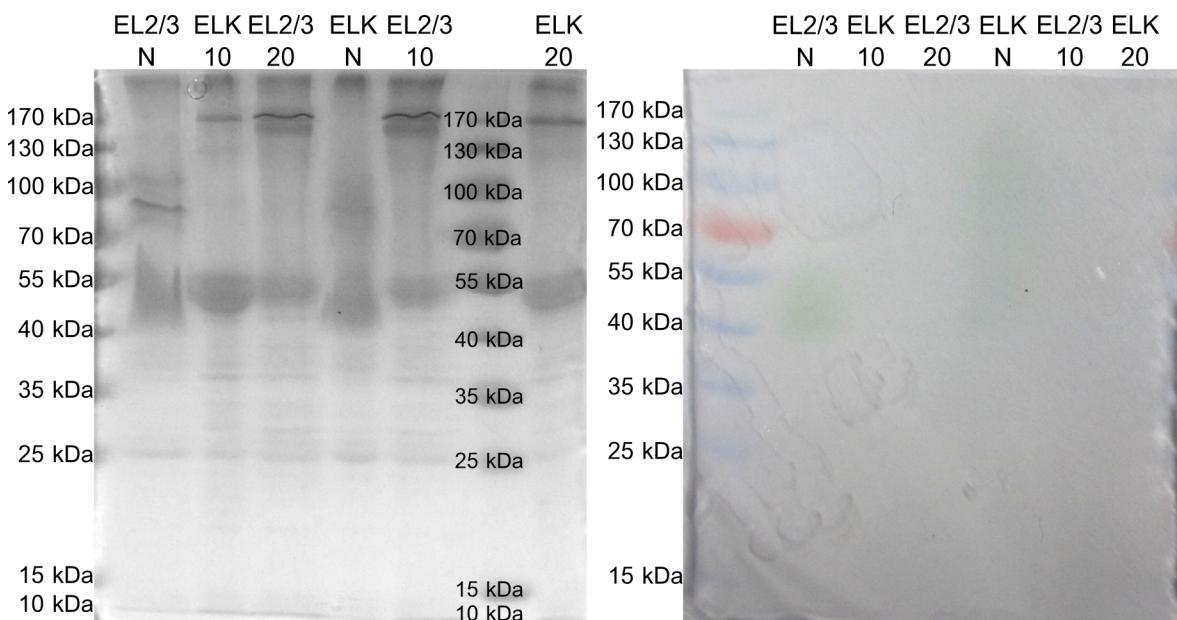
Pri analizi vzorcev GeoLacc-CHis z SDS-PAGE pri vzorcu usedline lizata nismo opazili znakov tvorbe večje količine inkluzijskih teles. Lisa pričakovane velikosti (okoli 56 kDa) je v vzorcu usedline lizata bistveno manj izstopajoča kot v prejšnjih primerih. Izraziti lisi pričakovane velikosti smo opazili pri frakciji spiranja s pufrom s 50 mM imidazolom (W50) in pri elucijski frakciji 2 (EL2). Pri prenosu western smo pozitiven signal dobili pri vseh vzorcih razen pri nevezani frakciji. Pri vzorcih W50 in EL2 smo opazili še s protitelesi označene elektroforezne lise večjih molekulskih mas – en par lis z molekulsko maso med 100 in 130 kDa in drug par lis z molekulsko maso med 130 in 170 kDa (Slika 11).

Z nekuhanimi vzorci združenih elucijskih frakcij 2 in 3 (EL2/3) ter koncentrirane elucijske frakcije z razredčenim pufrom (ELK) smo naredili cimografijo s substratom ABTS (Slika 12, desno). Poleg nekuhanih smo na gel nanesli tudi 10 ali 20 min kuhanje vzorce. Poliakrilamidni gel z enakimi vzorci smo obarvali tudi z barvilom Page Blue Protein Stain (Slika 12, levo). Kot pri GeoLacc-NHis smo lakazno aktivnost s cimografijo zaznali pri nižji molekulski masi od pričakovane. Zaznali smo jo v nekuhanih vzorcih, kar podpira predpostavko, da jo izkazuje izraženi protein. Na gelu obarvanem z barvilom Page Blue Protein Stain smo videli, da je kuhanje med obdelavo vzorca vplivalo na mobilnost proteinov in ne samo na lakazno aktivnost. V nekuhanih vzorcih, kjer smo zaznali lakazno

aktivnost, natrijev dodecil sulfat ni denaturiral proteinov in se na njih ni vezal v enakem razmerju kot pri kuhanih, zato je mobilnost lakaze drugačna. Vzorec s koncentrirano elucijsko frakcijo sicer kaže aktivnost tudi pri višji molekulski masi, kar morda pomeni oligomerizacijo lakaz v nativnem stanju v vzorcu.



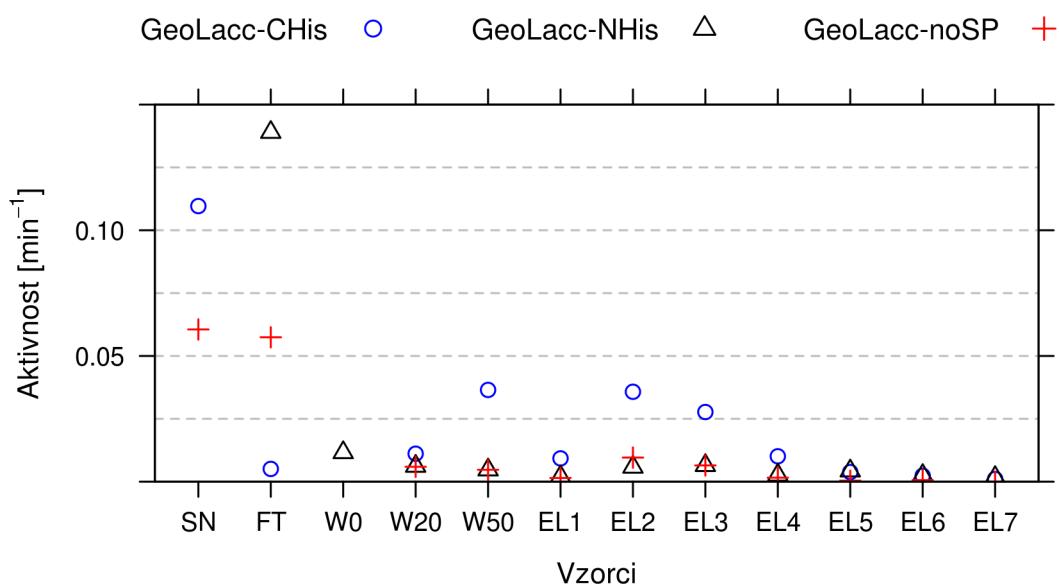
Slika 11: Analiza vzorcev GeoLacc-CHis z SDS-PAGE in prenosom western. Levo: SDS-PAGE. Desno: prenos western. Legenda: IB – usedlina lizata z inkluzijskimi telesci, SN – supernatant lizata, FT – nevezana frakcija, W20 – frakcija spiranja s pufrom W20 (z 20 mM imidazolom), W50 – frakcija spiranja s pufrom W50 (s 50 mM imidazolom), EL2 – elucijska frakcija 2.



Slika 12: Analiza vzorcev GeoLacc-CHis z SDS-PAGE in cimografijo z ABTS. Levo: poliakrilamidni gel obarvan z barvilm Page Blue Protein Stain. Desno: cimogram z ABTS. Legenda: EL2/3 – združeni elucijski frakciji 2 in 3, ELK – koncentrirane elucijske frakcije z razredčenim pufrom. Vzorci so bili pred elektroforezo kuhanji 10 min (10) ali 20 min (20) ali sploh ne (N).

4.2.4 Primerjava heterologne produkcije in izolacije različic GeoLacc

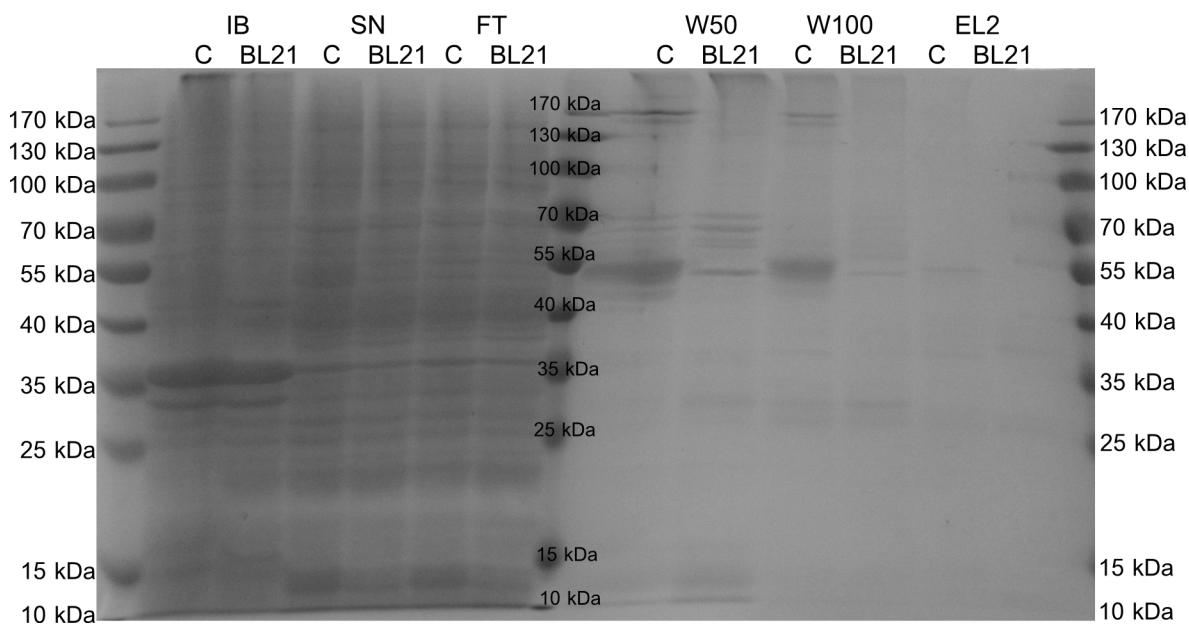
Producija in izolacija treh primerjanih različic je potekala enako; pufer za lizo je bil celični usedlini vedno dodan v enakem razmerju glede na mokro težo. Med procesiranjem biomase smo odvzeli vzorec supernatanta lizata produkcijskega seva, med izolacijo lakaz pa vzorce nevezane frakcije in frakcij spiranja z različnimi izolacijskimi pufri. Lakazno aktivnost teh frakcij smo izmerili spektrofotometrično s substratom ABTS. Aktivnost nevezane frakcije je pri GeoLacc-CHis bistveno manjša od aktivnosti pripadajočega supernatanta lizata. Aktivnost nevezane frakcije GeoLacc-noSP je skoraj enaka aktivnosti supernatanta lizata GeoLacc-noSP. Aktivnost nevezane frakcije GeoLacc-NHis je najvišja. Aktivnost frakcij W50 in elucijskih frakcij GeoLacc-CHis je bistveno večja od aktivnosti primerljivih frakcij pri izolaciji GeoLacc-NHis ali GeoLacc-noSP (Slika 13), kar kaže na to, da je konstrukt celotnega gena Gmet_2154 z zapisom za C-terminalni heksahistidinski označevalec najprimernejši za produkcijo tega encima.



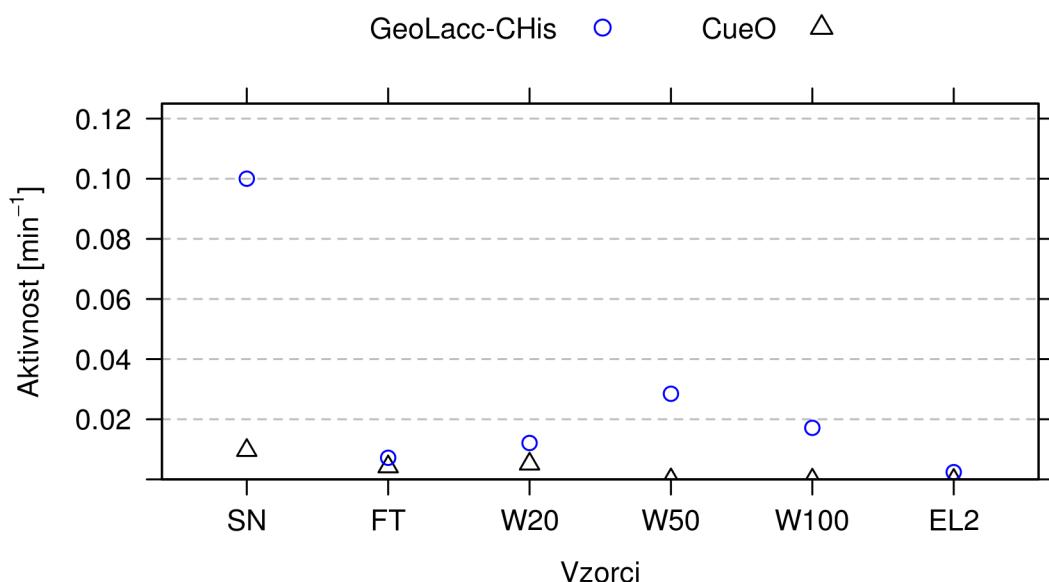
Slika 13: Primerjava lakazne aktivnosti različnih vzorcev odvzetih med procesiranjem biomase in izolacijo heterologno proizvedenih različic lakaze. Aktivnost ob oksidaciji substrata ABTS je izražena kot sprememba absorbance pri 420 nm v času. Legenda: SN – supernatant lizata, FT – nevezana frakcija, W0 – frakcija spiranja s pufrom za lizo, W20 – frakcija spiranja s pufrom W20 (z 20 mM imidazolom), W50 – frakcija spiranja s pufrom W50 (s 50 mM imidazolom), EL1-EL7 – elucijske frakcije od 1 do 7.

4.2.5 Kontrola gostiteljske lakaze

Gostiteljska bakterija *Escherichia coli* vsebuje gen za lakazo CueO, ki se izraža v prisotnosti bakra (Kim in sod., 2001). Ker bi bila prisotnost drugih lakaz poleg heterologno proizvedenih moteča, smo naredili negativno kontrolo produkcije. V enakem gojišču in pri enakih pogojih kot produkcijske seve (stresanje pri 180 RPM pri 37 °C, 4 h stresanja po dodatku 0,85 mM IPTG) smo gojili netransformiran gostiteljski sev *E. coli* BL21(DE3)pLysE in biomaso procesirali enako kot ostale. Izvedli smo izolacijo z Ni-NTA z dodanim korakom spiranja s pufom s 100 mM imidazolom. SDS-PAGE (Slika 14) in spektrofotometrične meritve encimske aktivnosti vzorcev (Slika 15) smo primerjali z vzporedno proizvedeno in izolirano lakazo GeoLacc-CHis. Primerjava elektroforeznih lis netransformiranega seva BL21 in produkcijskega seva je pokazala, kateri proteini izvirajo iz gostitelja in katere lise predstavljajo heterologno proizvedeno lakazo. Nekateri proteini gostitelja so podobnih velikosti kot GeoLacc-CHis (območje od 40 do 70 kDa). Tudi elektroforezne lise velikosti okoli 35 in 25 kDa so proteini gostiteljskega izvora. Pri vzorcih netransformirane bakterije ni elektroforeznih lis velikosti med 130 in 170 kDa, ki jih lahko vidimo pri vzorcih GeoLacc-CHis (Slika 14). Supernatant lizata netransformiranega seva BL21 je kazal okoli 10-krat manjšo lakazno aktivnost kot enak vzorec produkcijskega seva. V vseh primerih je bila aktivnost vzorcev netransformiranega seva BL21 manjša od aktivnosti vzorcev produkcijskega seva, pri frakcijah spiranja s pufri W50 in W100 ter eluatu pa je bila zanemarljiva oziroma nezaznavna (Slika 15). Nativna lakaza gostiteljskega seva tako ne vpliva na naše meritve heterologno izražene lakaze GeoLacc-CHis.



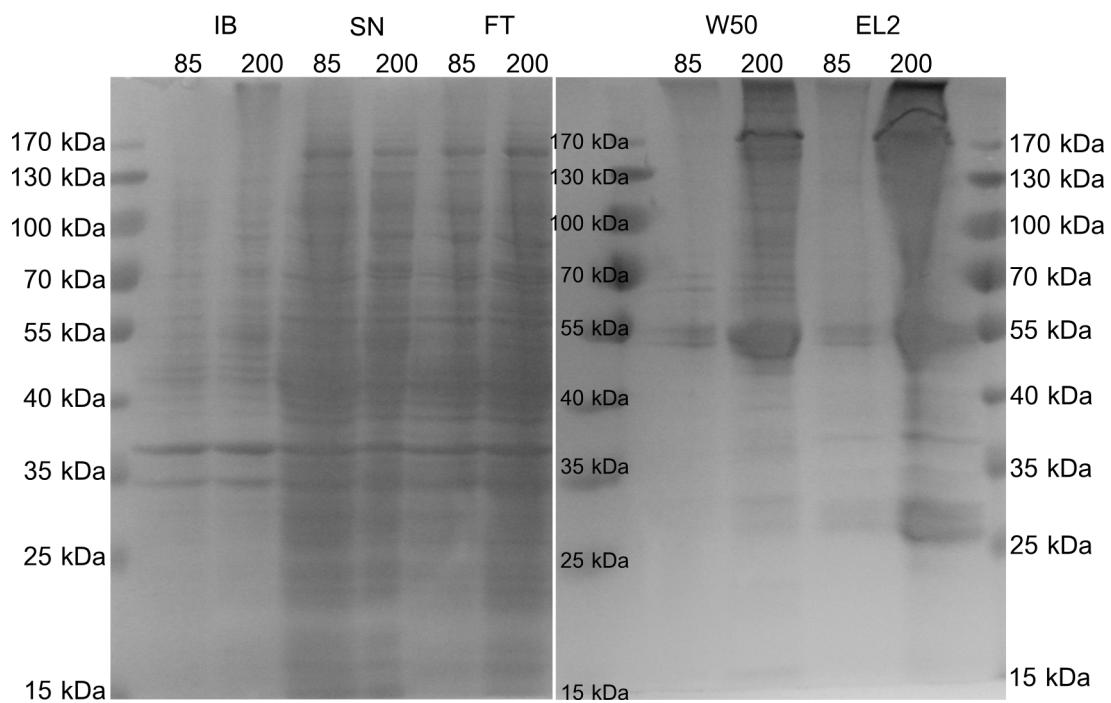
Slika 14: SDS-PAGE analiza vzorcev iz produkcije in izolacije GeoLacc-CHis in netransformirane gostiteljskega seva *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Legenda: C – GeoLacc-CHis, BL21 – netransformirana gostiteljska sev, IB – vzorec usedline lizata z inkluzijskimi telesci, SN – supernatant lizata, FT – nevezana frakcija, W50 - frakcija spiranja s pufrom W50 (s 50 mM imidazolom), W100 - frakcija spiranja s pufrom W100 (s 100 mM imidazolom), EL2 – elucijska frakcija 2.



