

# Ispitivanje utjecaja O-glikozilacije na ugradnju heterolognih proteina u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

---

Marjanović, Lovro

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:286010>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Lovro Marjanović**

**7796/BT**

**ISPITIVANJE UTJECAJA O-GLIKOZILACIJE NA  
UGRADNJU HETEROLOGNIH PROTEINA U STANIČNU  
STIJENKU KVASCA *Saccharomyces cerevisiae***

**Završni rad**

**Predmet:** Biokemija II

**Mentor:** Prof. dr. sc. Renata Teparić

**Zagreb, 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### ISPITIVANJE UTJECAJA O-GLIKOZILACIJE NA UGRADNJU HETEROLOGNIH PROTEINA U STANIČNU STIJENKU KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

*Lovro Marjanović, 0058215243*

**Sažetak:** „Yeast surface display“ sustav predstavlja metodu imobilizacije rekombinantnih proteina na površinu stanice kvasca pri čemu se gen koji kodira za željeni protein fuzionira sa čitavim genom ili fragmentom gena koji kodira za jedan od proteina stanične stijenke. Ova genetička fuzija omogućuje ekspresiju i ugradnju rekombinantnog proteina u staničnu stijenku kvasca. Osnovni nedostaci ove metode su relativno mala količina na površinu stanice ugrađenih rekombinantnih proteina, potencijalno smanjenje aktivnost rekombinantnih proteina uslijed fuzije sa proteinom stijenke te ponekad njihova hiperglikozilacija. Glikozilacija je postsintetska preinaka proteina koja može utjecati na smatanje, aktivnost i stabilnost proteina. Cilj ovog rada jest ispitati utjecaj O-glikozilacije na efikasnost ugradnje i aktivnost rekombinantnog enzima  $\beta$ -laktamaze u staničnu stijenku. Gen koji kodira za ovaj enzim je u jednom slučaju fuzioniran sa genom koji kodira za Pir2, a u drugom slučaju sa dijelom gena koji kodira za Ccw12 protein stijenke. Rekombinantni enzim eksprimiran je u stanicama kvasca divljeg tipa i u stanicama koji imaju mutaciju u O-glikozilaciji proteina (*pmt* mutanti). Količina enzima koja se ugradila u stijenku analizirana je mjerenjem aktivnosti enzima korištenjem nitrocefina kao supstrata i western blot analizom.

**Ključne riječi:** *pmt* mutanti, Ccw12, Pir2,  $\beta$ -laktamaza

**Rad sadrži:** 35 stranica, 12 slika, 9 tablica, 42 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof. dr. sc. Renata Teparić

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Mateja Lozančić

**Datum obrane:** 1.9.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology or Biotechnology or Nutrition**

**Department of Chemistry and Biochemistry**  
**Laboratory for Biochemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **EFFECT OF O-GLYCOSYLATION ON INCORPORATION OF HETEROLOGOUS PROTEINS IN THE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELL WALL**

***Lovro Marjanović, 0058215243***

**Abstract:** Yeast „surface display“ system represents an alternative method of immobilization of recombinant proteins on the yeast cell wall surface in which the gene encoding for the protein of interest is fused with whole or with fragment of a gene encoding for a native yeast cell wall proteins. This genetic fusion provides constant expression and incorporation of the recombinant protein into the cell wall. However, one of the major disadvantages of this method are relatively low yield of the recombinant protein in the cell wall, potential low activity of incorporated recombinant protein due to their fusion with native cell wall protein and their hypermannosylation. Glycosylation is one of major posttranslational modifications which effects protein folding, their activity and stability. Theme of this thieses is to study the effect of O-glycosylation on incorporation of the recombinant enzyme  $\beta$ -lactamase into the cell wall. In one case, the gene encoding for this enzyme is fused with gene encoding for Pir2 protein, and in the other the gene is fused with the gene encoding for Ccw12 protein. The recombinant enzyme was expressed in the wild type yeast cells and in O-glycosilation mutants (*pmt* mutants). The amount of enzyme in the cell wall is assessed by measuring  $\beta$ -lactamase activity using nitrocefine as substrate and by western blot.

**Keywords:** *pmt* mutants, Ccw12, Pir2,  $\beta$ -lactamase

**Thesis contains:** 35 pages, 12 figures, 9 tables, 42 references

**Original in:** croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Full Professor, PhD Renata Teparić

**Technical support and assistance:** PhD Mateja Lozančić

**Defence date:** 1.9.2021.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. Građa stanične stijenke <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>2</b>
<b>2.2. Glikozilacija</b> .....	<b>3</b>
2.2.1. N-glikozilacija.....	3
2.2.2. O-glikozilacija.....	5
<b>2.3. Ugradnja heterolognih proteina na površinu stanične stijenke kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>6</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1. Materijali</b> .....	<b>9</b>
3.1.1. Kemikalije .....	9
3.1.2. Uređaji .....	9
3.1.3. Laboratorijski sojevi .....	10
3.1.4. Hranjive podloge.....	11
3.1.5. Plazmidi.....	14
<b>3.2. Metode</b> .....	<b>16</b>
3.2.1. Izolacija plazmida iz stanica <i>E. coli</i> .....	16
3.2.2. Određivanje koncentracije DNA .....	16
3.2.3. Restriksijska analiza izoliranih plazmida.....	16
3.2.4. DNA elektroforeza .....	17
3.2.5. Transformacija kvašćevih stanica LiAc metodom .....	17
3.2.6. Uzgoj kvasaca uz indukciju <i>PHO5</i> promotora .....	18
3.2.7. Izolacija stijenki i proteina stijenki kvasca <i>S. cerevisiae</i> .....	18
3.2.8. SDS tretman stijenki.....	19
3.2.9. $\beta$ -1,3-glukanazni tretman stijenki .....	19
3.2.10. NaOH tretman stijenki.....	19
3.2.11. SDS-PAGE elektroforeza .....	20
3.2.12. Western blot.....	20
3.2.13. Mjerenje aktivnosti $\beta$ -laktamaze sa stanicama kvasca.....	21
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1. Restriksijska analiza i gel elektroforeza plazmidne DNA</b> .....	<b>22</b>
<b>4.2. Transformacija stanica kvasaca</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3. Mjerenje aktivnosti transformiranih stanica</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4. Određivanje količine enzima u staničnoj stijenci kvasaca</b> .....	<b>24</b>
<b>4.5. Ispitivanje stabilnosti enzima</b> .....	<b>26</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>28</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>31</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>32</b>

