

## Streszczenie

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój metod inżynierii białka w celu otrzymania enzymów o nowych właściwościach. Metody ukierunkowanej ewolucji molekularnej umożliwiają tworzenie enzymów o udoskonalonych właściwościach poprzez losowe zmiany w sekwencji nukleotydowej, których efekty testowane są metodami selekcji i skriningu. Z drugiej strony, rozwój zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych przyczynia się do coraz powszechniejszego stosowania metod modelowania molekularnego i racjonalnego projektowania biokatalizatorów.

Spożywanie kwasów tłuszczowych *trans* (TFA) zostało uznane istotnym czynnikiem mającym wpływ na powstawanie nowotworów, choroby niedokrwiennej serca i insulinooporności. Większość TFA powstaje jako produkt uboczny przemysłowego uwodornienia nienasyconych olejów roślinnych. Procesy enzymatyczne z użyciem selektywnych substratów lipaz mogłyby umożliwić zastąpienie procesów chemicznych i opracowanie metod produkcji tłuszczów jadalnych pozbawionych szkodliwych izomerów *trans* kwasów tłuszczowych.

Lipaza A z *Candida antarctica* charakteryzuje się korzystną selektywnością względem izomerów *trans* nienasyconych kwasów tłuszczowych. Cecha ta wynika z unikatowej, prostoliniowej budowy tunelu acylowego i umożliwia dopasowanie TFA, które charakteryzują się liniową strukturą.

Celem przeprowadzonych doświadczeń było opracowanie i ocena przydatności ukierunkowanej ewolucji molekularnej i racjonalnego projektowania białka enzymatycznego w doskonaleniu właściwości katalitycznych lipazy A z *Candida antarctica*.

Pierwszy etap badań dotyczył opracowania i optymalizacji etapów tworzenia bibliotek rekombinantów. Opracowano warunki amplifikacji, klonowania i ekspresji natywnej lipazy A. Wyselekcjonowano prawidłowy konstrukt, który następnie zastosowano w reakcjach epPCR (ang. error-prone PCR) i mutagenyzy ukierunkowanej do miejsca (ang. site-directed mutagenesis).

Przypadkowe mutacje indukowano przy użyciu zestawu GeneMorph<sup>®</sup> II Random Mutagenesis Kit (Stratagene). Zastosowano małą (0-4,5 mutacji/kpz) i średnią (4,5-9 mutacji/kpz) częstotliwość mutacji. Stwierdzono, iż duża częstotliwość zmian w sekwencji nukleotydowej inaktywuje białka enzymatyczne, stąd w przeprowadzonych doświadczeniach nie zastosowano tego typu mutacji.

W drugim etapie badań przeprowadzono selekcję i skryning uzyskanych bibliotek względem aktywności lipolitycznych, w szczególności wobec izomerów *cis*- i *trans*-kwasów tłuszczowych.

Ocenę jakościową transformantów dokonano metodą dyfuzyjną w podłożu agarowym zawierającym 3% (v:v) emulsję tributyriny lub trioleiny. Kolonie, które hydrolizowały chociaż jeden ze stosowanych substratów zostały użyte do dalszego etapu doświadczeń, tj. wysokowydajnych hodowli w mikroplatkach a następnie m in. do oceny selektywności względem izomerów *cis/trans* dienów kwasu linolowego (CLA) metodą chromatografii gazowej.

Zastosowanie reakcji epPCR umożliwiło utworzenie bibliotek mutantów o różnej częstotliwości mutacji i zmienionej selektywności względem izomerów CLA.

Analiza biblioteki po pierwszym cyklu epPCR genu lipazy A *Candida antarctica* o średniej częstotliwości mutacji pozwoliła wyselekcjonować klon MA39, który charakteryzował się selektywnością względem izomerów *cis*-9, *trans*-11 oraz *trans*-10, *cis*-12 a wartość stałej selektywności w obu przypadkach wyniosła  $\alpha=0,13$ . Stopień hydrolizy TAG-CLA kształtował się na poziomie 8,8%. Wartość stałej selektywności dla lipazy natywnej względem powyższych izomerów wyniosła  $\alpha=0,01$ , a stopień hydrolizy TAG-CLA 1,1%. Po trzech cyklach epPCR wyselekcjonowany transformant MA39 cechował się zwiększoną selektywnością wobec izomerów *cis*-9, *trans*-11 oraz *trans*-10, *cis*-12 odpowiednio 12 i 14 razy w porównaniu z lipazą natywną. Mutant ten cechował się 11-krotnie zwiększoną zdolnością hydrolizy substratu (z 1,1% do 17,1%).

Na podstawie uzyskanych wyników modelowania molekularnego przeprowadzono modyfikację lipazy A *Candida antarctica* metodą mutagenезy ukierunkowanej do miejsca za pomocą zestawu QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Otrzymano warianty F149D i F222S charakteryzujące się odmiennymi właściwościami katalitycznymi i zwiększoną selektywnością względem izomerów *trans* w porównaniu z lipazą natywną.

Uzyskane warianty lipazy A *Candida antarctica* zbadano pod kątem zdolności do hydrolizy substratów zawierających izomery *trans*- i *cis*- kwasów tłuszczowych. W celu określenia preferencji substratowej, wyznaczono stosunek aktywności hydrolitycznej względem estrów *p*-NP kwasu *trans*- elaidynowego ( $A_e$ ) i kwasu *trans*- wakcenowego ( $A_w$ ) do aktywności względem kwasu *cis*- oleinowego ( $A_o$ ). Przeprowadzone pomiary potwierdziły większą preferencję w kierunku hydrolizy estrów *p*-NP kwasu wakcenowego (C18:1  $\Delta$ 11 *trans*) w stosunku do kwasu elaidynowego (C18:1  $\Delta$ 9 *trans*).

Najkorzystniejszy stosunek  $A_e/A_o$  i  $A_w/A_o$  uzyskano po ekspresji zmodyfikowanych lipaz w komórkach Tuner (DE3)p*LacI* w temperaturze 30°C i wyniósł on odpowiednio 3,17 i 4,41 (lipaza F149D) oraz 2,15 i 3,14 (lipaza F222S). Lipaza natywna charakteryzowała się wartością współczynnika selektywności względem powyższych izomerów odpowiednio 1,07 i 1,24. Wykazano więc, że zmodyfikowane lipazy cechowały się około 3 (wariant F149D) i 2 (wariant F222S)- krotnym wzrostem preferencji substratowej w kierunku *trans* kwasów tłuszczowych w porównaniu z lipazą natywną.

Warianty lipazy A *Candida antarctica* i lipazę natywną zbadano pod kątem zdolności hydrolizy oleju zawierającego 60% izomerów *trans*. Otrzymane wyniki posłużyły do oszacowania wpływu mutacji na wzrost selektywności substratowej. Wykazano, że mutanty F149D i F222S charakteryzowały się odpowiednio 14-krotnie i 4,5-krotnie większą zdolnością hydrolizy oleju zawierającego 60% izomerów *trans* w porównaniu z lipazą natywną.