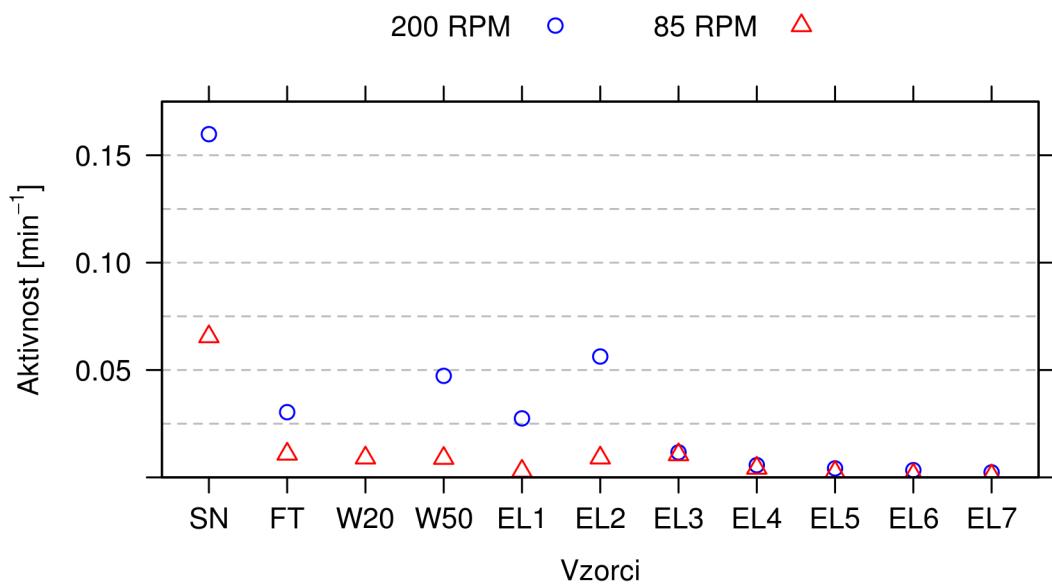
Slika 15: Primerjava lakazne aktivnosti vzorcev produkcije in izolacije GeoLacc-CHis in netransformirane gostiteljskega seva *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Legenda: SN – supernatant lizata, FT – nevezana frakcija, W20 – frakcija spiranja s pufrom W20 (20 mM imidazol), W50 – frakcija spiranja s pufrom W50 (50 mM imidazol), W100 - frakcija spiranja s pufrom W100 (s 100 mM imidazolom), EL2 – elucijska frakcija 2.

4.2.6 Vpliv hitrosti mešanja na prekonočno produkcijo GeoLacc-CHis

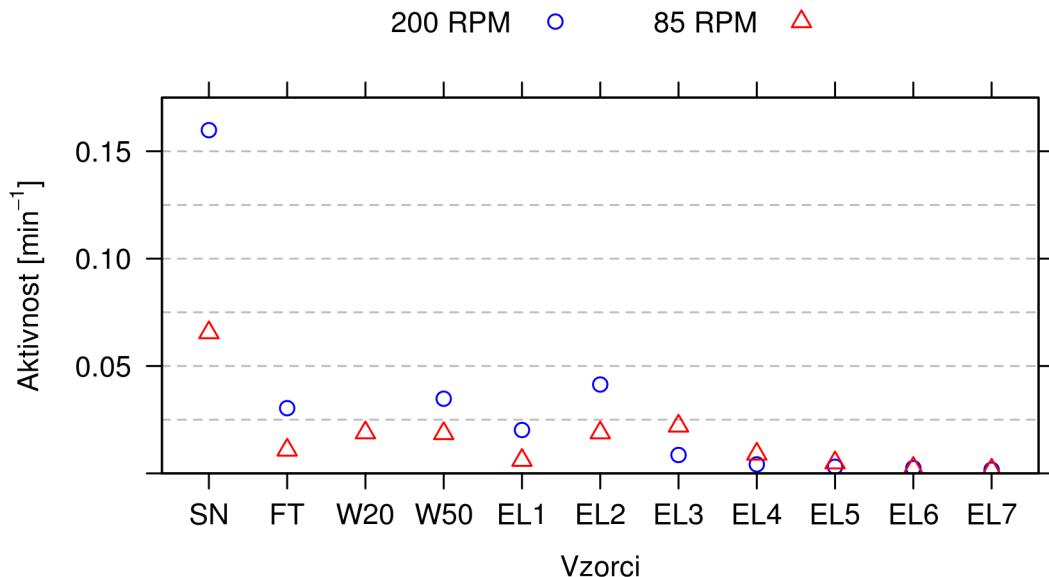
Durão in sod. (2008) so poročali o 80-krat večji akumulaciji bakra pri *E. coli* gojeni v mikroaerobnih pogojih (oz. brez mešanja) kot pri *E. coli* gojeni v aerobnih pogojih. Morebitni vpliv tega pojava v primeru produkcije GeoLacc-CHis smo preverili tako, da smo primerjali lakazno aktivnost vzorcev kultur, od katere smo eno po indukciji z 0,6 mM IPTG prekonočno gojili pri sobni temperaturi in hitrosti mešanja 85 RPM, drugo pa pri hitrosti mešanja več kot 200 RPM. Mešanje pri 85 RPM je minimalno in le prepreči usedanje celic na dno. Prekonočna inkubacija je trajala 15 ur. Opazna je bila razlika v količini proizvedene biomase, saj je kultura gojena pri 85 RPM vsebovala 0,48 g mokre biomase, kultura gojena pri 200 RPM pa 1,36 g. Med procesiranjem biomase in izolacijo lakaze z Ni-NTA agarozo smo jemali vzorce, ki smo jih analizirali z SDS-PAGE (Slika 16). Elektroforezne lise GeoLacc-CHis so pri vzorcih izolatov iz kulture gojene pri 200 RPM močnejše, več pa je tudi nečistoče velikosti med 25 in 30 kDa pri elucijski frakciji. Lakazno aktivnost odvzetih vzorcev smo primerjali spektrofotometrično (Slika 17). Če aktivnosti izolacijskih frakcij standardiziramo na g biomase, se razlike med vzorci iz hitreje in počasneje mešane kulture zmanjšajo, vendar so aktivnosti vzorcev iz hitreje mešane kulture skupaj še vedno nekoliko večje (Slika 18). Zaključimo lahko, da upočasnjenja hitrost mešanja produkcijskega seva in s tem mikroaerofilni pogoji niso bistveno izboljšali heterologne produkcije GeoLacc-CHis.



Slika 16: SDS-PAGE analiza vzorcev iz prekonočne produkcije (pri 85 RPM ali 200 RPM) in izolacije GeoLacc-CHis iz tako nagojene biomase. 85 – biomasa gojena prekonočno pri sobni temperaturi in 85 RPM, 200 – biomasa gojena prekonočno pri sobni temperaturi in več kot 200 RPM, IB – vzorec usedline lizata z inkluzijskimi telesci, SN – vzorec supernatanta lizata, FT – vzorec nevezane frakcije, W50 - frakcija spiranja s pufrom W50 (s 50 mM imidazolom), EL2 – elucijska frakcija 2.



Slika 17: Primerjava lakazne aktivnosti vzorcev procesiranja biomase in izolacije GeoLacc-CHis iz biomase gojene prekonočno pri 85 RPM ali 200 RPM. SN – supernatant lizata, FT – nevezana frakcija, W20 – frakcija spiranja z 20 mM imidazolom, W50 – frakcija spiranja s 50 mM imidazolom, EL1-EL7 – elucijske frakcije od 1 do 7.



Slika 18: Primerjava lakazne aktivnosti vzorcev procesiranja biomase in izolacije GeoLacc-CHis iz biomase gojene prekonočno pri 85 RPM ali 200 RPM z aktivnostmi vseh izolacijskih frakcij (od W20 do EL7) standardiziranimi na biomaso. SN – supernatant lizata, FT – nevezana frakcija, W20 – frakcija spiranja z 20 mM imidazolom, W50 – frakcija spiranja s 50 mM imidazolom, EL1-EL7 – elucijske frakcije od 1 do 7.

4.3 ENCIMSKA KARAKTERIZACIJA LAKAZE *Geobacter metallireducens* GeoLacc-CHis

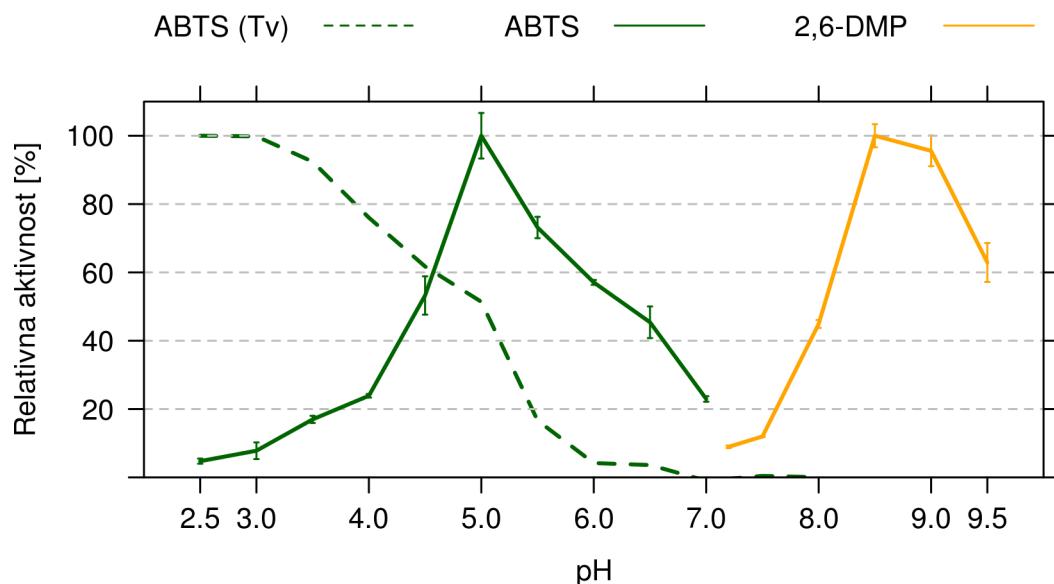
4.3.1 pH optimum GeoLacc-CHis

Ker se optimalni pH za aktivnost lakaze razlikuje od substrata do substrata, smo spektrofotometrično določili pH optimuma za oksidacijo ABTS in 2,6-dimetoksifenola (DMP). Prvi je nefenolna spojina, drugi pa je substituiran fenol.

Optimalni pH za oksidacijo ABTS z GeoLacc-CHis je pH 5,0, kar je višje od pH optimuma lakaze *Tv* glive *Trametes versicolor* (Slika 19). Podatki o pH profilu oksidacije ABTS z lakazo *Tv*, ki so prikazani na sliki 19, so bili pridobljeni predhodno (Luka Ausec, neobjavljeno) in so vključeni v sliko zaradi primerjave. V območju pH od 4,5 do 6,5 je aktivnost približno 50 % optimalne ali več. Aktivnost pri pH 4,0 je primerljiva z aktivnostjo pri pH 7,0, kjer je aktivnost le še okoli 25 % optimalne. Aktivnost pri pH 2,5 pada na manj kot 5 %.

Pri določanju optimalne pH vrednosti za oksidacijo 2,6-DMP smo uporabili Tris pufre med pH 7,2 in 9,5 brez CuSO₄, saj 2,6-DMP v njegovi prisotnosti neencimsko oksidira, in encimsko frakcijo W100. 10 mM 2,6-DMP je bil predhodno pripravljen v 10% etanolu. Optimalni pH za oksidacijo 2,6-DMP je 8,5 ali 9,0, saj ni statistično značilne razlike med

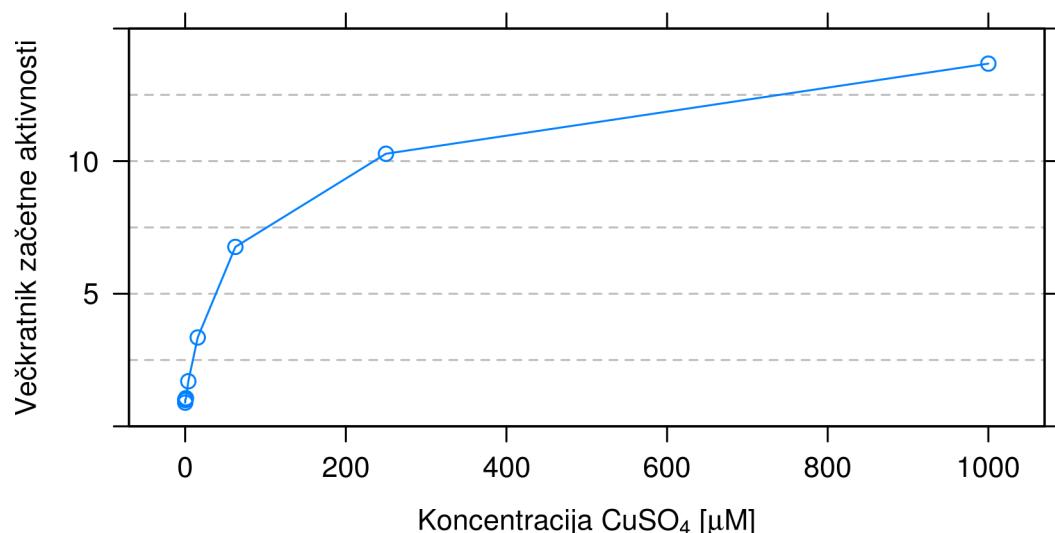
aktivnostma pri teh vrednostih. Lakaza GeoLacc-CHis je znatno aktivna tudi pri višjih pH vrednostih. Pri pH 9,5 je namreč aktivna več kot 60 %. Pri pH vrednostih nižjih od optimalne aktivnost močno pada. Pri pH 8,0 je manjša od 50 %, pri pH 7,5 pa le še okoli 10 % (Slika 19).



Slika 19: Relativna aktivnost GeoLacc-CHis pri oksidaciji ABTS in 2,6-DMP v odvisnosti od pH. Povprečna vrednost vrha posamezne krivulje za to krivuljo predstavlja 100%. Napake so predstavljene s standardnimi deviacijami. Za merjenje oksidacije ABTS smo uporabili citrat-fosfatne pufre s pH vrednostmi med 2,5 in 7,0 s korakom 0,5, za 2,6-DMP pa Tris pufre z vrednostmi pH 7,2 in od pH 7,5 do 9,5 s korakom 0,5. Meritve z ABTS so bile opravljene v prisotnosti 0,8 mM CuSO₄. Za primerjavo je prikazan pH profil oksidacije ABTS z lakazo glive *Trametes versicolor* (ABTS (T_v)). Merske napake so podane s standardno deviacijo (N = 3).

4.3.2 Vpliv CuSO₄ na aktivnost GeoLacc-CHis

Ker so bakrovi atomi v aktivnem mestu encima ključni za aktivnost lakaz, smo preverili vpliv prisotnosti bakrovega sulfata na lakazno aktivnost v koncentracijskem območju od 0 mM CuSO₄ do 1 mM CuSO₄. Območje smo zaobsegli z redčitveno vrsto z redčitvenim faktorjem 4 začenjši z 2 mM raztopino CuSO₄, ki smo jo ustrezno redčili s pufrom. Pri teh meritvah smo uporabili eno od elucijskih frakcij GeoLacc-CHis. Naraščanje aktivnosti GeoLacc-CHis, ki se začne pri koncentraciji bakrovega sulfata 3,9 µM (70 % povečanje aktivnosti), poteka kot logaritemska funkcija koncentracije bakrovega sulfata v reakcijski mešanici. Prisotnost 250 µM bakrovega sulfata v reakcijski mešanici aktivnost poveča okoli 10-krat, 1000 µM pa skoraj 14-krat (Slika 20). Zaradi očitnega vpliva CuSO₄ na aktivnost smo ga za jačanje signala dodajali v vse reakcijske mešanice za karakterizacijo encima, kjer smo kot substrat uporabljali ABTS. Končna koncentracija CuSO₄ je bila v teh reakcijskih mešanicah običajno 0,8 mM.

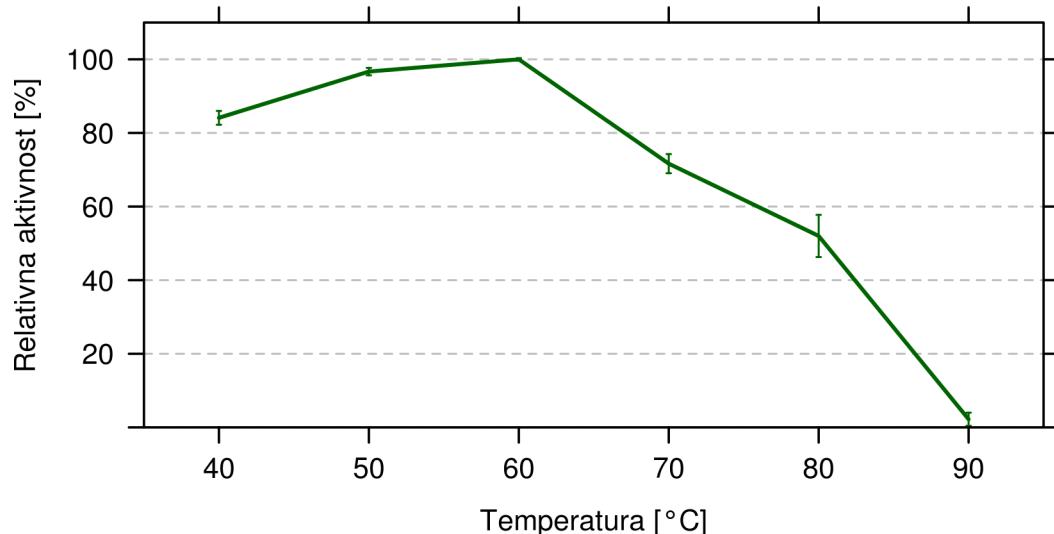


Slika 20: Aktivnost GeoLacc-CHis v odvisnosti od koncentracije bakrovega sulfata v reakcijski mešanici v območju od 0 do 1000 µM. Aktivnosti so podane kot večkratnik aktivnosti v odsotnosti bakrovega sulfata.