# 1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* modelni je organizam za istraživanja eukariota. Pripada carstvu *Fungi*, koljenu *Ascomycota* te je njegova uloga u vinarstvu, pivarstvu i pekarstvu od davnina poznata. Međutim, njegova primjena je sve veća u prehrambenoj, farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji. Jedna od njegovih primjena je u proizvodnji heterolognih proteina. Za razliku od bakterija, kvasci posjeduju mehanizme smatanja proteina i sekrecijski put sličan višim eukariotima koji omogućuje sintezu eukariotskih proteina od interesa u stanicama kvasca. U proteklih nekoliko godina, sve veća pozornost posvećuje se ugradnji heterolognih proteina u staničnu stijenku kvasca na način da se geni koji kodiraju za heterologne proteine fuzioniraju s genima proteina stanične stijenke. Ekspresija rekombinantnih proteina i njihova ugradnja u staničnu stijenku predstavlja novi alat za proizvodnju heterolognih proteina, ali i za konstrukciju novih sojeva kvasca za različite namjene.

Većina heterolognih proteina se u stanicama kvasca ekspremira u formi sekretornih proteina kako bi se olakšala njihova izolacija i pročišćavanje. Sekretorni put sastoji se od nekoliko važnih staničnih procesa, a jedan od tih procesa je glikozilacija. Glikozilacija je jedna od najznačajnijih posttranslacijskih modifikacija proteina koja označava dodavanje ugljikohidratnih jedinica na specifične aminokiselinske ostatke. Ovisno o aminokiselini na koju je vezana ugljikohidratna jedinica razlikujemo O-glikozilaciju i N-glikozilaciju. U N-glikozilaciji, ugljikohidrati su povezani N-glikozidnom vezanom za specifične asparaginske ostatke i čine duge i razgranate lance, dok su u O-glikozilaciji ugljikohidrati povezani O-glikozidnom vezom za specifične treoninske ili serinske ostatke i čine male, nerazgranate lance. Odgovarajuća glikozilacija potrebna je za pravilno smatanje proteina i njihovu biološku ulogu.

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj O-glikozilacije na ekspresiju i ugradnju heterolognih proteina u staničnu stijenku kvasca kako bi dobili što veći prinos. Mutanti u O-glikozilaciji (*pmt* mutanti) transformirani su plazmidima u čijem se sastavu nalazi heterologni gen za „reporter enzim“  $\beta$ -laktamazu. Nadalje, kako bi utvrdili koji je najpogodniji način imobilizacije ovog enzima,  $\beta$ -laktamaza je fuzionirana s dijelom Ccw12 proteina koji se u staničnu stijenku ugrađuje preko GPI-sidra na svom C-terminalnom kraju te s Pir2 proteinom koji se direktno veže na  $\beta$ -1,3-glukan preko svojih specifičnih glutaminskih ostataka smještenih u N-terminalnom dijelu proteina. Utjecaj O-glikozilacije na aktivnost i stabilnost rekombinantnog enzima ispitivali smo spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije nastalog produkta reakcije  $\beta$ -laktamaze, a količinu u stijenku ugrađenog enzima western blot analizom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Građa stanične stijenke *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam iz carstva *Fungi*. Danas se koristi kao modelni organizam u molekularnoj i staničnoj biologiji jer posjeduje odgovarajuće karakteristike kao što su: kratko generacijsko vrijeme (90 minuta pri temperaturi od 28°C), nije patogen, razmnožava se spolno (mejozom) i nespolno (pupanjem) te se lako genetički manipulira. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je ekstracelularni organel koji održava oblik stanice te njenu osmotsku stabilnost. Sastav stanične stijenke čine oko 85% polisaharida i oko 15% proteini (Nguyen i sur., 1998.) koji može varirati ovisno o uvjetima uzgoja, soju kvasca te njegovom rastu. Polisaharidni dio čini unutarnji sloj stijenke i pretežno se sastoji od polimera razgranatih  $\beta$ -1,3-glukana. Molekula  $\beta$ -1,3-glukana svojim nereducirajućim krajevima kovalentno se povezuje sa reducirajućim krajevima  $\beta$ -1,6-glukana i hitina (Kollar i sur., 1995.).  $\beta$ -1,6-glukan je kraći, ali razgranatiji od  $\beta$ -1,3-glukana. Hitin je linearni polisaharid sastavljen od oko 110 jedinica N-acetilglukozamina te njegova koncentracija u stijenci ovisi o uvjetima uzgoja. Manan se nalazi u vanjskom sloju stijenke i čini ugljikohidratni dio manoproteina. Dok  $\beta$ -1,3-glukan,  $\beta$ -1,6-glukan i hitin osiguravaju oblik stanice i mehaničku zaštitu, funkcije manana (odnosno manoproteina) i dalje nisu u potpunosti poznate. Međutim, neke poznate funkcije manana su akumulacija negativnog naboja zbog prisutnosti fosfatnih grupa te interakcija s okolinom i ostalim stanicama. Vanjski sloj stanične stijenke čine proteini glikozilirani mananom (manoproteini). Oni se razlikuju prema načinu vezanja na  $\beta$ -1,3-glukan i  $\beta$ -1,6-glukan te se dijele u dvije skupine. Prvu skupinu čine nekovalentno vezani manoproteini koji su vezani nespecifičnim nekovalentnim vezama na  $\beta$ -1,3-glukan te se izoliraju iz stijenke kuhanjem u SDS-u. Drugu skupinu čine proteini koji se kovalentno vežu sa ugljikohidratnim komponentama stijenke. U ovu skupinu pripadaju proteini iz Pir porodice (**P**roteins with **I**nternal **R**epeats), koji se direktno vežu na  $\beta$ -1,3-glukan preko glutaminskih ostataka smještenih unutar njihovih specifičnih ponavljajućih sekvenci (Ecker i sur., 2006.) te tzv. GPI-proteini koji su povezani na  $\beta$ -1,3-glukan preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra i  $\beta$ -1,6-glukana (Montijn i sur., 1994.; Van der Vaart i sur., 1995.; Kapteyn i sur., 1996.). Osim za GPI-proteine koji sudjeluju u aglutinaciji i flokulaciji, fiziološke uloge Pir i velikog broja GPI-proteina (Ccw12, Ccw14, Cwp1 itd.) su i dalje uglavnom nepoznate.