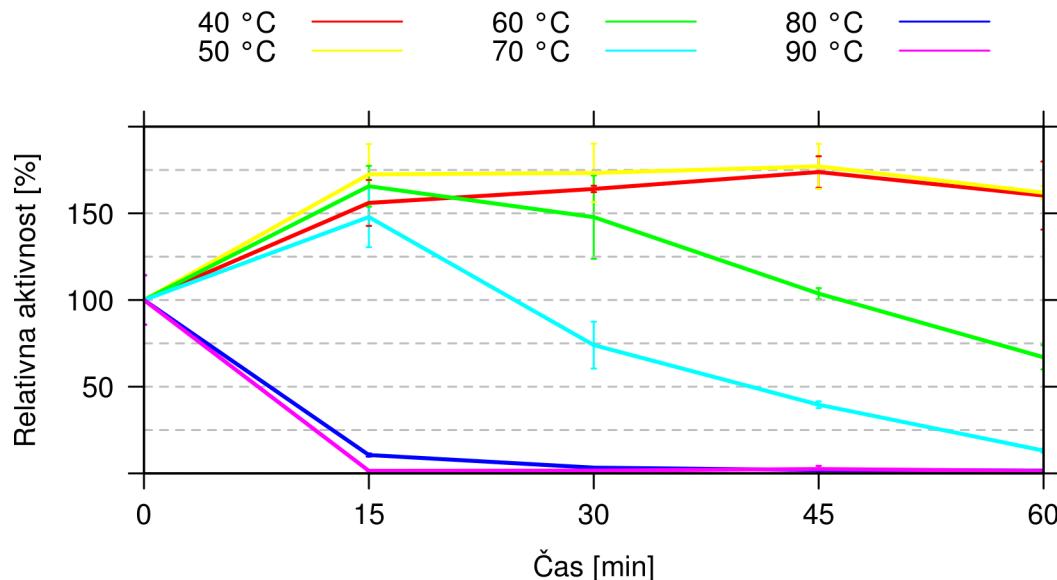
4.3.3 Vpliv temperature na aktivnost GeoLacc-CHis

Temperaturni optimum smo določili s spektrofotometričnim merjenjem oksidacije ABTS ob dodatku encima pri različnih temperaturah. Meritve so pokazale, da je temperaturni optimum GeoLacc-CHis pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, skoraj tolikšno aktivnost pa smo izmerili tudi pri $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aktivnost se pri $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ razpolovi, pri $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa je aktivnost zanemarljiva (Slika 21).

Rezidualna aktivnost encima (t. j. preostala aktivnost encima) je po segrevanju za 15 min na temperaturo od 40 do $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ dejansko večja od začetne aktivnosti izmerjene v času 0 min, ki predstavlja 100% (Slika 22). Povišanje aktivnosti je pri segrevanju na 40 ali $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ opazno tudi po 60 min segrevanju, ko je rezidualna aktivnost povprečno še vedno okoli 50 % višja od prvotne. Po izpostavitvi $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ za 45 min se aktivnost spusti na raven prvotne, pri 60 min pa pade na manj kot 75 %, kar kaže na propadanje encima pri tej temperaturi. Pri temperaturi $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ je rezidualna aktivnost manjša od prvotne že po 30 min, ko pade na približno 75 %, pri 60 min pa je rezidualna aktivnost le še okoli 13 %. Pri $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aktivnost že po 15 min pade na okoli 10 %, pri $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa je zanemarljiva (Slika 22).



Slika 21: Začetna aktivnost GeoLacc-CHis pri temperaturah med 40 in $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Temperaturni optimum je pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Interval med meritvami je $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aktivnosti so podane kot odstotek aktivnosti pri temperaturnem optimumu. Merske napake so podane s standardno deviacijo ($N = 3$).



Slika 22: Rezidualna aktivnost GeoLacc-CHis po inkubaciji pri temperaturah med 40 in 90 °C za 15, 30, 45 ali 60 min. Aktivnosti so podane kot odstotek aktivnosti encima pri sobni temperaturi pred inkubacijo. Merske napake so podane s standardno deviacijo ($N = 3$).

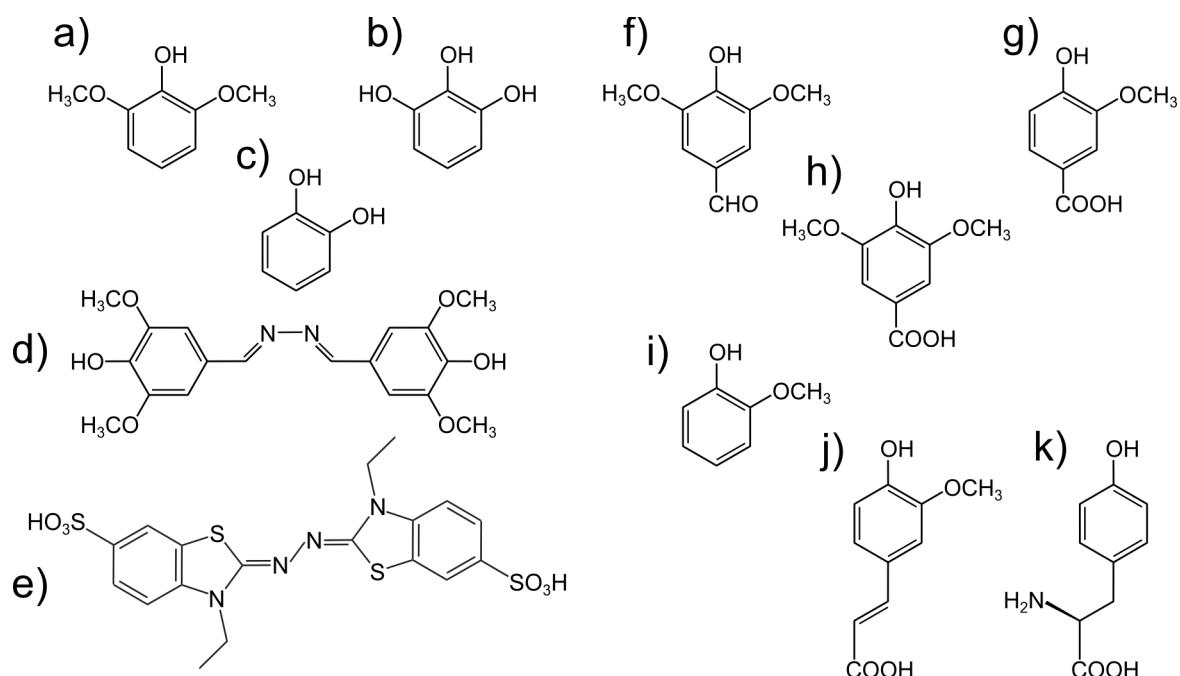
4.3.4 Substrati GeoLacc-CHis

4.3.4.1 Razpon substratov

Preizkusili smo 12 različnih potencialnih substratov za lakaze (Preglednica 26). Njihovo oksidacijo smo spremljali spektrofotometrično pri ustreznih valovnih dolžinah (Preglednica 24) pri pH vrednostih med 4,5 in 8,0. Zaznali smo oksidacijo substituiranih fenolnih spojin 2,6-DMP, pirogalola, katehola in siringaldazina. Zaznali smo tudi oksidacijo nefenolnih spojin ABTS in $K_4[Fe(CN)_6]$, ne pa oksidacije gvajakola in fenolnih spojin *p*-substituiranih z aldehidno skupino ali daljšimi stranskimi verigami (Slika 23).

Preglednica 26: Preizkušeni substrati s kvalitativno oceno sposobnosti njihove oksidacije z GeoLacc-CHis. Ocena je bila pridobljena na podlagi spektrofotometričnih meritev. ΔA : + (sprememba absorbance zaznana), - (sprememba absorbance ni zaznana).

Substrat	ΔA	Substrat	ΔA
ABTS	+	siringaldehid	-
2,6-DMP	+	siringična kislina	-
katehol	+	gvajakol	-
pirogalol	+	vanilinska kislina	-
siringaldazin	+	ferulična kislina	-
$K_4[Fe(CN)_6]$	+	tirozin	-

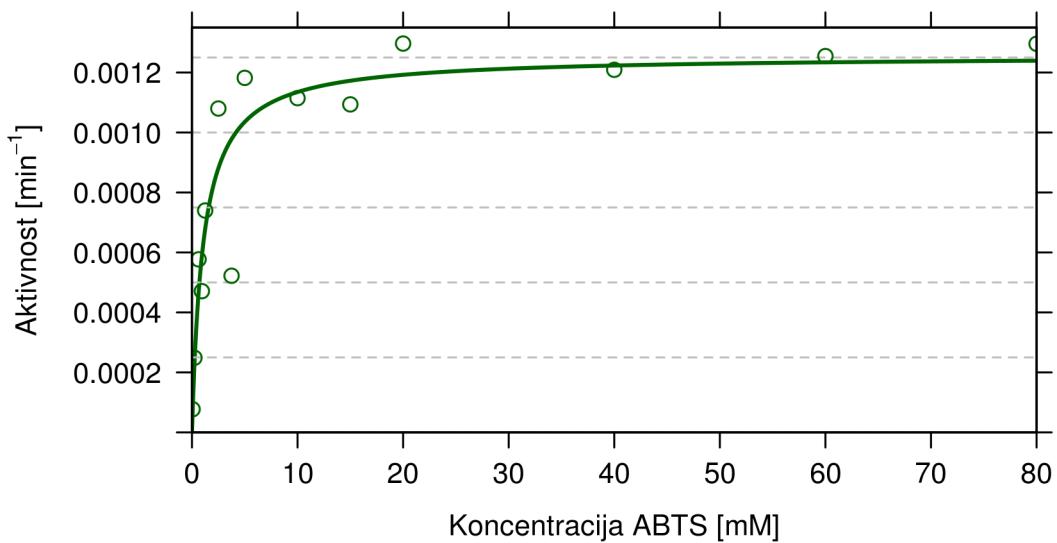


Slika 23: Strukturne formule preizkušenih substratov. a) 2,6-DMP, b) pirogalol, c) katehol, d) siringaldazin, e) ABTS, f) siringaldehid, g) vanilinska kislina, h) siringična kislina, i) gvajakol, j) ferulična kislina, k) tirozin.

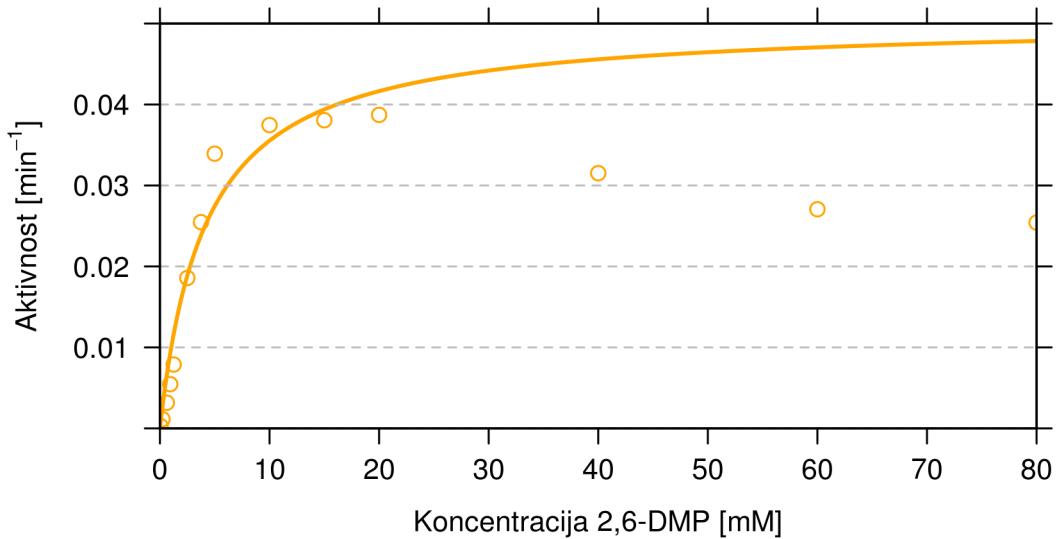
4.3.4.2 Kinetika oksidacije ABTS in 2,6-DMP

Na podlagi meritev odvisnosti lakazne aktivnosti GeoLacc-CHis od koncentracije ABTS smo lahko za posamezne krivulje privzeli Michaelis-Menten kinetiko in ocenili vrednost Michaelis-Mentenove konstante K_m (Slika 24). Povprečna vrednost 9 meritev K_m s standardno deviacijo je za ABTS $1,29 \pm 1,02$ mM. Če odstranimo dva osamelca, ki sta najbrž posledica eksperimentalne napake, je povprečna vrednost K_m s standardno deviacijo enaka $0,85 \pm 0,25$ mM.

Če v koncentracijskem območju pod 20 mM 2,6-DMP privzamemo kinetiko po Michaelis-Menten, lahko ocenimo K_m s standardno deviacijo za 2,6-DMP pri GeoLacc-CHis na $1,55 \pm 0,56$ mM. Ustreznost kinetike Michaelis-Menten je v primeru 2,6-DMP vprašljiva, saj je aktivnost najvišja pri koncentracijah med 15 in 20 mM 2,6-DMP, pri višjih koncentracijah pa pada (Slika 25).



Slika 24: Reprezentativen graf aktivnosti GeoLacc-CHis v odvisnosti od koncentracije substrata ABTS [mM]. Če smo točkam s programom R priredili kinetiko Michaelis-Menten, smo dobili krivuljo, prikazano s polno črto, in parameter K_m .

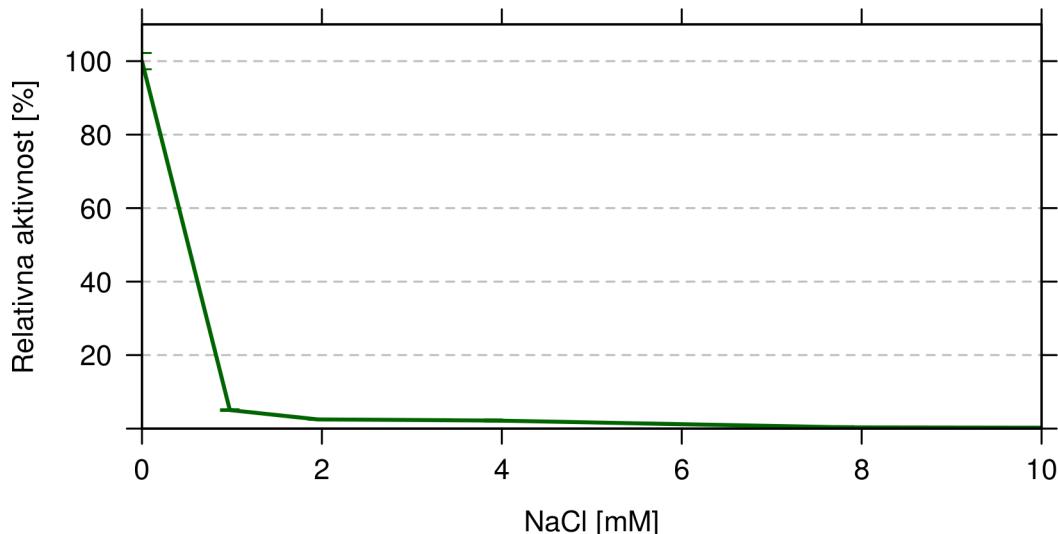


Slika 25: Reprezentativen graf aktivnosti GeoLacc-CHis v odvisnosti od koncentracije substrata 2,6-DMP [mM]. Hitrost oksidacije 2,6-DMP pada, če višamo njegovo koncentracijo nad 20 mM, kar ne kaže klasičnega obnašanja po kinetiki Michaelis-Menten. Če smo kljub temu aktivnostim pri 20 mM 2,6-DMP in nižjih koncentracijah s programom R priredili kinetiku Michaelis-Menten, smo dobili krivuljo, prikazano s polno črto, in parameter K_m .

4.3.5 Inhibicija lakaze

4.3.5.1 Inhibicija GeoLacc-CHis z NaCl

NaCl močno inhibira GeoLacc-CHis. Že prisotnost 0,98 mM NaCl aktivnost zmanjša na okoli 5 % prvotne aktivnosti. Pri koncentraciji 7,8 mM NaCl aktivnost pade pod 1 % prvotne, pri višjih koncentracijah pa je aktivnost prav tako zanemarljiva (Slika 26).



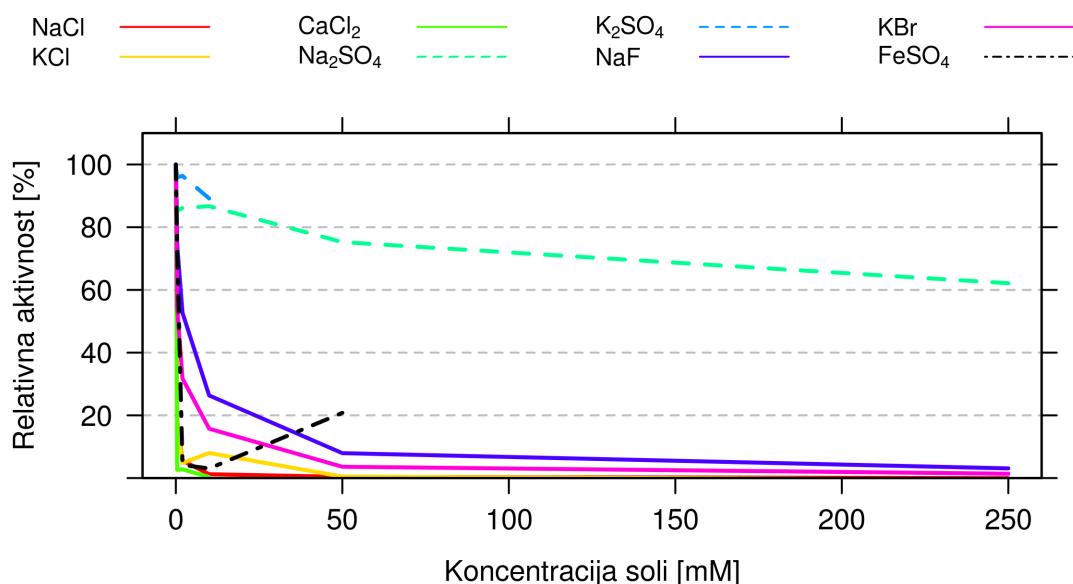
Slika 26: Hitrost oksidacije 10 mM ABTS z GeoLacc-CHis v odvisnosti od koncentracije NaCl. Prikazana je aktivnost v koncentracijskem območju NaCl od 0 do 10 mM. Merske napake so prikazane s standardno deviacijo ($N = 3$).