## 2.2. Glikozilacija

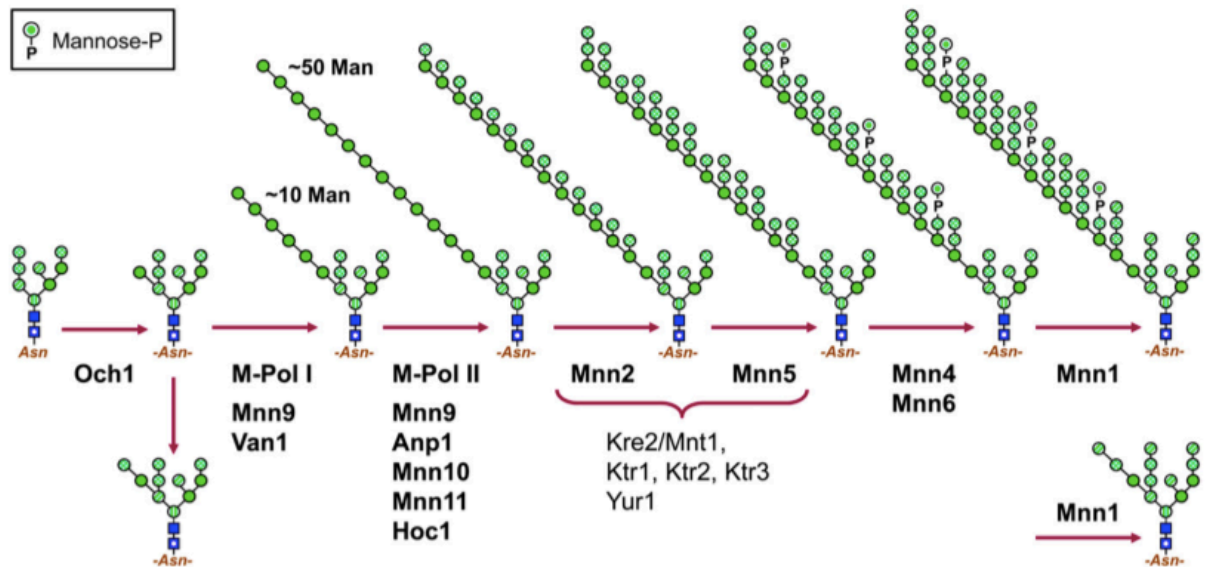
Glikozilacija je najzastupljenija posttranslacijska modifikacija proteina koja se odvija u sekretornom putu. Označava dodatak odgovarajućih ugljikohidratnih jedinica na specifične ostatke asparagina (N-glikozilacija) ili ostatke treonina ili serina (O-glikozilacija). Glikozilacija je bitna za proizvodnju heterolognih proteina kojima je određena glikozilacija potrebna za točno smatanje i određenu biološku aktivnost (npr. terapijski proteini). Najveći dio glikoziliranih proteina kvasca *Saccharomyces cerevisiae* čine manoproteini koji se nalaze u vanjskom sloju stanične stijenke. Za razliku od razgranatih i dugačkih N-glikozidnom vezom povezanih ugljikohidratnih jedinica (N-glikani), O-glikozidnom vezom povezani lanci (O-glikani) su kraći i nisu razgranati te su češće prisutni (Tanner i sur., 1998.). Enzimi uključeni u proces glikozilacije su glikoziltransferaze i glikozidaze. Glikoziltransferaze kataliziraju prijenos šećera s nukleotidnog šećernog donora na supstrat, a glikozidaze kataliziraju hidrolizu glikozidnih veza u strukturi glikana.

### 2.2.1. N-glikozilacija

N-glikozilacija započinje u endoplazmatskom retikulumu gdje se središnja strukturna jedinica („core“), dolihol-pirofosfat oligosaharid  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , sintetizira i prenosi na specifični asparaginski ostatak proteina. Novosintetizirani protein i dolihol-pirofosfat oligosaharid zajedno se prenose u endoplazmatski retikulum pomoću OST kompleksa (oligosaccharyltransferase complex) (Kelleher i Gilmore, 2006.). OST transferaza sastoji se od osam podjedinica (Ost1, Ost2, Ost3 (ili Ost6), Ost4, Ost5, Wbp1, Swp1 i Sttp3) koje imaju jednu ili više transmembranskih domena. Nakon povezivanja oligosaharida i proteina, iz oligosaharidnog lanca uklanjaju se tri glukozne jedinice i jedna manozna jedinica (Herscovics, 1999.). Ovaj korak je bitan za pravilno smatanje proteina. Ukoliko se određeni glikoprotein pogrešno smota, to prepoznaju proteini poput manozidaza Mnl1 ili Htm1 i transportiraju takve glikoproteine u sustav za degradaciju pogrešno smotanih proteina (ERAD) u kojem je glavni enzim za degradaciju glikoproteina  $\alpha$ -glukozidaza I (Jakob i sur., 1998.; Hitt i Wolf, 2004.). Pravilno smotani glikoproteini transportiraju se u Golgijev aparat gdje se dalje modificiraju. Za razliku od ostalih eukariota, kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ne dolazi do skraćivanja nastalog N-glikana, već se on nadograđuje u jednu od dvije moguće strukture. Jedna je slična središnjoj strukturnoj jedinici, samo što se na nju veže još nekoliko ugljikohidratnih jedinica (Gemmill i Trimble, 1999.). Ovakva struktura nalazi se na intracelularnim proteinima. Druga se sastoji od



dugačkih polimernih lanaca sastavljenih od točno 200 jedinica manoze i nalaze se na proteinima stanične stijenke i periplazmatskog prostora (Guillen i sur., 1999.). U procesu manozilacije, glavni donator jedinica manoze je UDP-manoza. Ovaj proces započinje u početnom dijelu Golgijevog aparata gdje Och1,  $\alpha$ -1,6-manoziltransferaza, dodaje jednu jedinicu manoze (Nakayama i sur., 1992.; Nakanishi-Shindo i sur., 1993.; Harris i Waters, 1999.). U početnom dijelu Golgijevog aparata nalaze se još dvije  $\alpha$ -1,6-manoziltransferaze, M-Pol I i M-Pol II (Jungmann i sur., 1999.; Kojima i sur., 1999.). Kod struktura koje su izgrađene od dugačkih razgranatih polimera sastavljenih od 200 manoznih jedinica, M-Pol I kompleks dodaje 10 jedinica manoze na rastući lanac koji potom M-Pol II produljuje do 50 jedinica manoze. Grananja  $\alpha$ -1,6-manozne okosnice uvode enzimi Mnn5 i Mnn2 koji posjeduju  $\alpha$ -1,2-manoziltransferaznu aktivnost. Specifična karakteristika manana kod *Saccharomyces cerevisiae* je što posjeduje manozilfosfate. Manozilfosfatne jedinice na manan dodaju Mnn6 ili Ktr6 transferaze (Wang i sur., 1997.). Ova modifikacija uvodi negativan naboj na površinu stanične stijenke te joj uloga i dalje nije poznata. Prijenos manozilfosfata na manan reguliran je razinom transkripcije *MNN4* gena, koji kodira za protein Mnn4, pozitivni regulator Mnn6 (Jigami i Odani, 1999.; Odani i sur., 1997.). Na kraju, enzim Mnn1 dodaje  $\alpha$ -1,3-povezane manoze na rastući lanac manana (Graham i sur., 1994.; Yip i sur., 1994.). Kod strukutra sličnih središnjoj strukturnoj jedinici, sinteza započinje isto s enzimom Och1, koji veže jedinicu manoze  $\alpha$ -1,6-glikozidnom vezom za rastući lanac glikana. Zatim se na postojeću jedinicu manoze  $\alpha$ -1,2-glikozidnom vezom veže još jedna jedinica manoze koja onemogućuje elongaciju  $\alpha$ -1,6-manoznog lanca. Proteini koji sudjeluju u dodavanju  $\alpha$ -1,2-povezane manoze nisu identificirani, ali pretpostavlja se da M-Pol I, Van1 i Mnn9 sudjeluju u tom procesu (Lewis i Ballou, 1991.; Stolz i Munro 2002.; Rodionov i sur. 2009.). Na kraju, Mnn1 dodaje  $\alpha$ -1,3-manozu na lanac glikana (Slika 1.).