4.3.5.2 Inhibicija GeoLacc-CHis z različnimi solmi

Preizkusili smo tudi vpliv drugih soli poleg NaCl na aktivnost GeoLacc-CHis. Oksidacijo ABTS smo izmerili v nekaj minutah po dodatku encima v reakcijske mešanice, ki so vsebovale različne soli. Aktivnost smo merili v prisotnosti različnih halogenidov, sulfatov in železovih ionov. Med preizkušenimi halogenidi so bili NaCl, KCl, CaCl₂, NaF in KBr. CaCl₂ zaradi večjega molarnega deleža kloridnih ionov bolj inhibira lakazo kot NaCl in KCl. Pri koncentraciji 10 mM CaCl₂ je bila aktivnost samo še 0,33 % prvotne, pri višjih koncentracijah pa je prišlo doobarjanja in meritven niso bile možne. KBr je bil naslednji najmočnejši inhibitor, NaF pa je med njimi GeoLacc-CHis inhibiral najmanj. V vseh primerih je 50 mM sol aktivnost znižala pod 10 % (Slika 27).

Raztopini natrijevega in kalijevega sulfata sta delovali manj inhibitorno kot raztopine soli

halogenidov. Merjenje s kalijevim sulfatom ni bilo možno pri koncentracijah višjih od 10 mM. Natrijev sulfat je pri 0,4 mM deloval inhibitorno, saj je aktivnost znižal na okoli 85 %, medtem ko je kalijev sulfat zelo malo vplival na aktivnost in je možno, da gre za napako. Z višanjem koncentracije je natrijev sulfat aktivnost zmanjševal do okoli 60 % pri koncentraciji 250 mM. Železov(II) sulfat je pri nižjih koncentracijah deloval inhibitorno, saj je 0,4 mM železov(II) sulfat aktivnost zmanjšal na okoli 75 %, 2 mM in 10 mM pa na manj kot 5 %. Pri koncentraciji 50 mM aktivnost spet naraste na okoli 20 % (Slika 27).



Slika 27: Vpliv različnih soli na aktivnost GeoLacc-CHis. Preizkusili smo vpliv halogenidov (NaCl, KCl, CaCl₂, NaF in KBr) in sulfatov (Na₂SO₄, K₂SO₄, FeSO₄). Meritve so bile izvedene pri 0 mM, 0,4 mM, 2,0 mM, 10 mM, 50 mM in 250 mM koncentracijah soli, razen pri CaCl₂ in K₂SO₄, kjer je prišlo do obarjanja pri koncentracijah višjih od 10 mM, in FeSO₄, kjer je prišlo do obarjanja pri koncentraciji višji od 50 mM. Aktivnosti so podane kot odstotki aktivnosti lakaze v odsotnosti soli.

4.4 BIOINFORMATSKA ANALIZA LAKAZ *Geobacter metallireducens* GS-15

Lakazni gen Gmet_2154 je eden od 5 lakaznih genov, ki so jih Ausec in sod. (2011) s skritimi modeli Markova identificirali v genomu bakterije *Geobacter metallireducens* GS-15. Dva od njih, Gmet_2163 in Gmet_2165, kodirata neobičajno velika lakazam podobna proteina s 1094 oziroma 1201 aminokislinami. GeoLacc, produkt gena Gmet_2154, ki smo ga izrazili v pričujočem delu, je s 515 aminokislinami najmanjša lakaza kodirana v genomu *G. metallireducens* GS-15. Predvideni produkt gena Gmet_2155, ki se nahaja direktno navzgor od Gmet_2154, je velik 707 aminokislin, produkt Gmet_2583 pa 734 aminokislin. Genomska analiza je pokazala, da se lakazni gen Gmet_2154 skupaj s tremi drugimi domnevnnimi lakaznimi geni (Gmet_2155, Gmet_2163 in Gmet_2165) nahaja na 300 kb genomskem otoku, ki vsebuje 244 genov, med njimi gene za katabolizem aromatskih

spojin (Butler in sod., 2007).

4.4.1 Primerjava zaporedja Gmet_2154 z zaporedji v podatkovnih bazah z algoritmom BLAST

Z algoritmom blastn smo v nukleotidni podatkovni bazi na spletni strani NCBI našli štiri nukleotidna zaporedja podobna genu Gmet_2154, kjer poravnava obsega večino zaporedja. Več podobnih zaporedij najdemo na aminokislinskem nivoju z algoritmom blastp, saj ima 6 zadetkov z aminokislinskim zaporedjem GeoLacc identičnost večjo od 40 %. Med lakazami z znano kristalno strukturo je lakazi Gmet_2154 najbolj podobna (49,6 % podobnost) tista iz bakterije *Thermus thermophilus* HB27, ki mu je tudi najbolj podobna od vseh do zdaj okarakteriziranih bakterijskih lakaz z znanim aminokislinskim zaporedjem. Podobnost s CueO in CotA je okoli 40 % ali manj, identičnost pa nižja od 25 %. Podobnostmi z različnimi bakterijskimi lakazami so povzete v Preglednici 27.

Orodja za iskanje signalnih peptidov pri GeoLacc, homologih in nekaterih znanih bakterijskih lakazah najdejo signalne peptide, vendar točni rezultati oziroma dolžine predvidenih signalnih peptidov niso medsebojno skladni. GeoLacc naj bi imel signalni peptid dolg med 24 in 33 aminokislin. Najboljše rezultate sta dali zaporedji domnevnih homologov iz bakterij rodu *Anaeromyxobacter*, kjer se strinjajo rezultati dveh orodij za iskanje signalnih peptidov, in zaporedje lakaze CueO iz *E. coli*, kjer se strinjajo rezultati vseh uporabljenih orodij (Preglednica 28).

Iskanje ohranjenih domen pri produktu GeoLacc z aplikacijo CDD (Marchler-Bauer in Bryant, 2004; Marchler-Bauer in sod., 2009; Marchler-Bauer in sod., 2011) pokaže prisotnost treh domen značilnih za oksidaze z več atomi bakra, zato predvidevamo, da gre za trodomensko lakazo. Mutacija V208A, ki je nastala med kloniranjem GeoLacc-noSP, naj bi se nahajala na koncu prve kupredoksinski-podobne domene. Po Jpred3 (Cole in sod., 2008) sodeč naj bi bila zamenjana aminokislina v eni od β -plošč. GeoLacc ne vsebuje odseka aminokislin 363-387, ki pri CueO sestavlja z metioninom bogato vijačnico. Blizu N-konca za domnevnim signalnim peptidom vsebuje območje nizke kompleksnosti bogato z glicinom in metioninom, ki ni prisotno pri nobeni okarakterizirani lakazi, so pa podobna območja prisotna pri nekaterih homologih v Preglednici 27. Podobnost je najbolj jasna pri homologu iz seva *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5, pa tudi pri tistih, ki so bili identificirani pri sevih *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 in *Hydrogenivirga* sp. 128-5-R1-1.

Preglednica 27: Identičnost in podobnost GeoLacc s homologi in nekaterimi okarakteriziranimi bakterijskimi lakazami na nivoju aminokislinskega zaporedja. Podane so vrednosti E, ki jih poda BLAST za vsak rezultat po preiskovanju nukleotidne (n) in proteinske (p) podatkovne baze. Če je vrednost E nižja od 0,02, je zadetek verjetno homolog zaporedja, s katerim smo preiskovali bazo. Gen GeomeDRAFT_1671 seva *Geobacter metallireducens* RCH-3 je identičen Gmet_2154. Identičnost in podobnost sta bili ugotovljeni z orodjem Needle.

Lakaza (akcesijska št. prot.)	Organizem	E (n)	E (p)	Identičnost [%]	Podobnost [%]
GeomeDRAFT_1671 (EHP86727)	<i>Geobacter metallireducens</i> RCH-3	/	0	100	100
Geob_2580 (YP_002538032)	<i>Geobacter daltonii</i> FRC-32	1e-144	0	61,2	74,4
MCA1101 (YP_113571)	<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath	4e-99	0	53,7	67,0
A2cp1_3367 (YP_002493767)	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	1e-61	4e-130	44,8	60,0
Anae109_1602 (YP_001378790)	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5	1e-55	1e-161	51,6	66,7
HG1285_08376 (WP_008287876)	<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-1	/	4e-137	45,6	62,0
TTC1370 (YP_005339)	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	/	/	35,2	49,6
CotA (AAB62305)	<i>Bacillus subtilis</i>	/	/	23,2	35,4
CUEO_ECOLI (P36649)	<i>Escherichia coli</i>	/	/	24,8	39,7

Preglednica 28: Prisotnost signalnih peptidov in motivov pri GeoLacc, njegovih homologih in nekaterih okarakteriziranih lakazah. Številke pomenijo dolžino signalnega peptida, “/” pa negativen rezultat. V prvem stolpcu TatP1.0 je podano mesto, kjer se začne signalni prepoznavni motiv za TAT pot. Pri TatP1.0 in SignalP4.1 so navedena aminokislinska zaporedja, kjer poteka cepitev (-). GeomeDRAFT_1671 je identičen GeoLacc.

Lakaza	TatP1.0 motiv	TatP1.0	SignalP 4.1	Phobius	PolyPhobius
GeoLacc	8	33 (VRA-MM)	28 (LHA-GV)	24	31
Geob_2580	/	32 (GGG-TT)	22 (AQA-MM)	/	25
MCA1101	/	24 (AFA-DP)	/	/	/
A2cp1_3367	8	30 (ALA-RM)	30 (ALA-RM)	27	25
Anae109_1602	7	29 (ALA-QM)	29 (ALA-QM)	29	27
HG1285_08376	6	6 (VNR-RQ) ?	/	24	24
TTC1370	4	28 (SFP-EP)	22 (ARA-QG)	22	20
CotA	/	/	/	/	/
CUEO_ECOLI	3	28 (VFA-AE)	28 (VFA-AE)	28	28

4.4.2 Primerjava zaporedij ostalih domnevnih lakaznih genov *G. metallireducens* z zaporedji v podatkovnih bazah z algoritmom BLAST

Poleg homologov GeoLacc smo v proteinskih podatkovnih bazah z algoritmom blastp iskali tudi homologe produktov ostalih domnevnih lakaznih genov bakterije *G. metallireducens* (Preglednica 29). Produktu gena Gmet_2155 je najbolj podobna domnevna oksidaza z več atomi bakra bakterije *Geobacter bemandensis* Bem, med homologi pa so med drugimi tudi oksidaze z več atomi bakra bakterij rodov *Burkholderia*, *Clostridium*, *Anaeromyxobacter* in *Bacillus*.

Produktu gena Gmet_2163 (ompB) sta najbolj podobni oksidaza z več atomi bakra tipa 2 iz bakterije *Geobacter metallireducens* RCH3 in oksidaza z več atomi bakra tipa 2 iz bakterije *Bacillus sp.* 1NLA3E. Produktu Gmet_2163 sta podobna še proteina A2cp1_0965 bakterije *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 ($E = 0$) in Anae109_3108 bakterije *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5 ($E = 0$), obstajajo pa tudi homologi iz več različnih vrst rodu *Geobacter*. Med njimi so lakaza Gbem_2066 bakterije *Geobacter bemandensis* ($E = 0$), lakaza Gura_3048 bakterije *Geobacter uranireducens* Rf4, ki pokrije 94 % za lakazo izredno dolgega aminokislinskega zaporedja Gmet_2163, in OmpB v vrsti *Geobacter sulfurreducens* PCA ($E = 0$).

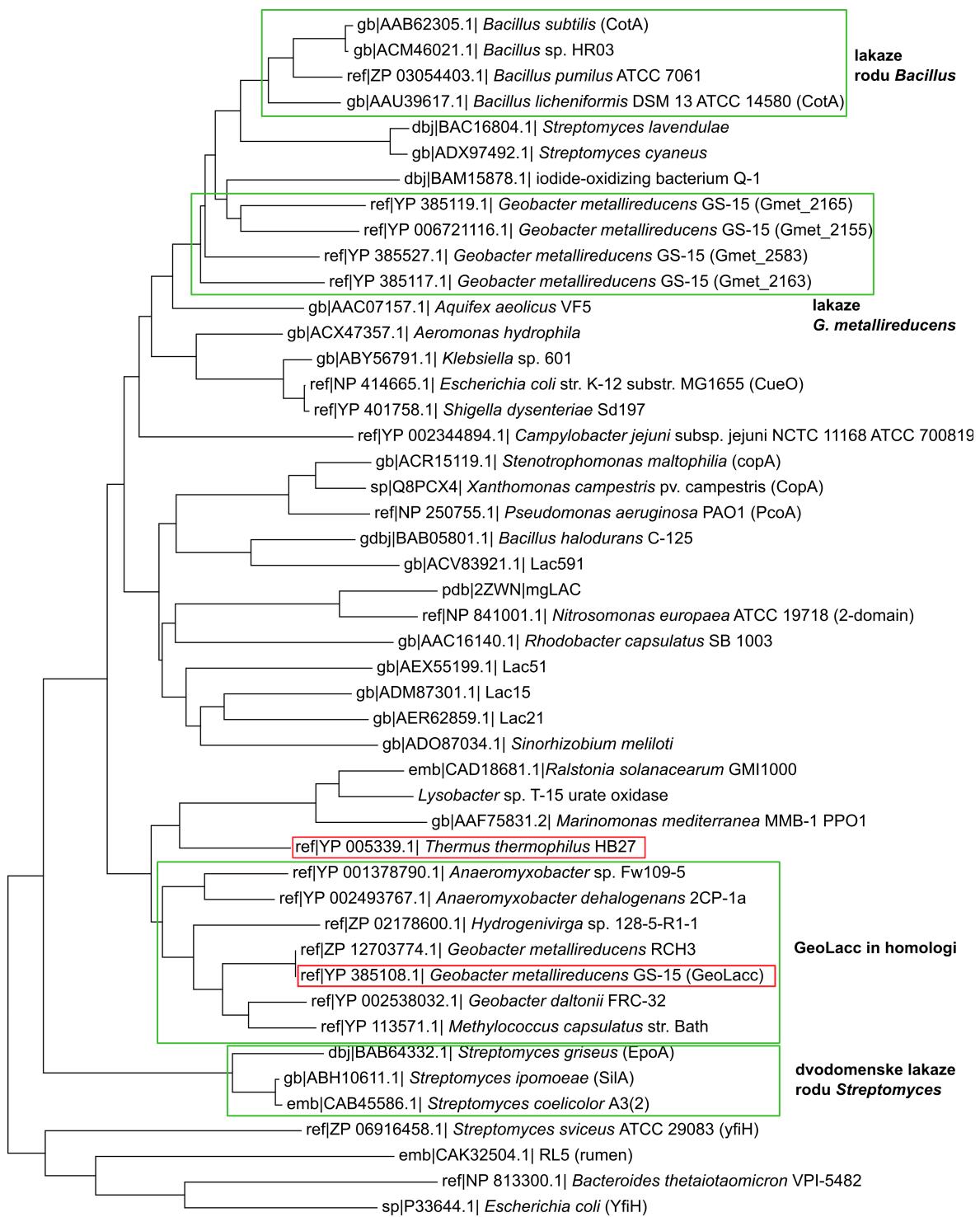
Najbližja homologa Gmet_2165, ki je eden od dveh za lakaze izjemno velikih proteinov v *Geobacter metallireducens* GS-15, sta proteina OmpC bakterij *Geobacter sulfurreducens* PCA ($E = 0$) in *Geobacter daltonii* FRC-32 ($E = 0$). Protein OmpC je v bakteriji *G. sulfurreducens* pomemben za respiracijo s trdnimi delci železa (Holmes in sod., 2008).

Produktu Gmet_2583 je najbolj podobna oksidaza z več atomi bakra tipa 2 iz bakterije *Bacillus* sp. 1NLA3E, podoben pa je tudi produktu gena Gmet_2163 in med ostalim domnevni lakazi Anae109_3108 bakterije *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5 ($E = 4e-92$), domnevni lakazi A2cp1_0965 bakterije *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 ($E = 4e-91$) in domnevnim bilirubin oksidazam bakterij rodu *Bacillus*. Iskanje z algoritmom blastn pokaže podobnosti samo določenih fragmentov genov.

Preglednica 29: Na aminokislinski ravni najbolj podobni homologi ostalih domnevnih lakaznih genov bakterije *Geobacter metallireducens* GS-15. Podane so vrednosti E, ki jih poda BLAST za vsak rezultat po preiskovanju podatkovne baze. Če je vrednost E nižja od 0,02, je zadetek verjetno homolog zaporedja, s katerim smo preiskovali bazo.

Gen	Najbolj podoben homolog med bakterijami izven vrste <i>Geobacter metallireducens</i>	Vrednost E (blastp)
Gmet_2155	YP_002140795 (<i>Geobacter bemedjiensis</i> BEM)	3e-150
Gmet_2163 (OmpB)	ZP_09600956 (<i>Bacillus</i> sp. 1NLA3E)	0
Gmet_2165 (OmpC)	NP_953702 (<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA)	0
Gmet_2583	ZP_09600956 (<i>Bacillus</i> sp. 1NLA3E)	2e-107

V filogenetskem drevesu narejenim z metodo povezovanja sosedov (ang. *neighbor joining*) na podlagi poravnave vseh aminokislinskih zaporedij do zdaj okarakteriziranih bakterijskih lakaz se GeoLacc s homologi nahaja ob lakazi *Thermus thermophilus*, ostale lakaze *Geobacter metallireducens* GS-15 pa so najbolj podobne lakazam rodu *Bacillus* (Slika 28).



Slika 28: Filogenetsko drevo aminokislinskih zaporedij vseh (deloma) okarakteriziranih bakterijskih lakaz s homologi GeoLacc. Drevo je bilo narejeno z metodo združevanja sosedov na podlagi poravnave aminokislinskih zaporedij z algoritmom Muscle.

5 RAZPRAVA

5.1 HETEROLOGNO IZRAŽANJE IN ČIŠČENJE LAKAZE BAKTERIJE *Geobacter metallireducens* GS-15

V praktičnem delu te magistrske naloge smo izrazili tri različice Gmet_2154, enega od domnevnih lakaznega genov bakterije *Geobacter metallireducens* GS-15:

- GeoLacc-NHis – aminokislinskemu zaporedju divjega tipa na N-koncu dodana heksahistidinski označevalec in dipeptid SS (ostanek kloniranja)
- GeoLacc-noSP – aminokislinskemu zaporedju divjega tipa odvzetih prvih 24 aminokislin in na N-koncu dodana heksahistidinski označevalec in dipeptid SS (ostanek kloniranja)
- GeoLacc-CHis – aminokislinskemu zaporedju divjega tipa na C-koncu dodana dipeptid LE (ostanek kloniranja) in heksahistidinski označevalec.

Pri izražanju različic GeoLacc-NHis in GeoLacc-noSP je prišlo do tvorbe inkluzijskih teles, pri GeoLacc-CHis pa ta pojav ni bil izrazit. Uporabljena sta bila dva različna ekspresijska plazmida - pET-21c(+) in pHisTag, ki je izpeljanka plazmida pET-8c (Rems, 2009). Oba plazmida za izražanje vstavljenih genov nosita enak promotor (T7), zato menimo, da je glavni faktor pri nastajanju inkluzijskih teles v tem primeru modifikacija N-konca.

Pri GeoLacc-noSP je aktivnost nevezane frakcije primerljiva z aktivnostjo supernatanta, aktivnost elucijskih frakcij obeh N-terminalno modificiranih različic pa je nizka, zato sklepamo, da je bila njuna vezava na agarozno kolono z Ni-NTA slaba. Predpostavljamo, da do tega pride, če je histidinski označevalec na N-koncu slabo dostopen ali tam ni več prisoten.

Možno je, da k odsotnosti histidinskega označevalca na proteinu prispeva domnevni signalni peptid na N-koncu. Če mehanizmi bakterijskega gostitelja prepozna signalni peptid transportne poti TAT, ga ob transportu pravilno zvitega proteina v periplazmo odrežejo. Tako bi odrezali tudi histidinski označevalec. To je v skladu z dejstvom, da smo GeoLacc-NHis zaznali po lakazni aktivnosti v supernatantu in nevezani frakciji, z imunodetekcijo po prenosu western pa ne. Za šibko aktivnost v elucijskih frakcijah bi lahko bil odgovoren delež pravilno zvitega encima, ki še ni vstopil v proces transporta in cepitve signalnega peptida. Za GeoLacc-noSP smo pričakovali, da bo histidinski označevalec prisoten in bo izolacija uspešna, saj mu manjka odsek prvih 24 aminokislinskih ostankov, kjer se nahaja domnevni signalni motiv za transportno pot TAT.

Ker je bila po majhni razliki med aktivnostjo supernatanta in nevezane frakcije sodeč vezava na kolono tudi v tem primeru slaba, pri produkciji pa je prihajalo do opazne tvorbe inkluzijskih teles, je verjetno večji problem nedostopnost histidinskega označevalca, za tvorbo inkluzijskih teles pa je v obeh primerih kriva modifikacija N-konca. Možno je tudi, da je prisotnost prvih 24 aminokislin potrebna za pravilno zvijanje proteina, da je bila dolžina domnevnegata signalnega peptida narobe predvidena in je na N-koncu ostalo nekaj odvečnih aminokislin, ali pa na zvitje in aktivnost GeoLacc-noSP vpliva mutacija V208A, ki se je v tem konstraktu naključno pojavila med molekularnim kloniranjem. Kljub temu, da gre za spremembo v podobno aminokislino, tega brez direktne primerjave z različico brez mutacije ne moremo izključiti.

Alternativna razloga je, da je lakaza GeoLacc sposobna opravljanja zaščitne funkcije v *E. coli*. Ker se GeoLacc-CHis dobro izraža, morda celica kljub prisotnosti bakra v gojišču ne zazna potrebe po sintezi sebi lastne lakaze CueO. V primeru slabega izražanja GeoLacc-NHis in GeoLacc-noSP pa bi v nevezani frakciji tako zaznavali aktivnost gostiteljevih lakaz. Kontrolni poskus z netransformirano BL21 sicer te razlage ne podpira, saj je lakazna aktivnost že v supernatantu lizata bistveno nižja kot pri sevu, ki proizvaja GeoLacc-NHis.

Če aminokislinsko zaporedje GeoLacc res vsebuje signalni peptid, ki ga prepoznajo transportni sistemi *E. coli*, bi lahko preverili z MS/MS ter analizo peptidnega odtisa ali Edmanovo degradacijo proteina GeoLacc-CHis. Pozitiven rezultat bi pokazal skrajšan N-konec. S fiziološkega vidika sta sicer bolj pomembni vprašanji, če N-konec vsebuje signalni peptid, ki igra vlogo v izvornem organizmu *Geobacter metallireducens* GS-15, in če se gen sploh izraža, vendar so za to potrebeni poskusi z izvornim organizmom samim.

Primerjava elektroforeznih lis netransformiranega seva BL21 in produkcijskega seva razkrije proteine gostiteljevega izvora in lise, ki predstavljajo heterologno proizvedeno lakazo. Nekateri proteini so podobne velikosti kot GeoLacc-CHis in segajo do velikosti okoli 70 kDa. Lakaza CueO, katere gen vsebuje tudi genom *E. coli* BL21, je velika okoli 50 kDa (Kim in sod., 2001) in bila lahko prikrita v okolini elektroforezne lise GeoLacc-CHis. Pri uporabljenih pogojih smo v supernatantu lizata netransformirane *E. coli* BL21, nevezani frakciji in frakciji W20 spektrofotometrično zaznali lakazno aktivnost, v frakcijah W50, W100 in EL2 pa ne, zato je verjetnost kontaminacije elucijskih frakcij z gostiteljsko lakazo nizka. Tudi elektroforezne lise velikosti okoli 35 in 25 kDa so蛋白ini gostiteljskega izvora. *E. coli* poleg gena *cueO* vsebuje še en gen za protein z lakazno aktivnostjo – YfiH (Beloqui in sod., 2006). Pričakovana velikost divjega tipa te lakaze je okoli 26 kDa, Beloqui in sod. (2006) pa so velikost YfiH s histidinskim označevalcem z SDS-PAGE ocenili na okoli 25 kDa. Velikost proteinov, ki jih vidimo na SDS-PAGE naših

vzorcev, temu ne ustreza, poleg tega pa meritve aktivnosti elucijskih frakcij prisotnosti YfiH kot kontaminante ne podpirajo. Kontaminacije z lakazami *E. coli* ne podpirajo tudi druge meritve, saj se izmerjeni temperaturni optimum 60 °C razlikuje od obeh temperaturnih optimumov omenjenih lakaz – višji od 75 °C za CueO (Kataoka in sod., 2007) in 42 °C za YfiH (Beloqui in sod., 2006). Za elektroforezne lise velikosti med 130 in 170 kDa, ki jih lahko vidimo pri vzorcih GeoLacc-CHis, pri netransformiranem sevu BL21 pa ne, menimo, da so artefakt priprave vzorca, saj smo uporabljali vzorčne pufre za SDS-PAGE brez reducenta. Toplotno denaturiran protein GeoLacc-CHis bi lahko preko sproščenih cisteinov kovalentno tvoril trimere s pričakovano velikostjo 168,4 kDa, ki bi ustrezali opaženim velikostim. Da gre res za GeoLacc-CHis, pokaže tudi imunodetekcija po prenosu western, ki razkrije še liso, ki ustreza pričakovani velikosti dimera – 112,4 kDa. Obe lisitvi sta podvojeni. Za lisitvi z nižjima molekulskima masama bi bila lahko odgovorna odstranitev signalnih peptidov - trimer brez signalnega peptida bi bil okoli 10 kDa manjši, dimer pa okoli 7 kDa – ali pa drugačna mobilnost zaradi različne kovalentne vezave prek cisteinov. GeoLacc-CHis namreč vsebuje 3 cisteine. Da bi ugotovili, katera razлага je pravilna, bi morali uporabiti MS/MS.

Cimografija je pokazala lakazno aktivnost v nekuhanih vzorcih izoliranega proteina, vendar ne pri pričakovani velikosti. To lahko razlagamo z drugačno mobilnostjo nedenaturiranih proteinov. SDS sam očitno ne uniči strukture lakaze, saj je aktivna tudi v gelu, kar pomeni, da se SDS ne veže na proteine v konstantnem masnem razmerju in mobilnost tako ni direktno sorazmerna z maso v kDa. Oksidacija ABTS v lisitvi z navidezno višjo molekulsko maso morda pomeni oligomerizacijo lakaze v nativnih pogojih. To trditev bi lahko preverili bodisi z nativno poliakrilamidno gelsko elektroforezo bodisi z uporabo reagenta za kovalentno povezovanje komponent oligomerov (ang. *cross-linking reagent*) in analizo takega vzorca z SDS-PAGE.

Durão in sod. (2008) so poročali o 80-krat večji akumulaciji bakra pri *E. coli* gojeni v mikroaerobnih pogojih (oz. brez mešanja) kot pri *E. coli* gojeni v aerobnih pogojih, zato smo primerjali lakazno aktivnost izolirano iz kultur, od katere smo eno po indukciji z 0,6 mM IPTG prekonočno gojili pri sobni temperaturi in s slabim mešanjem (85 RPM), drugo pa pri enakih pogojih, a pri visoki hitrosti mešanja (več kot 200 RPM). Opazna je bila razlika v količini proizvedene biomase, saj je kultura gojena pri 85 RPM vsebovala 0,48 g mokre biomase, kultura gojena pri 200 RPM pa 1,36 g. Ker smo pri procesiranju biomase pufer za lizo vedno dodajali v razmerju glede na biomaso, pogoji pri spektrofotometričnem merjenju pa so bili enaki, obravnavamo aktivnosti v supernatantih bakterijskih lizatov kot direktno primerljive. V izvedenem poskusu je bila aktivnost v supernatantu lizata kulture, ki je bila gojena pri visoki hitrosti mešanja, višja od druge. Večja produkcija GeoLacc-

CHis pri kulturi mešani z visoko hitrostjo je opazna tudi z SDS-PAGE, saj je obarvanje vzorca tega supernatanta pri pričakovani velikosti GeoLacc-CHis glede na ostale lise v vzorcu močnejše kot pri supernatantu lizata biomase kulture gojene pri 85 RPM. Aktivnosti vseh frakcij spiranja in elucijskih frakcij so bile v absolutnem smislu bistveno večje pri vzorcih, ki izhajajo iz kulture gojene pri 200 RPM, vendar je zaradi razlike v biomasi in prenosu celotne aktivnosti na približno enak volumen kolone smiselno narediti standardizacijo na biomaso pri vzorcih izolacijskih frakcij. Vrednosti so tako bolj primerljive, izkaže pa se, da hitrost mešanja v tem primeru ni imela posebnega vpliva na encimsko aktivnost, ki bi ga pričakovali glede na poročanje Durão in sod. (2008). Še vedno je sicer možno, da je posamezna celica v primeru počasnejšega mešanja proizvedla manjšo količino encima, a bolj aktivno obliko zaradi zapoljenosti mest z bakrom. Pravilnemu zvitju prispeva nižja temperatura gojenja. Zaradi večje proizvedene količine lakaze pri prekonočnem gojenju kulture pri sobni temperaturi in hitrem mešanju smo kljub daljšemu trajanju uporabljali ta postopek namesto 4 h gojenja kulture pri 37 °C in hitrem mešanju.

Med izolacijo nismo opazili modre barve, ki je značilna za modre oksidaze z bakrom in o kateri poročajo v mnogih primerih karakterizacije bakterijskih lakaz (Machczynski in sod., 2004; Miyazaki, 2005). To je lahko posledica slabe zapolnitve vezavnih mest z bakrom ali tega, da GeoLacc-CHis nismo izolirali do homogenosti. Za izolacijo do homogenosti bi bile poleg afinitetne kromatografije potrebne še druge metode, npr. ionsko izmenjevalna kromatografija, obarjanje z amonijevim sulfatom ali delno obarjanje gostiteljevih proteinov s kuhanjem supernatanta lizata. Kljub delni očiščenosti proteina smo encimu lahko okarakterizirali vse ostale lastnosti, ki so neodvisne od mase, kot so pH optimum, temperaturni optimum ter delni razpon substratov in inhibitorjev.

5.2 KATALITIČNA AKTIVNOST GEOLACC-CHIS

Za oksidacijo ABTS z GeoLacc-CHis lahko rečemo, da poteka po kinetiki Michaelis-Menten. K_m za oksidacijo ABTS (s standardno deviacijo) smo ocenili na $0,85 \pm 0,25$ mM, kar je relativno visoko za bakterijske lakaze in pomeni, da ima encim relativno slabo afiniteto do substrata. Tudi vrednost K_m za oksidacijo 2,6-DMP (s standardno deviacijo), ki smo jo ocenili na $1,55 \pm 0,56$ mM, je relativno visoka. Ustreznost kinetike Michaelis-Menten je sicer v tem primeru vprašljiva, saj se spektrofotometrično merjena hitrost oksidacije 2,6-DMP z višanjem koncentracije nad 20 mM niža. V literaturi smo našli podatke o vrednostih K_m različnih bakterijskih lakaz, kjer gre večinoma za submilimolarne oziroma mikromolarne vrednosti K_m , obstaja pa nekaj izjem (Preglednica 30). Prvotno so pri lakazi CueO bakterije *Escherichia coli* izmerili K_m za ABTS 2,50 mM in za 2,6-DMP 2,12 mM (Kim in sod., 2001), vendar so kasneje Roberts in sod. (2002) pri optimalnem pH

za 2,6-DMP določili K_m 70,5 μM . Relativno visoke vrednosti K_m ima tudi lakaza hipertermofila *Thermus thermophilus* HB27, ki ima K_m za ABTS pri 25 °C 0,88 ± 0,10 mM. Ugotovili so, da vsaj pri tej lakazi na afiniteto poleg temperature, ki afiniteto znatno poviša, vpliva tudi baker. Ta sicer poveča K_m , vendar še posebno pri višjih temperaturah (bližje optimumu) poveča tudi razmerje kcat/ K_m ozziroma učinkovitost pretvorbe (Liu in sod., 2011). Visoke vrednosti K_m kažejo na to, da so naravni substrati GeoLacc verjetno drugačni kot ABTS in 2,6-DMP.

Preglednica 30: Nekatere vrednosti K_m za ABTS in 2,6-DMP pri različnih bakterijskih lakazah iz literature. Navedene so vrednosti v milimolarnemu območju in vrednosti K_m nekaterih bolj znanih lakaz. Vključeni sta tudi vrednosti K_m GeoLacc-CHis (*Geobacter metallireducens* GS-15). Znak “/” pomeni, da ni podatka.

Vrsta	K_m ABTS	K_m 2,6-DMP	Vir
<i>Aeromonas hydrophila</i> WL-11	0,94 mM	1,83 mM	Wu in sod., 2010
<i>Bacillus subtilis</i> (CotA)	124 ± 11 μM	216 μM	Durão in sod., 2008
<i>Escherichia coli</i> (CueO)	*2,50 mM	*2,12 mM 70,5 μM	*Kim in sod., 2001 Roberts in sod., 2002
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	0,85 ± 0,25 mM	1,55 ± 0,56 mM	[magistrsko delo]
<i>Klebsiella</i> sp. 601	5,63 mM	0,49 mM	Li in sod., 2008
<i>Lysobacter</i> sp. T-15	2,8 mM	4,7 mM	Tamaki in sod., 2010
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	4,8 mM	170 μM	Jimenez-Juarez in sod., 2005
<i>Ralstonia solanacearum</i>	/	1,02 ± 11 mM	Hernández-Romero in sod., 2005
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,7 mM	/	Galai in sod., 2009
<i>Streptomyces ipomoeae</i> CECT 3341	0,40 mM	4,27 mM	Molina-Guijarro in sod., 2009
<i>Thermus thermophilus</i>	0,88 ± 0,10 mM	/	Liu in sod., 2011

5.2.1 Vpliv bakra na aktivnost GeoLacc-CHis

Meritve vpliva bakrovega sulfata na lakazno aktivnost so pokazale bistveno povečanje aktivnosti v prisotnosti bakra. Naraščanje aktivnosti GeoLacc-CHis, ki se začne pri koncentraciji bakrovega sulfata 3,9 mM (70 % povečanje aktivnosti), poteka kot logaritemska funkcija koncentracije bakrovega sulfata v reakcijski mešanici. Ker je njegov vpliv na aktivnost postal jasen že v preliminarnih poskusih, smo ga za jačanje signala dodajali v reakcijske mešanice za karakterizacijo encima. Solano in sod. (2001) so glede na odvisnost encimske oksidacije 2,6-DMP od prisotnosti bakra modre proteine z več atomi bakra razdelili v tri skupine. Ena od teh skupin, ki vsebuje CueO (*E. coli*) in CopA (*P. syringae*, *X. campestris*), so poimenovali psevdo-lakaze, saj je bila oksidacija 2,6-DMP pri njih odvisna od prisotnosti bakra, njegova oksidacija pa se je po hitrem začetku kmalu ustavila. Lakaza GeoLacc-CHis lahko 2,6-DMP oksidira tudi brez bakra, zato menimo, da

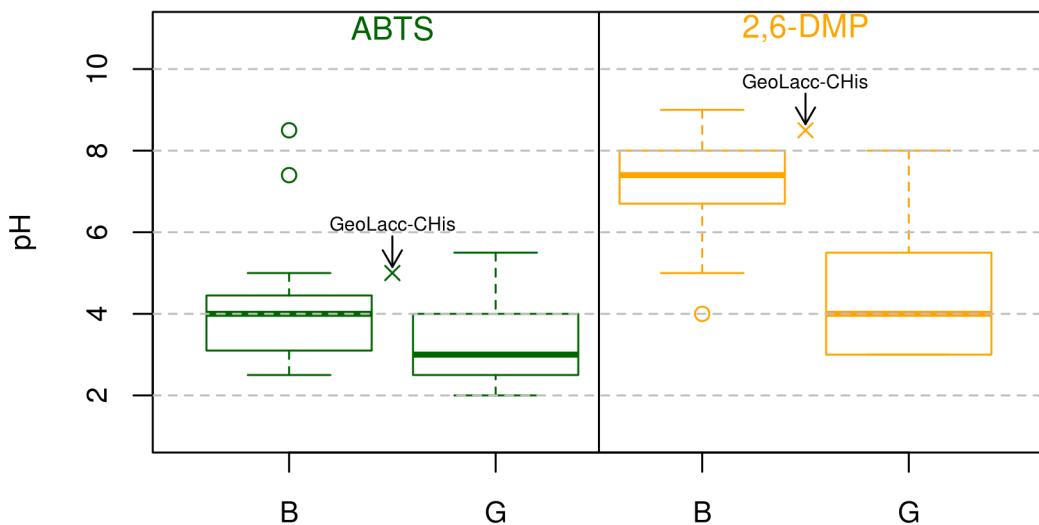
ni psevdo-lakaza, šibka aktivnost proti 2,6-DMP pa kaže, da verjetno ni optimalen substrat ali so vezavna mesta za baker slabo zapolnjena. Slaba zapolnitev mest z bakrom je znan problem pri heterologno izraženih lakazah (Durão in sod., 2008). Za ugotavljanje zapolnitve mest je potrebno protein očistiti do homogenosti in znano količino okarakterizirati z optično emisijsko spektroskopijo z induktivno sklopljeno plazmo (ang. *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*).