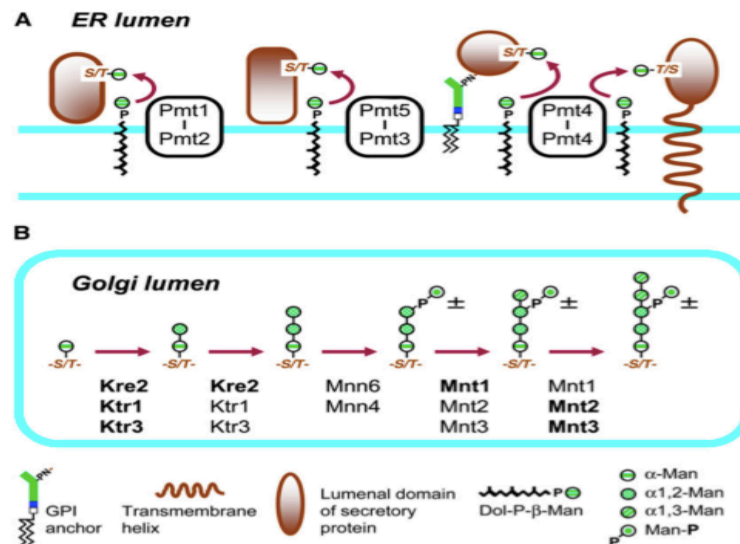


**Slika 1. Shematski prikaz biosinteze N-glikana u Golgijevom aparatu.** (Orlean, 2012.)

## 2.2.2. O-glikozilacija

Kao i kod N-glikozilacije, O-glikozilacija započinje u endoplazmatskom retikulumu. Prva reakcija je vezanje jedinice manoze, koja se prenosi s aktivirane molekule dolihol-fosfat- manoze (Dol-P-Man), na specifični treoninski ili serinski ostatak novosintetiziranog proteina. Ovu reakciju mogu provoditi šest proteina Pmt porodice (od Pmt1 do Pmt6) (Strahl-Bolsinger, Gentsch i Tanner, 1999.). Pmt proteini funkcioniraju kao hetero- ili homodimeri čije se podjedinice povezuju ovisno o tome pripadaju li jednoj od tri porodici Pmt proteina (PMT1, PMT2, PMT4). Pripadnici PMT1 porodice, Pmt1 i Pmt5, mogu tvoriti heterodimerne komplekse s pripadnicima PMT2 porodice, Pmt2, Pmt3 i Pmt6. Heterodimeri koji najviše prevladavaju su Pmt1-Pmt2 i Pmt3-Pmt5 kompleksi (Girrbach i Strahl, 2003.) Jedini pripadnik PMT4 porodice je Pmt4 koji tvori homodimerni kompleks. Ovi dimeri posjeduju različite afinitete prema različitim proteinima. Tako na primjer, glukoziltransferazu Gas1 manoziliraju samo Pmt4 i Pmt6, dok hitinaze pretežno manoziliraju Pmt1 i Pmt2 (Gentsch i Tanner, 1996.). Nakon vezanja prve manozne jedinice, glikoprotein se transportira u Golgijev aparat gdje se dalje nadograđuje. Kre2, Ktr1 i Ktr3 manoziltransferaze sudjeluju u elongaciji  $\alpha$ -1,2-manoznih lanaca. Kao i kod N-glikana, neki lanci  $\alpha$ -1,2-povezanih manozna modificirani su s manozilfosfatima koje prenose Mnn6 ili Ktr6 transferaze (Nakayama i sur., 1998.). Vezanje četvrte i pete jedinice manozna

povezanih  $\alpha$ -1,3-glikozidnom vezom kataliziraju Mnn1, Mnt2 i Mnt3 enzimi. Mnn1 glavni je enzim u vezanju četvrte jedinice manoze, dok su Mnt2 i Mnt3 odgovorni za povezivanje pete jedinice (Slika 2.)

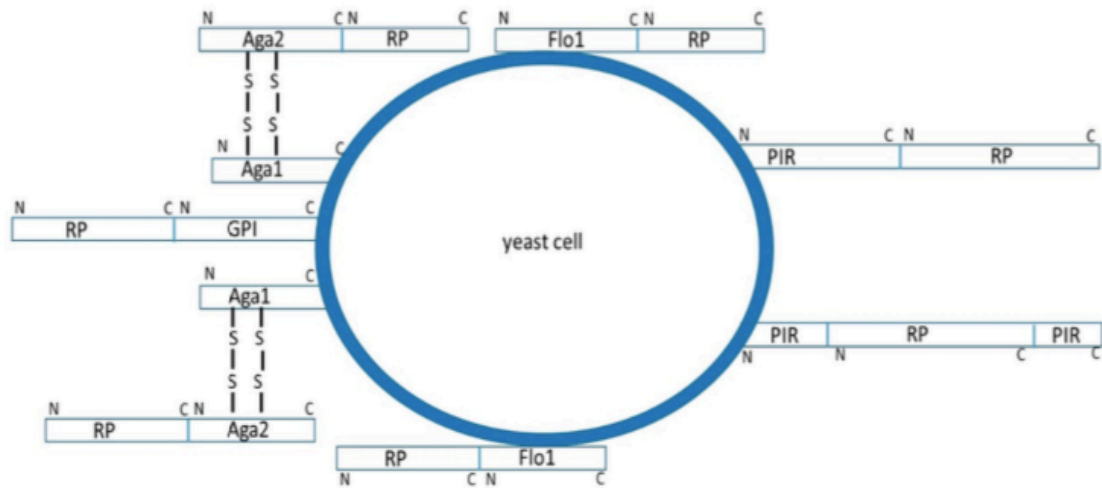


**Slika 2. Shematski prikaz biosinteze O-glikana.** (Orlean, 2012.)

### 2.3. Ugradnja heterolognih proteina na površinu stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

U proteklih nekoliko godina, velika pozornost posvećuje se ugradnji heterolognih proteina na površinu stanica domaćina. Ova tehnika imobilizacije heterolognih proteina poznata je pod nazivom „surface display“ i pronalazi veliku primjenu u biotehnologiji, prehrambenoj tehnologiji, medicini i biokemiji. Uobičajene metode imobilizacije koriste kemijski tretman proteina kako bi osigurale njihovo kovalentno ili nekovalentno vezanje na određeni nosač. Takve metode su komplicirane, dugotrajne i skupe. Kako bi se to izbjeglo, primjenom „surface display“ metode rekombinantni se protein eksplicira u stanicama te kovalentno ugradi na njenu površinu. Za razliku od konvencionalnih metoda imobilizacije koje koriste kemijske tretmane, ova metoda imobilizacije osigurava čvrsto vezanje proteina za stanicu bez denaturacije. Kako bi se heterologni protein ugradio na površinu stanice, gen koji kodira za taj protein fuzionira se sa nekim od gena koji kodiraju za proteine stanične stijenke ili njihovim fragmentima koji im omogućuju ugradnju na površinu stijenke (Abe i sur.,2004.; Matsumoto i sur., 2002.; Nakamura i sur.,2001; van der Vaart i sur., 1997.). Ovisno o karakteristikama proteina koji se imobilizira, protein se može fuzionirati preko svog N- ili C-terminalnog dijela ili