5.2.2 Vpliv pH na aktivnost GeoLacc-CHis

Optimalni pH za delovanje lakaze se razlikuje od substrata do substrata. Profil odvisnosti hitrosti oksidacije ABTS z GeoLacc-CHis od pH kaže optimum pri pH 5,0. Profil odvisnosti hitrosti oksidacije 2,6-DMP z GeoLacc-CHis od pH ima vrh pri pH 8,5 ali pH 9,0, aktivnost pa do pH 9,5 pade na 60 %. V obeh primerih aktivnost z višanjem pH pada manj kot z nižanjem. Izmerjena pH optimuma sta zelo visoka glede na glivne lakaze. Pri glivnih lakazah je pH 5,0 najvišja vrednost med pH optimumi oksidacije ABTS, najvišji pH optimum za oksidacijo 2,6-DMP pa je 8,0 (Baldrian, 2006). Tudi glede na pH optimume bakterijskih lakaz v literaturi (Preglednica 31) sta oba pH optimuma GeoLacc-CHis med višjimi. Tretji kvartil pH optimumov za oksidacijo ABTS pri 23 izoliranih in okarakteriziranih bakterijskih lakazah z ugotovljenim pH optimumom (vključno z GeoLacc-CHis) je 4,45. Tretji kvartil pH optimumov za oksidacijo 2,6-DMP je pri 20 tako okarakteriziranih bakterijskih lakazah 8,00 (Slika 29).

Preglednica 31: pH optimumi bakterijskih lakaz iz literature. V preglednici sta tudi meritvi Geolacc-CHis.

Vrsta	pH _{ABTS}	pH _{DMP}	Vir
<i>Aquifex aeolicus</i>	4	/	Fernandes in sod., 2007
<i>Aeromonas hydrophila</i> WL-11	2,6	8	Wu in sod., 2010
<i>Bacillus</i> HR03	4	7,4	Dalfard in sod., 2006
<i>B. licheniformis</i>	4,2	7	Koschorreck in sod., 2008
<i>B. licheniformis</i> LS04	4,2	7,4	Lu in sod., 2012
<i>B. pumilus</i>	4; *3,2	7	Reiss in sod., 2011; *Durand in sod., 2012
<i>Bacillus</i> SF	2,5	7,5	Kudanga in sod., 2009
<i>Bacillus</i> sp. ADR	/	4	Telke in sod., 2011
<i>B. sphaericus</i>	/	6	Claus in Filip, 1997
<i>B. subtilis</i>	3	/	Martins in sod., 2002
<i>B. subtilis</i> CICC20613	4	/	Yang in sod., 2012
<i>B. vallismortis</i>	4,4	/	Zhang in sod., 2012
<i>Campylobacter jejuni</i>	4	8	Silva in sod., 2012
<i>Delftia acidovorans</i>	4	/	Kalme in sod., 2009
<i>Escherichia coli</i> (CueO)	/	6,5	Roberts in sod., 2002
<i>Geobacter metallireducens</i> (GeoLacc)	5	8,5	[magistrsko delo]
<i>Klebsiella</i> sp.	3	8	Li in sod., 2008
Lac21	/	8	Fang in sod., 2012b
Lac51	/	8	Fang in sod., 2012a
Lac591	7,4	8	Ye in sod., 2010
<i>Lysobacter</i> sp. T-15	5	/	Tamaki in sod., 2010
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	3	5	Jimenez-Juarez in sod., 2005
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	/	6,7	Wiethaus in sod., 2006
<i>Shigella dysenteriae</i>	2,5	/	Shao in sod., 2009
<i>Streptomyces coelicolor</i>	4	9	Dubé in sod., 2008
<i>Streptomyces griseus</i>	/	6,5	Endo in sod., 2003
<i>Streptomyces ipomoea</i> CECT 3341	5	/	Molina-Guijarro in sod., 2009
<i>Streptomyces psammoticus</i> MTCC 7334	8,5	/	Niladevi in sod., 2008
<i>Streptomyces sviceus</i>	4	9	Gunne in Urlacher, 2012
<i>Thermus thermophilus</i>	4,5	/	Miyazaki., 2005



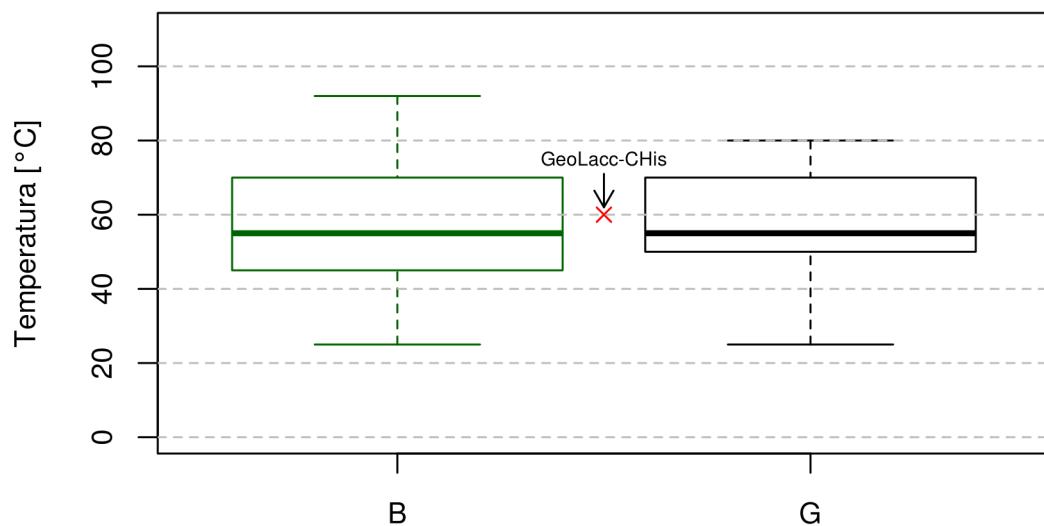
Slika 29: pH optimumi za oksidacijo ABTS (levo) in 2,6-DMP (desno) za bakterijske ($N_{ABTS} = 23$, $N_{2,6\text{-DMP}} = 20$) in glivne ($N_{ABTS} = 52$, $N_{2,6\text{-DMP}} = 41$; Baldrian, 2006) lakaze. B – bakterijske lakaze, G – glivne lakaze.

5.2.3 Vpliv temperature na aktivnost GeoLacc-CHis

Optimalna temperatura za oksidacijo ABTS z GeoLacc-CHis je 60°C , pri 50°C pa ima skoraj enako aktivnost. Pri 80°C je aktivnost približno polovična, pri 90°C pa encim ni več aktiven. Tak temperaturni optimum je blizu povprečnega optimuma glivnih lakaz, saj je mediana temperaturnih optimumov tako okarakteriziranih glivnih lakaz 55°C ($N = 39$) (Baldrian, 2006). V literaturi smo poiskali podatke o temperaturnih optimumih bakterijskih lakaz (Preglednica 32). Zanimivo je, da sta mediana in aritmetična sredina temperaturnih optimumov bakterijskih lakaz ($N = 33$, vključno z GeoLacc-CHis) tudi 55°C , enaki kot pri glivnih lakazah (Slika 30). Bakterijske lakaze, ki imajo višji temperaturni optimum od GeoLacc-CHis, so v Preglednici 32 označene z znakom *.

Preglednica 32: T optimumi bakterijskih lakaz iz literature. V preglednici je tudi T optimum Geolacc-CHis.

Vrsta	T [°C]	Vir
<i>Aquifex aeolicus</i>	75*	Fernandes in sod., 2007
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LC02	70*	Pan in sod., 2011
<i>B. licheniformis</i>	85*	Koschorreck in sod., 2008
<i>B. licheniformis</i> LS04	60	Lu in sod., 2012
<i>B. pumilus</i>	70*	Reiss in sod., 2011
<i>Bacillus</i> sp. ADR	40	Telke in sod., 2011
<i>B. sphaericus</i>	60	Claus in Filip, 1997
<i>B. subtilis</i>	75*	Martins in sod., 2002
<i>B. subtilis</i> CICC20613	25	Yang in sod., 2012
<i>B. subtilis</i> WD23	60	Wang in sod., 2010
<i>B. vallismortis</i>	85*	Zhang in sod., 2012
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (BT4389)	52	Beloqui in sod., 2006
<i>Campylobacter jejuni</i>	55	Silva in sod., 2012
<i>Delftia acidovorans</i>	60	Kalme in sod., 2009
<i>Escherichia coli</i> (CueO)	>75*	Kataoka in sod., 2007
<i>E. coli</i> (YfiH)	44	Beloqui in sod., 2006
γ -proteobacterium JB	55	Bains in sod., 2003
<i>Geobacter metallireducens</i>	60*	[magistrsko delo]
Lac15	45	Fang in sod., 2011
Lac21	45	Fang in sod., 2012b
Lac51	50	Fang in sod., 2012a
Lac591	55	Ye in sod., 2010
<i>Pseudomonas putida</i> F6	30	McMahon in sod., 2007
<i>Pseudomonas</i> sp. LBC1	40	Telke in sod., 2009
<i>Shigella dysenteriae</i>	25	Shao in sod., 2009
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	40	Galai in sod., 2009
<i>Streptomyces coelicolor</i>	60	Dubé in sod., 2008
<i>Streptomyces cyaneus</i> CECT 3335	70*	Arias in sod., 2003
<i>Streptomyces griseus</i>	40	Endo in sod., 2003
<i>Streptomyces ipomoea</i> CECT 3341	60	Molina-Guijarro in sod., 2009
<i>Streptomyces lavendulae</i> REN-7	50	Suzuki in sod., 2003
<i>Streptomyces psammoticus</i> MTCC 7334	45	Niladevi in sod., 2008
<i>Thermus thermophilus</i>	92*	Miyazaki, 2005



Slika 30: Temperaturni optimumi bakterijskih ($N = 34$) in glivnih ($N = 39$; Baldrian, 2006) lakaz. B – bakterijske lakaze, G – glivne lakaze.

Rezidualna aktivnost encima GeoLacc-CHis je po 15 min segrevanja encima na 40 - 70 °C od prvotne aktivnosti višja za okoli 50 % ali več, kar je morda povezano s konformacijskimi spremembami encima in s tem povezano zapolnitvijo mest za baker. Slednje bo mogoče preveriti, ko bo encim očiščen do homogenosti. Pri 80 °C ali več encim ni več stabilen, saj pri 80 °C že po 15 min 80 °C izgubi okoli 90 % aktivnosti. Najvišjo razpolovno dobo - 868 min pri 80 °C – ima med bakterijskimi lakazami trenutno lakaza *Thermus thermophilus* (Miyazaki, 2005).

5.2.4 Substratna specifičnost GeoLacc-CHis

Preverili smo 12 različnih spojin, če so primeren substrat za GeoLacc-CHis, med njimi tudi 5 najpogosteje uporabljenih za identifikacijo in karakterizacijo bakterijskih lakaz: ABTS, siringaldazin, 2,6-DMP, gvajakol in katehol. Pregled objav o okarakteriziranih bakterijskih lakazah je pokazal, da v splošnem bakterijske lakaze večinoma oksidirajo 10 od substratov, ki smo jih preverili, redki tarči pa sta predvsem vanilinska kislina in tirozin. Tudi GeoLacc-CHis ne oksidira tirozina, torej ni tirozinaza. GeoLacc-CHis tako kot vse druge bakterijske lakaze (z nekaterimi izjemami) oksidira ABTS, siringaldazin in 2,6-dimetoksifenol. Lakaza *Bacillus* sp. ADR ne oksidira ABTS in siringaldazina (Telke in sod., 2011). 2,6-dimetoksifenol so oksidirale vse bakterijske lakaze, kjer so substrat preizkusili, razen EpoA *Streptomyces griseus* (Endo in sod., 2003). GeoLacc-CHis oksidira tudi kalijev ferocianid, ki ga oksidirajo tudi lakaze SilA *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341 (Molina-Guijarro in

sod., 2009), SLAC *Streptomyces coelicolor* (Machczynski in sod., 2004) in PPO1 *Marinomonas mediterranea* MMB-1 (Jimenez-Juarez in sod., 2005). Poleg tega GeoLacc-CHis oksidira še polifenola katehol in pirogalol, nismo pa zaznali oksidacije gvajakola, siringaldehida, ferulične kislina in substituiranih fenolnih derivatov benzojske kislina (siringična kislina, vanilinska kislina).

5.2.5 Vpliv ionov na aktivnost GeoLacc-CHis

Tako kot večino ostalih lakaz tudi GeoLacc-CHis inhibira prisotnost kloridnih anionov. Že prisotnost 1 mM NaCl aktivnost zmanjša na okoli 5 %. Učinek CaCl₂ je večji, ker ima večji molski delež kloridnega aniona. Bromidni in fluoridni anion manj inhibirata aktivnost GeoLacc-CHis kot kloridni, saj se aktivnost zniža pod 10 % šele pri koncentraciji med 10 in 50 mM NaCl. To je drugače kot pri halotolerantni lakazi bakterije *M. mediterranea* MMB-1, katere aktivnost zniža na 10 % 50 mM fluorid, na klorid in bromid pa je bolj odporna (Jimenez-Juarez in sod., 2005). Majhni anorganski anioni, kot so halogenidi, naj bi lakaze inhibirali z vezavo na T2/T3 mesto, s čimer preprečijo transport elektronov s T1 na trojedrni center (Morozova in sod., 2007). Nekatere bakterijske lakaze so bistveno bolj odporne na soli, npr. lakaza bakterije *Bacillus* HR03, ki ji šele 0,7 M NaCl zniža aktivnost za 50 % (Dalfard in sod., 2006), ali pa jih njihova prisotnost celo aktivira, npr. lakaza bakterije *Streptomyces psammoticus* MTCC7334, ki maksimalno aktivnost doseže pri 0,8 M NaCl (Niladevi in sod., 2008).

Sulfati so bili šibkejši inhibitorji GeoLacc-CHis kot halogenidi, saj je v prisotnosti 0,4 mM natrijevega sulfata aktivnost še vedno 85 %, pri 250 mM pa 62 %. Železov(II) sulfat je pri koncentraciji 0,4 mM aktivnost zmanjšal nekoliko bolj, namreč na okoli 75 %, a pri 10 mM koncentraciji aktivnost pada na 5 %. Zmanjšanje aktivnosti zaradi prisotnosti železovega sulfata lahko morda vsaj delno pojasnimo s kompeticijo z ABTS, saj nekatere bakterijske lakaze oksidirajo Fe(II). Oksidacijo Fe(II) s CueO bakterije *Escherichia coli* (Grass in Rensing, 2001) in PcoA bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (Huston in sod., 2002) so pokazali s ferozinskim testom, pri lakazi hipertermofila *Aquifex aeolicus* pa z oksidacijo železovega amonijevega sulfata (Fernandes in sod., 2007). GeoLacc-CHis sicer oksidira ferocianidni kompleks, vendar to še ne pomeni, da oksidira tudi topno železo v obliki Fe(II). Lakaza SLAC *Streptomyces coelicolor* prav tako oksidira ferocianidni kompleks, Fe(II) pa ne (Machczynski in sod., 2004). Aktivnost je pri koncentraciji 50 mM zopet narasla na okoli 20 %, česar ne moremo enostavno pojasniti, možnosti napake pa prav tako ne moremo izključiti.

5.3 PRIMERJAVA GEOLACC-CHIS Z DRUGIMI LAKAZAMI

Po aminokislinskem zaporedju je lakazi GeoLacc od okarakteriziranih lakaz z znanim aminokislinskim zaporedjem oziroma lakaz z znano kristalno strukturo najbolj podobna lakaza hipertermofila *Thermus thermophilus* HB27 (49,6 % podobnost). Obe lakazi oksidirata ABTS, siringaldazin in 2,6-DMP, vendar GeoLacc za razliko od lakaze *Thermus thermophilus* HB27 ne oksidira gvajakola. Optimalni pH za oksidacijo ABTS je pri lakazi *Thermus thermophilus* HB27 (4,5) pol enote nižji kot pri GeoLacc (5,0). Najbolj očitna razlika je v termostabilnosti, saj je temperaturni optimum lakaze *Thermus thermophilus* HB27 (92 °C) za več kot 30 °C višji od temperaturnega optimuma GeoLacc (60 °C), poleg tega je prva obstojna daljši čas na visokih temperaturah (Miyazaki, 2005).

Nenavadno je, da so produkti štirih od petih lakaznih genov v genomu *Geobacter metallireducens* GS-15 po aminokislinskem zaporedju precej bolj podobni lakazam CotA bakterij rodu *Bacillus* kot ostalim bakterijskim lakazam, čeprav je *Geobacter* rod proteobakterij. GeoLacc po drugi strani s svojimi neokarakteriziranimi homologi iz anaerobnih bakterij spada v gručo, kateri je najbolj podobna hipertermofilna lakaza *Thermus thermophilus* HB27. Ker se tri od prej omenjenih štirih lakaz nahajajo na genomskem otoku genoma *Geobacter metallireducens* GS-15 bogatem s transpozoni, ni izključeno, da so prišle v genom iz bakterij rodu *Bacillus* ali njim sorodnim organizmov s horizontalnim genskim prenosom.