uklopiti unutar sekvence proteina stanične stijenke. Protein korišten za imobilizaciju mora imati odgovarajuću signalnu sekvencu koja će omogućiti transport fuzioniranog proteina u sekretorni put i čvrsto vezanje rekombinantnog proteina za površinu stanice. Način fuzioniranja heterolognog proteina vrlo je bitan jer utječe na ekifasnost imobilizacije, stabilnost, posttranslacijske modifikacije te njegovu aktivnost. Heterologni proteini najčešće se fuzioniraju s proteinima stanične stijenke kao što su Flo1, GPI-vezani proteini ( $\alpha$ -aglutinin,  $\alpha$ -aglutinin, Ccw12, Cwp2, Sed, itd.) i Pir proteini. Flo1 je lektinski protein koji posjeduje flokulacijsku domenu (Watari i sur., 1994.). Flokulacijska domena služi kao mjesto fuzioniranja N-terminalnog kraja heterolognog proteina te omogućuje njegovu ugradnju u staničnu stijenku. Nadalje, najčešće korišteni GPI-vezani proteini za imobilizaciju su  $\alpha$ -aglutinin,  $\alpha$ -aglutinin, Tip1, Sed1, Cwp1, Cwp2, Ccw12, Spi1, Dan4, Tos6, Srp2, Pry3 i Tir1. Kvašćev  $\alpha$ -aglutinin sastoji se od dvije podjedinice. Prva podjedinica, Aga1 povezana je sa stijenkom preko GPI-sidra, a s drugom podjedinicom, Aga2 povezana je disulfidnim mostovima. Fuzioniranje heterolognog proteina s Aga2 podjedinicom omogućuje njegovu ugradnju i imobilizaciju na površini stanice (Ryckaert i sur., 2005.; Liu i sur., 2010.; Parthasarathy i sur., 2006.; Van den Beucken i sur., 2003.; Lin i sur., 2003.; Boder i sur., 2005.). Za razliku od Flo1 sustava koji je pogodan za imobilizaciju preko N-terminalnog kraja heterolognog proteina (Kondo i Ueda, 2004.), fuzioniranje s Aga2 podjedinicom omogućuje imobilizaciju preko C- ili N-terminalnog kraja heterolognog proteina. Neki od ostalih GPI-vezanih proteina, kao što su Cwp2 i Sed1, bolji su nosači nego  $\alpha$ -aglutinin i povećavaju uspješnost ekspresije heterolognog proteina do osam puta (van der Vaart i sur., 1997.). Za uspješnu imobilizaciju preko N-terminalnog dijela heterolognog proteina, heterologni proteini fuzioniraju se s proteinima Pir porodice koji na N-terminalnom kraju sadrže karakteristične sekvence duljine dvanaest aminokiselina koje se ponavljaju od dva do jedanaest puta. Upravo zato je ovaj sustav osobito pogodan za imobilizaciju enzima čije se aktivno mjesto nalazi blizu njihovog C-terminalnog dijela. Gen koji kodira za heterologni protein se može ugraditi i unutar sekvence gena koji kodira za Pir protein (Lozančić i sur., 2019.) (Slika 3.).



**Slika 3. Shematski prikaz vezanja heterolognih proteina na površinu stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*** (Lozančić i sur., 2019.) GPI - protein stanične stijenke vezan preko GPI-sidra; PIR - protein stanične stijenke Pir porodice; RP -rekombinantni protein koji se ugrađuje u staničnu stijenku; Aga1, Aga2, Flo1- proteini stanične stijenke.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- agaroza – Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
- agar – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- D(+) glukoza bezvodna – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- kvašćev ekstrakt – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- histitin, leucin, triptofan, uracil – Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
- restriksijski enzim BglI – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
- standard za DNA elektroforezu (1kB DNA ladder) – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
- standard za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- amonijev persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, Triton X-100, akrilamid,  $\beta$ -merkaptetoetanol i Na-dodecilsulfat – Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
- N, N, N, N' – tetrametil etilendiamin (TEMED) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- Biorad Clarity Western otopine za razvijanje blota – Bio-Rad (USA)
- anti-HA peroksidaza antitijela – Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
- kit za izolaciju plazmida iz stanica *E.coli* NucleoSpin® Plasmid – Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)

Sve ostale kemikalije korištene tijekom eksperimentalnog rada nabavljene su od standardnih dobavljača i analitičke su čistoće.