Gen Gmet_2163 je v podatkovni bazi GenBank anotiran kot *ompB*, gen Gmet_2165 pa je homologen genu *ompC* iz *Geobacter sulfurreducens*. Od ostalih OmpB in OmpC iz rodu *Geobacter* se razlikujeta po dodatnem segmentu na C koncu, ki vsebuje domene VCBS (pfam13517). Ta domena ima morda adhezijsko funkcijo. OmpB bakterije *Geobacter sulfurreducens* je šibko povezan z zunanjim membranom in je potreben za respiratorno redukcijo netopnega železa Fe(III), ne pa tudi topnega (Holmes in sod., 2008). Tudi OmpC je pri bakteriji *G. sulfurreducens* potreben za optimalno redukcijo železa. Leta 2008 je bila proteinu OmpC med okarakteriziranimi proteini z 38 % podobnostjo najbolj podobna lakaza CotA bakterije *Bacillus subtilis* (Holmes in sod., 2008). OmpB in OmpC vsebujejo pri *Geobacter sulfurreducens* 4 vezavna mesta za baker. OmpB vsebuje vezavno mesto za Fe(III) in fibronektinsko domeno tipa III. OmpC vsebuje vsaj tri vezavna mesta za Fe(III), a fibronektinske domene ne. Geni za OmpB in OmpC so prisotni v vseh genomih rodu *Geobacter*, vendar samo geni za OmpB v *G. sulfurreducens* in *G. lovleyi* vsebujejo fibronektinske domene, kar lahko pomeni razliko v funkciji. Nivo izražanja OmpB je precej stalen, nivo izražanja OmpC pa se povečuje s povečanjem hitrosti rasti v kemostatu, ob povečanju proizvajanja toka na anodi v gorivnih celicah in v začetni fazni dodajanji.

acetata v podtalnico med *in situ* bioremediacijo urana. V kasnejših fazah po dodatku acetata, ko se je število bakterij ustalilo, se je nivo izražanja OmpC kljub nadaljnji metabolni aktivnosti znižal (Holmes in sod., 2008). Če imata OmpB in OmpC lakazno aktivnost, še ni znano, vendar bi pozitiven rezultat pomenil, da encimi z lakazno aktivnostjo sodelujejo tudi v ključnih delih energijskega metabolizma. Tako bi morali lakazno aktivnost začeti obravnavati kot stično točko po funkciji zelo raznolikih encimov, ki jih druži fleksibilna in učinkovita oblika katalitskega mehanizma.

5.4 BIOTEHNOLOŠKI POMEN LAKAZE GEOLACC-CHIS

Zanimivost lakaze GeoLacc-CHis z biotehnoološkega vidika je zaenkrat vprašljiva. pH optimume ima relativno visoke, vendar je občutljiva na prisotnost nizkih koncentracij halogenidnih anionov. Pa vendar potencial te lakaze še ni do konca raziskan. Širši nabor substratov ali celo poskusi s tekstilnimi barvili bi lahko pokazali morebitne specifike te lakaze. Glede na to, da gre za aktivno lakazo anaerobnega mikroorganizma, obstaja možnost, da ni samo kisik prejemnik elektronov pri katalizi reakcije. Pri lakazi podobni oksidazi arheje *Pyrobaculum aerophilum* so namreč pokazali, da je boljši prejemnik elektronov dušikov oksid N₂O (Fernandes in sod., 2010). Tudi pri CotA *Bacillus subtilis* so pokazali, da je ta plin lahko prejemnik elektronov, vendar slabši od kisika (Fernandes in sod., 2010). Za biotehnologijo pomembnejši doprinos te raziskave je dejstvo, da potrjuje rezultate predhodno objavljene bioinformatske analize (Ausec in sod., 2011b), ki je predpostavila, da Gmet_2154 kodira funkcionalno lakazo. Pričujoča raziskava je to predpostavko potrdila.

6 SKLEPI

- Heterologno izražanje kodirajočega dela domnevnega lakaznega gena Gmet_2154 bakterije *Geobacter metallireducens* GS-15 v gostiteljski bakteriji *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE je bilo uspešno.
- S pomočjo histidinskega označevalca na C-koncu smo uspešno izolirali lakazo bakterije *G. metallireducens* GS-15 v topni obliki.
- Lakaza GeoLacc-CHis oksidira nekatere znane fenolne in nefenolne substrate, ne oksidira tirozina, inhibirajo pa jo kloridni ioni. S tem smo pokazali, da kodirajoči del gena Gmet_2154 res kodira funkcionalno lakazo.
- Lakaza GeoLacc-CHis je aktivna tudi v alkalnem območju - substrat 2,6-DMP namreč optimalno oksidira pri pH 8,5.
- Gre za prvo znano lakazo pri striktno anaerobnem organizmu.
- Na osnovi bioinformatske analize lahko sklepamo, da gre za trodomensko lakazo, ki vsebuje signalni peptid za TAT transportno pot in je verjetno locirana *in vivo* zunaj citoplazme.

7 POVZETEK

Lakaze so raznoliki encimi, ki oksidirajo fenolne in nefenolne substrate ob redukciji kisika do vode. Že več kot 100 let je znano, da so prisotne v rastlinah in še posebno v glivah, a so prisotne v vseh domenah življenja. Njihova prisotnost v bakterijah je relativno novo spoznanje, zato je okarakteriziranih veliko manj bakterijskih lakaz kot glivnih, njihove funkcije pa še vedno niso popolnoma raziskane. Na podlagi rezultatov bioinformatske analize, ki je v genomih mnogih bakterijskih vrst našla množico domnevnih lakaznih genov, smo se odločili za heterologno izražanje ene od domnevnih lakaz striktnega anaeroba *Geobacter metallireducens* GS-15. Cilj je bil preveriti, če gre res za lakazni gen, in morebitno lakazo tudi okarakterizirati. Z namenom olajšanja izolacije produkta smo pripravili tri različice genskih konstruktorjev, od katerih se je najbolje obnesla tista s histidinskim označevalcem na C-koncu produkta. 55 kDa lakaza GeoLacc-CHis oksidira tri najpogosteje za karakterizacijo uporabljene substrate - ABTS, 2,6-DMP, siringaldazin, ne oksidira pa tirozina. Temperaturni optimum za delovanje GeoLacc-CHis je 60 °C, pH optimuma za oksidacijo ABTS in 2,6-DMP pa sta 5,0 in 8,5. Kot je značilno za lakaze, aktivnost tega encima močno inhibira prisotnost halidnih anionov, še posebno Cl⁻. Ker je kodirajoči del gena Gmet_2154 očitno funkcionalen, je možno, da se gen *in vivo* izraža in da je fiziološko pomemben, vendar fiziološka funkcija tega gena v *G. metallireducens* GS-15 še ni znana. To delo poudarja pomen bioinformatike za iskanje novih lakaznih genov in potrjuje prisotnost lakaznih genov v striktno anaerobnih bakterijah.

8 VIRI

- Abari A. H., Emtiazi G., Roghanian R. 2012. Production of none germinate spore ghost from a novel marine *Bacillus* with thermostable laccase activity. African Journal of Microbiology Research, 6, 2: 393–402
- Achard M. E. S., Tree J. J., Holden J. A., Simpfendorfer K. R., Wijburg O. L. C., Strugnell R. A., Schembri M. A., Sweet M. J., Jennings M. P. in McEwan A. G. 2010. The multi-copper-ion oxidase CueO of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is required for systemic virulence. Infection and Immunity, 78, 5: 2312–2319
- Alcalde M. 2007. Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications. V: Industrial enzymes: Structure, function and applications. Polaina J., MacCabe A. P. (eds.). Dordrecht, Springer: 461–476
- Alexandre G., Zhulin I. B. 2000. Laccases are widespread in bacteria. Trends in Biotechnology, 18, 2: 41–42
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215, 3: 403-410
- Arias M. E., Arenas M., Rodríguez J., Ball A. S., Hernández M., Rodrí J., Herna M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Applied and Environmental Microbiology, 69, 4: 1953–1958
- Arora D. S., Sharma R. K. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, 160, 6: 1760–1788
- Ausec L., van Elsas J. D., Mandic-Mulec I. 2011a. Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. Soil Biology and Biochemistry, 43, 5: 975–983
- Ausec L., Zakrzewski M., Goesmann A., Schlüter A., Mandic-Mulec I. 2011b. Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes. PloS One, 6, 10: e25724, doi:10.1371/journal.pone.0025724: 8 str.
- Bains J., Capalash N., Sharma P. 2003. Laccase from a non-melanogenic, alkalotolerant γ -proteobacterium JB isolated from industrial wastewater drained soil. Biotechnology Letters, 25, 14: 1155-1159
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews, 30, 2: 215–242
- Beloqui A., Pita M., Polaina J., Martínez-Arias A., Golyshina O. V., Zumárraga M., Yakimov M. M., García-Arellano H., Alcalde M., Fernández V. M., Elborough K., Andreu J. M., Ballesteros A., Plou F. J., Timmis K. N., Ferrer M., Golyshin P. N. 2006. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. Journal of Biological Chemistry, 281, 32: 22933–22942
- Bendtsen J. D., Nielsen H., Widdick D., Palmer T., Brunak S. 2005a. Prediction of twin-arginine signal peptides. BMC Bioinformatics, 6: 167, doi:10.1186/1471-2105-6-167: 9 str.
- Bendtsen J. D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S. 2005b. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. Journal of Molecular Biology, 340, 4: 783-795
- Berrocal M. M., Rodríguez J., Ball A. S., Pérez-Leblie M. I., Arias M. E. 1997.

- Solubilisation and mineralisation of [¹⁴C] lignocellulose from wheat straw by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 during growth in solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 48, 3: 379–384
- Boukhalfa H., Icopini G. A., Reilly S. D., Neu M. P. 2007. Plutonium(IV) reduction by the metal-reducing bacteria *Geobacter metallireducens* GS15 and *Shewanella oneidensis* MR1. Applied and Environmental Microbiology, 73, 18: 5897–5903
- Bourbonnais R., Paice M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters, 267, 1: 99–102
- Butler J. E., He Q., Nevin K. P., He Z., Zhou J., Lovley D. R. 2007. Genomic and microarray analysis of aromatics degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. BMC Genomics, 8: 180, doi:10.1186/1471-2164-8-180: 16 str.
- Cañas A. I., Camarero S. 2010. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. Biotechnology Advances, 28, 6: 694–705
- Castro-Sowinski S., Martinez-Drets G., Okon Y. 2002. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. FEMS Microbiology Letters, 209, 1: 119–125
- Chen Y., Chai L., Tang C., Yang Z., Zheng Y., Shi Y., Zhang H. 2012a. Kraft lignin biodegradation by *Novosphingobium* sp. B-7 and analysis of the degradation process. Bioresource Technology, 123: 682–685
- Chen Y. H., Chai L. Y., Zhu Y. H., Yang Z. H., Zheng Y., Zhang H. 2012b. Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain *Comamonas* sp. B-9 isolated from eroded bamboo slips. Journal of Applied Microbiology, 112, 5: 900–906
- Childers S. E., Ciufo S., Lovley D. R. 2002. *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. Nature, 416, 6882: 767–769
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. Archives of Microbiology, 179, 3: 145–150
- Claus H., Filip Z. 1997. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. Microbiological Research, 152, 2: 209–216
- Cole C., Barber J. D., Barton G. J. 2008. The Jpred3 secondary structure prediction server. Nucleic Acids Research, 36, Suppl. 2: W197–W201
- Couto R. S., Herrera J. S. T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. Biotechnology Advances, 24, 5: 500–513
- Dalfard A. B., Khajeh K., Soudi M. R., Naderi-Manesh H., Ranjbar B., Sajedi R. H. 2006. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. Enzyme and Microbial Technology, 39, 7: 1409–1416
- Dubé E., Shareck F., Hurtubise Y., Daneault C., Beauregard M. 2008. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. Applied Microbiology and Biotechnology, 79, 4: 597–603
- Durand F., Kjaergaard C. H., Suraniti E., Gounel S., Hadt R. G., Solomon E. I., Mano N. 2012. Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells. Biosensors & Bioelectronics, 35, 1: 140–146
- Duran N., Esposito E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Applied Catalysis, 28, 2: 83–99

- Durão P., Chen Z., Fernandes A. T., Hildebrandt P., Murgida D. H., Todorovic S., Pereira M. M., Melo E. P., Martins L. O. 2008. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13, 2: 183–193
- Dwivedi U. N., Singh P., Pandey V. P., Kumar A. 2011. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 2: 117–128
- Endo K., Hayashi Y., Hibi T., Hosono K., Beppu T., Ueda K. 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry*, 133, 5: 671–677
- Endo K., Hosono K., Beppu T., Ueda K. 2002. A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology*, 148, 6: 1767–1776
- Enguita F. J., Marçal D., Martins L. O., Grenha R., Henriques A. O., Lindley P. F., Carrondo M. A. 2004. Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 22: 23472–23476
- Enguita F. J., Martins L. O., Henriques A. O., Carrondo M. A. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component – A laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 21: 19416–19425
- Fang W., Fang Z., Zhou P., Chang F., Hong Y., Zhang X., Peng H., Xiao Y. 2012. Evidence for lignin oxidation by the giant panda fecal microbiome. *PloS One*, 7, 11: e50312, doi:10.1371/journal.pone.0050312: 10 str.
- Fang Z., Li T., Wang Q., Zhang X., Peng H., Fang W., Hong Y., Ge H., Xiao Y. 2011. A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 4: 1103–1110
- Fang Z.-M., Li T.-L., Chang F., Zhou P., Fang W., Hong Y.-Z., Zhang X.-C., Peng H., Xiao Y.-Z. 2012. A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability. *Bioresource Technology*, 111: 36–41
- Fernandes A. T., Damas J. M., Todorovic S., Huber R., Baratto M. C., Pogni R., Soares C. M., Martins L. O. 2010. The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity. *FEBS Journal*, 277, 15: 3176–3189
- Fernandes A. T., Soares C. M., Pereira M. M., Huber R., Grass G., Martins L. O. 2007. A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEBS Journal*, 274, 11: 2683–2694
- Fernández E., Sanchez-Amat A., Solano F. 1999. Location and catalytic characteristics of a multipotent bacterial polyphenol oxidase. *Pigment Cell Research*, 12, 5: 331–339
- Francis C., Tebo B. 2001. cumA multicopper oxidase genes from diverse Mn (II)-oxidizing and non-Mn (II)-oxidizing *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 9: 4272–4278
- Freire R., Duran N., Kubota L. 2002. Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation of Kraft E1 paper mill effluent. *Analytica Chimica Acta*, 463, 2: 229–238
- Galai S., Limam F., Marzouki M. N. 2009. A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase – Use in decolorization of synthetics dyes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158, 2: 416–431

- Galai S., Lucas-Elio P., Marzouki M. N., Sanchez-Amat A. 2011. Molecular cloning of a copper-dependent laccase from the dye-decolorizing strain *Stenotrophomonas maltophilia* AAP56. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 6: 1394–1405
- Gardiol A., Hernandez R., Reinhamar B., Harte B. 1996. Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 5: 347–352
- Ge H., Xu P., Xu Y., Fang Z., Xiao Y. 2011. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of recombinant Lac15 from a marine microbial metagenome. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology And Crystallization Communications*, 67, 8: 956–958
- Geszvain K., Tebo B. M. 2010. Identification of a two-component regulatory pathway essential for Mn(II) oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4: 1224–1231
- Ghindilis A., Gavrilova V., Yaropolov A. 1992. Laccase-based biosensor for determination of polyphenols - determination of catechols in tea. *Biosensors & Bioelectronics*, 7, 2: 127–131
- Givaudan A., Effose A., Faure D., Potier P., Bouillant M. L., Bally R. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere - evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 2: 205–210
- Gomare S. S., Pashetti G. K., Govindwar S. P. 2009. Biodegradation of malachite green by *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298. *Water Environment Research : A Research Publication of the Water Environment Federation*, 81, 11: 2329–2336
- Grass G., Rensing C. 2001. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286, 5: 902–908
- Grass G., Thakali K., Klebba P. E., Müller A., Wildner G. F., Thieme D., Mu A. 2004. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186, 17: 5826–5833
- Gregory K. B., Bond D. R., Lovley D. R. 2004. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environmental Microbiology*, 6, 6: 596–604
- Gunne M., Urlacher V. B. 2012. Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces svicetus* with unusual properties discovered by genome mining. *PloS One*, 7, 12: e52360, doi:10.1371/journal.pone.0052360: 8 str.
- Gupta N., Farinas E. T. 2010. Directed evolution of CotA laccase for increased substrate specificity using *Bacillus subtilis* spores. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS*, 23, 8: 679–682
- Gupta N., Lee F. S., Farinas E. T. 2010. Laboratory evolution of laccase for substrate specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 3-4: 230–234
- Hall S. J., Hitchcock A., Butler C. S., Kelly D. J. 2008. A multicopper oxidase (Cj1516) and a CopA homologue (Cj1161) are major components of the copper homeostasis system of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 190, 24: 8075–8085
- Hernández-Romero D., Solano F., Herna D., Sanchez-Amat A. 2005. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11: 6808–6815
- Herter S., Schmidt M., Thompson M. L., Mikolasch A., Schauer F. 2011. A new phenol

oxidase produced during melanogenesis and encystment stage in the nitrogen-fixing soil bacterium *Azotobacter chroococcum*. Applied Microbiology and Biotechnology, 90, 3: 1037–1049

Hirose J., Nasu M., Yokoi H. 2003. Reaction of substituted phenols with thermostable laccase bound to *Bacillus subtilis* spores. Biotechnology Letters, 25, 19: 1609–1612

Holmes D. E., Mester T., O’Neil R. A., Perpetua L. A., Larrahondo M. J., Glaven R., Sharma M. L., Ward J. E., Nevin K. P., Lovley D. R. 2008. Genes for two multicopper proteins required for Fe(III) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens* have different expression patterns both in the subsurface and on energy-harvesting electrodes. Microbiology, 154, 5: 1422–1435

Hsiao Y.-M., Liu Y.-F., Lee P.-Y., Hsu P.-C., Tseng S.-Y., Pan Y.-C. 2011. Functional characterization of copA gene encoding multicopper oxidase in *Xanthomonas campestris* pv. campestris. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 17: 9290–9302

Hullo M.-F., Moszer I., Danchin A., Martin-Verstraete I. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. Journal of Bacteriology, 183, 18: 5426–5430

Huston W. M., Jennings M. P., McEwan A. G. 2002. The multicopper oxidase of *Pseudomonas aeruginosa* is a ferroxidase with a central role in iron acquisition. Molecular Microbiology, 45, 6: 1741–1750

Huston W. M., Naylor J., Cianciotto N. P., Jennings M. P., McEwan A. G. 2008. Functional analysis of the multi-copper oxidase from *Legionella pneumophila*. Microbes and Infection, 10, 5: 497–503

Jimenez-Juarez N., Roman-Miranda R., Baeza A., Sánchez-Amat A., Vazquez-Duhalt R., Valderrama B. 2005. Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from Marinomonas mediterranea. Journal of Biotechnology, 117, 1: 73–82

Jing D., Wang J. 2012. Controlling the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces cinnamomensis* by medium formulation. Biotechnology for Biofuels, 5, 1: 15, doi:10.1186/1754-6834-5-15: 7 str.