#### 3.1.2 Uređaji

- NanoDrop One – ThermoFischer
- BioSpectrometer® basic – Eppendorf
- C-DiGit® Blot Scanner – LI-COR Biosciences

### 3.1.3. Laboratorijski sojevi

#### a) Bakterijski soj

Genotip bakterijskog soja *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) korišten za umnažanje plazmida:

F–  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK–, mK+) phoA supE44  $\lambda$ -thi-1 gyrA96 relA1

#### b) Sojevi kvasca

Genotipovi sojeva kvasca korištenih u ovom eksperimentu prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Genotipovi korištenih sojeva kvasca

SOJ KVASCA	GENOTIP
SEY6210 wt	MAT $\alpha$ ; <i>leu2-3,112 ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9 lys2-801; GAL</i>
BY4741 <i>pmt1</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; pmt1::kanMX4</i>
XMA0-2LA <i>pmt2</i>	MAT $\alpha$ ; <i>leu2-3,112 ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9 lys2-801; GAL; pmt2::LEU2</i>
BY4741 <i>pmt3</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; pmt3::kanMX4</i>
XMA0-4TA <i>pmt4</i>	MAT $\alpha$ ; <i>leu2-3,112 ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9 lys2-801; GAL; pmt4::TRP1</i>

### 3.1.4. Hranjive podloge

#### a) hranjive podloge za uzgoj bakterija (LB):

**Tablica 2.** Sastav hranjive podloge (na 200 mL)

LB podloga	baktotripton	Kvaščev ekstrakt	NaCl	Agar
tekuća	2 g	1 g	1 g	-
kruta	2 g	1 g	1 g	3 g

Nakon što se svi sastojci podloge dobro otope u vodi (Tablica 2.), hranjive podloge steriliziraju se u autoklavu 20 minuta pri 121°C i 1 atm. Nakon sterilizacije, u ohlađene podloge se dodaje ampicilin koncentracije 100 mg/mL u omjeru 1 µL ampicilin na 1 mL podloge.

#### b) hranjive podloge za uzgoj kvasaca (YNBP):

**Tablica 3.** Sastav hranjive podloge (na 500 mL).

YNB podloga	YNB-AA/AS	„drop-out“	Aminokiseline			agar	glukoza
			Uracil (Ura)	Leucin (Leu)	Triptofan (Trp)		
tekuća	3,35 g	0,8 g	0,04 g	0,08 g	0,04 g	-	-
kruta	3,35 g	0,8 g	0,04 g	0,08 g	0,04 g	7,5 g	10 g

Nakon što su se svi sastojci (Tablica 3.) dobro otopili u vodi, podloga se sterilizira u autoklavu 20 minuta pri 121°C i 1 atm. Sterilna otopina 50% glukoze dodaje se naknadno, neposredno prije naciepljivanja tako da konačna koncentracija iznosi 2%. U sve podloge dodaje se smjesa „drop-out“ (Tablica 4.) što je smjesa različitih vitamina i aminokiselina u koncentracijama potrebnim za rast kvasaca.



**Tablica 4.** Sastav „Drop-out“ smjese.

Adenin	3,0 g	L-metionin	2,0 g
L-arginin	2,0 g	L-fenilalanin	2,0 g
L-asparagin	2,0 g	L-prolin	2,0 g
L-asparaginska kis.	6,0 g	L-serin	6,0 g
L-cistein	2,0 g	L-treonin	2,0 g
L-glutamin	2,0 g	L-tirozin	2,0 g
L-glutaminska kis.	2,0 g	L-valin	2,0 g
L-glicin	2,0 g	p-aminobenzojeva kis.	0,2 g
L-izoleucin	2,0 g	Inozitol	2,0 g

**c) hranjiva podloga za indukciju *PHO5* promotora (podloga bez fosfata):****Tablica 5.** Sastav Wickerhamove sintetske minimalne podloge (podloga bez fosfata, 500 mL)

Podloga bez fosfata	KCl	Asparagin	MgSO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	NaCl	CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	Na-citrat	„drop-out“	Elementi u tragovima
tekuća	0,5 g	1 g	0,25 g	0,05 g	0,05 g	2,941 g	1 g	1 mL

Najprije je potrebno otopiti sve krute sastojke (Tablica 5.) hranjive podloge u 480 mL vode. Nakon otapanja krutih sastojaka, u podlogu se dodaje 1 mL otopine elemenata u tragovima (tablica 6.). Zatim se pH podloge podešava na 5,5 dodavanjem koncentrirane HCl. Hranjiva podloga sterilizira se u autoklavu 20 minuta pri 121°C i 1 atm. U steriliziranu podlogu se dodaju otopine vitamina riboflavina (tablica 7.) i biotina (tablica 8.) sterilizirane filtracijom.

**Tablica 6.** Sastav otopine „elementi u tragovima“.

<b>Komponenta otopine</b>	<b>Koncentracija</b>
borna kiselina	0,25 g/L
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
KJ	0,05 g/L
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L

**Tablica 7.** Sastav otopine „riboflavin“.

<b>Komponenta otopine</b>	<b>Koncentracija</b>
riboflavin	0,05 g/L
p-aminobenzojeva kis	0,05 g/L
inozitol	0,5 g/L