Käll L., Krogh A., Sonnhammer E. L. L. 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. Journal of Molecular Biology, 338, 5: 1027–1036

Käll L., Krogh A., Sonnhammer E. 2005. An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. Bioinformatics, 21, Suppl. 1: i251–i257

Käll L., Krogh A., Sonnhammer E. L. L. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. Nucleic Acids Research, 35, Suppl. S: W429–W432

Kalme S., Jadhav S., Jadhav M., Govindwar S. 2009. Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. Enzyme and Microbial Technology, 44, 2: 65–71

Kataoka K., Komori H., Ueki Y., Konno Y., Kamitaka Y., Kurose S., Tsujimura S., Higuchi Y., Kano K., Seo D. in Sakurai T. 2007. Structure and function of the engineered multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli*--deletion of the methionine-rich helical region covering the substrate-binding site. Journal of Molecular Biology, 373, 1: 141–152

Kellner H., Luis P., Zimdars B., Kiesel B., Buscot F. 2008. Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. Soil Biology And Biochemistry, 40, 3: 638–648

Kim C., Lorenz W. W., Hoopes J. T., Dean J. F. D. 2001. Oxidation of phenolate

- siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* yacK Gene. *Journal of Bacteriology*, 183, 16: 4866-4875
- Komori H., Miyazaki K., Higuchi Y. 2009. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a putative two-domain-type laccase from a metagenome. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 65, Pt 3: 264–266
- Koschorreck K., Richter S. M., Ene A. B., Roduner E., Schmid R. D., Urlacher V. B. 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 2: 217–224
- Kudanga T., Nugroho Prasetyo E., Sipilä J., Eberl A., Nyanhongo G. S., Guebitz G. M. 2009. Coupling of aromatic amines onto syringylglycerol β-guaiacylether using *Bacillus* SF spore laccase: A model for functionalization of lignin-based materials. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61, 3-4: 143–149
- Kumar A., Vanamala A., Kumar R. 2005. Exploration of bacterial laccase in *Pseudomonas stutzeri* and its application in bleaching the wood pulp. *FEBS Journal*, 272, S1: 64-64
- Kung J. W., Löffler C., Dörner K., Heintz D., Gallien S., Van Dorsselaer A., Friedrich T., Boll M. 2009. Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 42: 17687–17692
- Lang M., Kanost M. R., Gorman M. J. 2012. Multicopper oxidase-3 is a laccase associated with the peritrophic matrix of *Anopheles gambiae*. *PloS One*, 7, 3: e33985, doi:10.1371/journal.pone.0033985: 8 str.
- Lawton T. J., Sayavedra-Soto L. A., Arp D. J., Rosenzweig A. C. 2009. Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase: implications for the evolution of multicopper blue proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 15: 10174–10180
- Le Roes-Hill M., Rohland J., Burton S. 2011. Actinobacteria isolated from termite guts as a source of novel oxidative enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 4: 589–605
- Leite O., Fatibello O., Barbosa A. 2003. Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Brazilian Chemical Society*, 14, 2: 297–303
- Liu G., Zhou J., Chen C., Wang J., Jin R., Lv H. 2013. Decolorization of azo dyes by *Geobacter metallireducens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 17: 7935–7942.
- Liu Y. H., Ye M., Lu Y., Zhang X., Li G. 2011. Improving the decolorization for textile dyes of a metagenome-derived alkaline laccase by directed evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 3: 667–675
- Li Y., Yin J., Qu G., Lv L., Li Y., Yang S., Wang X. 2008. Gene cloning, protein purification, and enzymatic properties of multicopper oxidase, from *Klebsiella* sp. 601. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 9: 725–733
- Lovley D. R., Fraga J. L., Blunt-Harris E. L., Hayes L. A., Phillips E. J. P., Coates J. D. 1998. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 26, 3: 152–157
- Lovley D. R., Giovannoni S. J., White D. C., Champine J. E., Phillips E. J. P., Gorby Y. A., Goodwin S. 1993. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology*, 159, 4: 336–344

- Lu L., Zhao M., Wang T., Zhao L., Du M., Li T., Li D. 2012. Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04. *Bioresource Technology*, 115: 35–40
- Machczynski M. C., Vijgenboom E., Samyn B., Canters G. W. 2004. Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science*, 13: 2388–2397
- Madhavi V., Lele S. S. 2009. Laccase: properties and applications. *Bioresources*, 4, 4: 1694–1717
- Marchler-Bauer A. in Bryant S. H. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*, 32, Suppl. 2: W327-W331
- Marchler-Bauer A., Anderson J. B., Chitsaz F., Derbyshire M. K., DeWeese-Scott C., Fong J. H., Geer L. Y., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., He S., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Ke Z., Lanczycki C. J., Liebert C. A., Liu C., Lu F., Lu S., Marchler G. H., Mullokandov M., Song J. S., Tasneem A., Thanki N., Yamashita R. A., Zhang D., Zhang N., Bryant S. H. 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research*, 37, Suppl. 1: D205-D210
- Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J. B., Chitsaz F., Derbyshire M. K., DeWeese-Scott C., Fong J. H., Geer L. Y., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Ke Z., Lanczycki C. J., Lu F., Marchler G. H., Mullokandov M., Omelchenko M. V., Robertson C. L., Song J. S., Thanki N., Yamashita R. A., Zhang D., Zhang N., Zheng C., Bryant S. H. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39, Suppl. 1: D225-D229
- Martins L. O., Soares C. M., Pereira M. M., Teixeira M., Costa T., Jones G. H., Henriques A. O. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 21: 18849–18859
- McIlvaine T. C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, 49, 1: 183-186
- McMahon A. M., Doyle E. M., Brooks S., O'Connor K. E. 2007. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 5: 1435–1441
- Minussi R. C., Pastore M., Dura N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 6-7: 205–216
- Miyazaki K. 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*, 9, 6: 415–425
- Mohammadian M., Fathi-Roudsari M., Mollania N., Badoei-Dalfard A., Khajeh K. 2010. Enhanced expression of a recombinant bacterial laccase at low temperature and microaerobic conditions: purification and biochemical characterization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37, 8: 863–869
- Molina-Guijarro J. M., Pérez J., Muñoz-Dorado J., Guillén F., Moya R., Hernández M., Arias M. E., Al M. E. T. 2009. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *International Microbiology*, 12, 1: 13–21
- Mollania N., Khajeh K., Ranjbar B., Hosseinkhani S. 2011. Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop. *Enzyme and Microbial Technology*, 49, 5: 446–452
- Morozova O. V., Shumakovitch G. P., Gorbacheva M. A., Shleev S. V., Yaropolov A. I.

2007. "Blue" laccases. *Biochemistry*, 72, 10: 1136–1150
- Mousta C., Vieille L., Cosnier S. 2007. Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagentless amperometric biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 22, 8: 1733–1738
- Nakamura K., Go N. 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 18: 2050–2066
- Nakamura K., Kawabata T., Yura K., Go N. 2003. Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution. *FEBS Letters*, 553, 3: 239–244
- Nevin K. P., Lovley D. R. 2000. Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5: 2248–2251
- Nikitina V. E., Vetchinkina E. P., Ponomareva E. G., Gogoleva Y. V. 2010. Phenol oxidase activity in bacteria of the genus *Azospirillum*. *Microbiology*, 79, 3: 327–333
- Niladevi K. N., Jacob N., Prema P. 2008. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 43, 6: 654–660
- Niladevi K. N., Prema P. 2005. Mangrove *Actinomycetes* as the source of ligninolytic enzymes. *Actinomycetologica*, 19, 2: 40–47
- Nyanhongo G. S., Couto S. R., Guebitz G. M. 2006. Coupling of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites onto humic monomers by a new laccase from *Trametes modesta*. *Chemosphere*, 64, 3: 359–370
- Ortiz-Bernad I., Anderson R. T., Vrionis H. A., Lovley D. R. 2004. Vanadium respiration by *Geobacter metallireducens*: Novel strategy for *in situ* removal of vanadium from groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5: 3091–3095
- Palanisami S., Saha S. K., Lakshmanan U. 2009. Laccase and polyphenol oxidase activities of marine cyanobacteria: a study with Poly R-478 decolourization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1: 63–69
- Pan J. B., Zhao M., Lu L., Du M. H., Li G. F., Li J., Wang T. N., Tang X. L. 2011. Isolation and characterization of laccase activity in a novel *Bacillus amyloliquefaciens* LC02. *Advanced Materials Research*, 183-185: 773–777
- Papa R., Parrilli E., Sannia G. 2009. Engineered marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125: a promising micro-organism for the bioremediation of aromatic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1: 49–56
- Petersen T. N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. 2011. Signal P4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8, 10: 785–786
- Reiss R., Ihssen J., Thöny-Meyer L. 2011. *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnology*, 11: 9, doi:10.1186/1472-6750-11-9: 11 str.
- Rems A. 2009. Interakcija represorja LexA in rekombinaze RecA. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 48 str.
- Rice P., Longden I., Bleasby A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16, 6: 276–277
- Ridge J. P., Lin M., Larsen E. I., Fegan M., McEwan A. G., Sly L. I. 2007. A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067. *Environmental Microbiology*, 9, 4: 944–953

- Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24, 5: 219–226
- Roberts S. A., Weichsel A., Grass G., Thakali K., Hazzard J. T., Tollin G., Rensing C., Montfort W. R. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 5: 2766–2771
- Rosconi F., Fraguas L. F., Martínez-Drets G., Castro-Sowinski S. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 5–6: 800–807
- Ruijssenaars H. J., Hartmans S. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 2: 177–182
- Saha S. K., Swaminathan P., Raghavan C., Uma L., Subramanian G. 2010. Ligninolytic and antioxidative enzymes of a marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511 during Poly R-478 decolorization. *Bioresource Technology*, 101, 9: 3076–3084
- Sakasegawa S., Ishikawa H., Imamura S., Sakuraba H., Goda S., Ohshima T. 2006. Bilirubin oxidase activity of *Bacillus subtilis* CotA. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1: 972–975
- Sanchez-Amat A., Lucas-Elío P., Fernández E., García-Borrón J. C., Solano F. 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547, 1: 104–116
- Sánchez-Sutil M. C., Gómez-Santos N., Moraleda-Muñoz A., Martins L. O., Pérez J., Muñoz-Dorado J. 2007. Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 189, 13: 4887–4898
- Serrano-Posada H., Valderrama B., Stojanoff V., Rudiño-Piñera E. 2011. Thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of apo and holo forms. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 67, Pt 12: 1595–1598
- Shao X., Gao Y., Jiang M., Li L. 2009. Deletion and site-directed mutagenesis of laccase from *Shigella dysenteriae* results in enhanced enzymatic activity and thermostability. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 5: 274–280
- Sharma K. K., Kuhad R. C. 2009. An evidence of laccases in archaea. *Indian Journal of Microbiology*, 49, 2: 142–150
- Sharma P., Goel R., Capalash N. 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 6: 823–832
- Sigma-Aldrich. 2013. BL21(DE3)pLysE Competent Cells Product Information. St. Louis, Sigma-Aldrich: 4 str.
<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/b9058bul.pdf> (julij, 2013)
- Silva C. S., Durão P., Fillat A., Lindley P. F., Martins L. O., Bento I. 2012. Crystal structure of the multicopper oxidase from the pathogenic bacterium *Campylobacter jejuni* CGUG11284: characterization of a metallo-oxidase. *Metallomics*, 4, 1: 37–47
- Silva L. I. B., Ferreira F. D. P., Freitas A. C., Rocha-Santos T. A. P., Duarte A. C. 2009. Optical fiber biosensor coupled to chromatographic separation for screening of dopamine, norepinephrine and epinephrine in human urine and plasma. *Talanta*, 80, 2:

853–857

- Singh G., Bhalla A., Kaur P., Capalash N., Sharma P. 2011. Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10, 4: 309–326
- Singh G., Capalash N., Goel R., Sharma P. 2007. A pH-stable laccase from alkali-tolerant γ -proteobacterium JB: Purification, characterization and indigo carmine degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 6-7: 794–799
- Singh S. K., Grass G., Rensing C., Montfort W. R. 2004. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186, 22: 7815–7817
- Singh S. K., Roberts S. A., McDevitt S. F., Weichsel A., Wildner G. F., Grass G. B., Rensing C., Montfort W. R. 2011. Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper(I) and silver(I): functional role of a methionine-rich sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 43: 37849–37857
- Sirim D., Wagner F., Wang L., Schmid R. D., Pleiss J. 2011. The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2011: bar006, doi:10.1093/database/bar006: 7 str.
- Sitthisak S., Howieson K., Amezola C., Jayaswal R. K. 2005. Characterization of a multicopper oxidase gene from *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 9: 5650–5653
- Skálová T., Dohnálek J., Østergaard L. H., Østergaard P. R., Kolenko P., Dusková J., Stepánková A., Hasek J. 2009. The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *Journal of Molecular Biology*, 385, 4: 1165–1178
- Solano F., Garcia E., Perez D. 1997. Isolation and characterization of strain MMB-1 (CECT 4803), a novel melanogenic marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 9: 3499–3506
- Solano F., Lucas-Elío P., López-Serrano D., Fernández E., Sanchez-Amat A. 2001. Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 1: 175–181
- Suzuki M., Eda Y., Ohsawa S., Kanesaki Y., Yoshikawa H., Tanaka K., Muramatsu Y., Yoshikawa J., Sato I., Fujii T., Amachi S. 2012. Iodide oxidation by a novel multicopper oxidase from the alphaproteobacterium strain Q-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 11: 3941–3949
- Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto K., Inamori Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 10: 2167–2175
- Tamaki H., Matsuoka T., Yasuda Y., Hanada S., Kamagata Y., Nakamura K., Sakasegawa S.-I. 2010. A novel laccase with urate oxidation activity from *Lysobacter* sp. T-15. *Journal of Biochemistry*, 148, 4: 481–489
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 10: 2731–2739
- Telke A. A., Ghodake G. S., Kalyani D. C., Dhanve R. S., Govindwar S. P. 2011.

- Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR. Bioresource Technology, 102, 2: 1752–1756
- Telke A. A., Kalyani D. C., Jadhav U. U., Parshetti G. K. in Govindwar S. P. 2009. Purification and characterization of an extracellular laccase from a *Pseudomonas* sp. LBC1 and its application for the removal of bisphenol A. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 61, 3-4: 252–260
- Tremblay P.-L., Aklujkar M., Leang C., Nevin K. P., Lovley D. 2012. A genetic system for *Geobacter metallireducens*: role of the flagellin and pilin in the reduction of Fe(III) oxide. Environmental Microbiology Reports, 4, 1: 82–88
- Trudeau F., Daigle F., Leech D. 1997. Reagentless mediated laccase electrode for the detection of enzyme modulators. Analytical Chemistry, 69, 5: 882–886
- Uthandi S., Prunetti L., De Vera I. M. S., Fanucci G. E., Angerhofer A., Maupin-Furlow J. A. 2012. Enhanced archaeal laccase production in recombinant *Escherichia coli* by modification of N-terminal propeptide and twin arginine translocation motifs. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 39, 10: 1523–1532
- Virk A. P., Capalash N., Sharma P. 2012. An alkalophilic laccase from *Rheinheimera* species isolate: production and biobleaching of kraft pulp. Biotechnology Progress, 28, 6: 1426–1431
- Wang C., Zhao M., Li D., Cui D., Lu L., Wei X. 2010. Isolation and characterization of a novel *Bacillus subtilis* WD23 exhibiting laccase activity from forest soil. African Journal of Biotechnology, 9, 34: 5496–5502
- Wiethaus J., Wildner G. F., Masepohl B. 2006. The multicopper oxidase CutO confers copper tolerance to *Rhodobacter capsulatus*. FEMS Microbiology Letters, 256, 1: 67–74
- Wischgoll S., Heintz D., Peters F., Erxleben A., Sarnighausen E., Reski R., Van Dorsselaer A., Boll M. 2005. Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. Molecular Microbiology, 58, 5: 1238–1252
- Wu J., Kim K.-S., Lee J.-H., Lee Y.-C. 2010. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and enzymatic properties of laccase from *Aeromonas hydrophila* WL-11. Journal of Environmental Sciences, 22, 4: 635–640
- Wu J., Kim K.-S., Sung N.-C., Kim C.-H., Lee Y.-C. 2009. Isolation and characterization of *Shewanella oneidensis* WL-7 capable of decolorizing azo dye Reactive Black 5. Journal of General and Applied Microbiology, 55, 1: 51–55
- Yang S.-S., Liu Z.-W., Yi X.-P., Zhang A.-L., Zhang T.-Y., Luo J.-X., Zhang Z.-H., Shen J.-C., Yin H.-X., Chen L.-P. 2012. Isolation of laccase gene from *Bacillus subtilis* and analysis of its physicochemical properties. Gene, 491, 1: 49–52
- Yatsu J., Asano T. 2009. Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 39, 4: 254–262
- Ye M., Li G., Liang W. Q., Liu Y. H. 2010. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression. Applied Microbiology and Biotechnology, 87, 3: 1023–1031
- Zhang C., Diao H., Lu F., Bie X., Wang Y., Lu Z. 2012. Degradation of triphenylmethane dyes using a temperature and pH stable spore laccase from a novel strain of *Bacillus vallismortis*. Bioresource Technology, 126: 80–86

ZAHVALA

Zahvaljujem se **prof. dr. Ines Mandić-Mulec** za mentorstvo, zdravo mero raziskovalne svobode in zanimive pogovore z modrimi besedami.

Recenzentki **prof. dr. Kristini Sepčič** se zahvaljujem za izjemno hiter in kljub temu temeljit pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se **osebju Katedre za mikrobiologijo** – dobrim ljudem, ki so mi bili vedno pripravljeni pomagati in ob katerih človeku nikoli ni dolgčas. Še posebej se zahvaljujem delovnemu mentorju **Luku Ausecu** za potrpežljivost in pomoč, zlasti pri začetkih laboratorijskega dela na Katedri, in za vsakodnevno dobro voljo. Vsem skupaj hvala za mnoga prijetna kosila!

Zahvala gre tudi vsem **predavateljem na študiju biotehnologije**, ki so nas naučili več, kot si mislimo.

Hvala **prijateljem in prijateljicam** za zabavo in dogodivščine, marsikomu od njih pa tudi za strokovne pogovore.

Nazadnje hvala tudi **staršem in bratu**, ki so me ves čas zanesljivo podpirali in prenašali :)