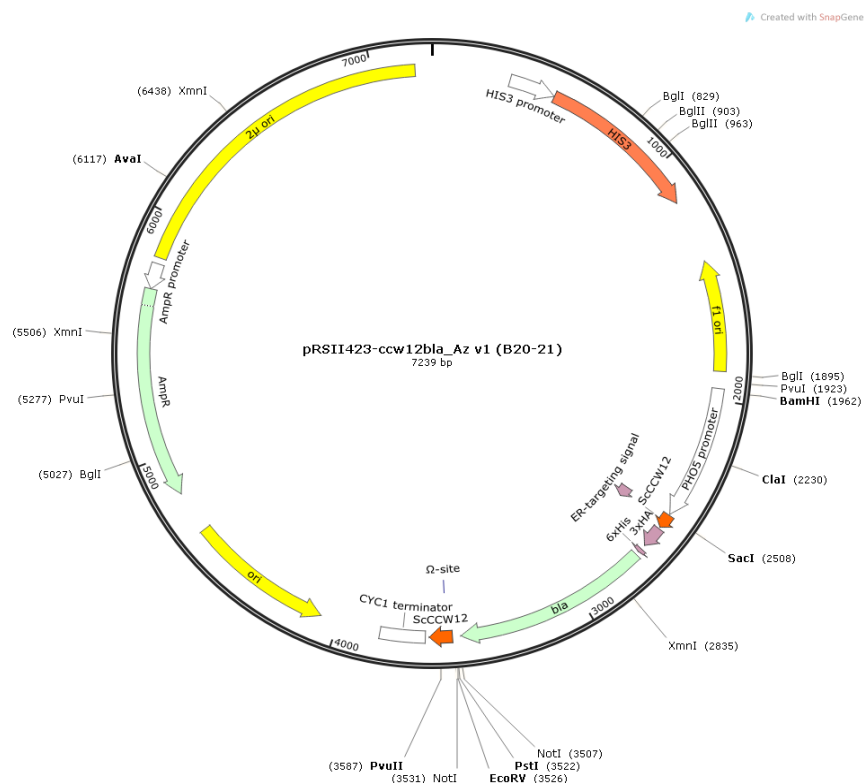
**Tablica 8.** Sastav otopine „biotin“.

<b>Komponenta otopine</b>	<b>Koncentracija</b>
biotin	0,02 g/L
Ca-pantotenat	4 g/L
niacin (nikotinska kis.)	4 g/L
piridoksal-HCl	4 g/L
tiamin-HCl	4 g/L
folna kiselina	0,02 g/L

### 3.1.5. Plazmidi

#### a) pRSII423 *CCW12bla*

Plazmid pRSII423 *CCW12bla* (slika 4.) sadrži gen *bla* koji kodira za  $\beta$ -laktamazu fuzioniran s dijelom gena *CCW12* koji kodira za sekvencu kojom se C-terminalni kraj proteina veže za GPI-sidro. Plazmid je konstruiran PCR metodom i umnožen u stanicama *E. coli*. Kako bi se selekcionirale transformirane stanice, plazmid sadrži dva selektivna markera, jedan za bakterijske stanice i jedan za kvaščeve stanice. Selektivni marker za bakterijske stanice omogućuje rast bakterijskih stanica na podlogama s antibiotikom ampicilinom (Amp<sup>R</sup>). Selektivni marker za kvaščeve stanice je gen *HIS3* pomoću kojeg stanice mogu rasti na podlogama bez histidina (YNBP His<sup>-</sup>). Na kraju sekvence Ccw12 proteina nalaze se niz od šest histidina (-His tag) i -HA oznaka koju prepoznaju specifična antitijela. Gen *CCW12bla* pod kontrolom je *PHO5* promotora koji inducira ekspresiju gena u podlogama bez fosfata.



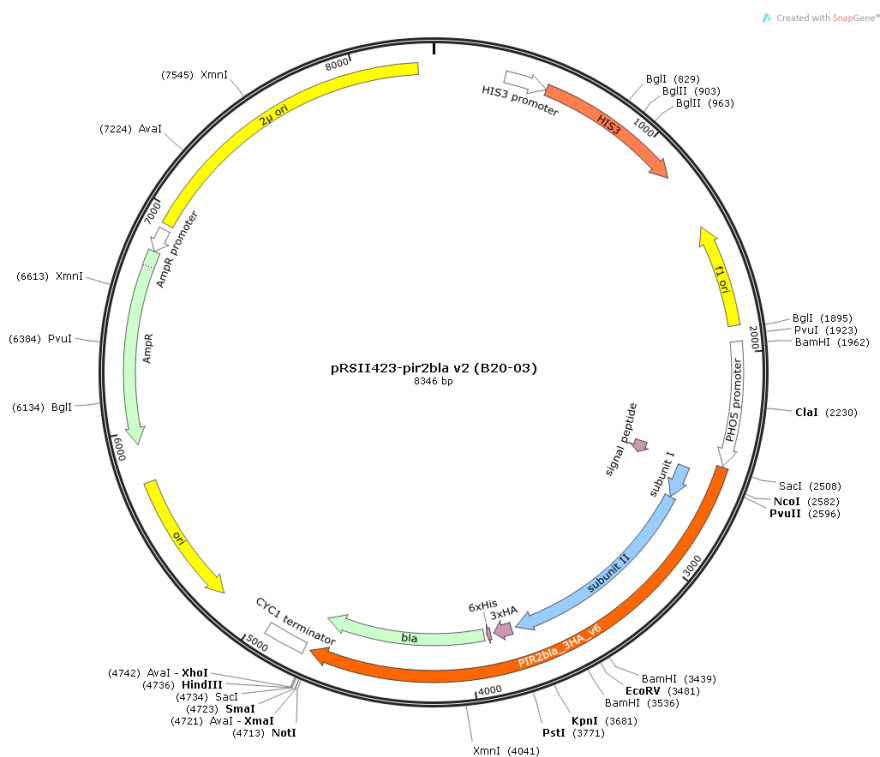
Slika 4. Plazmid pRSII423 *CCW12bla*

## b) pRSII423 *CCW12*

Plazmid pRSII423 *CCW12* sadrži umjesto gena koji kodira za rekombinantni protein kopiju dijela nativnog gena *CCW12* koji kodira za sekvencu kojom se protein veže na GPI-sidro.

## c) pRSII423 *PIR2bla*

Plazmid pRSII423 *PIR2bla* (slika 5.) sadrži gen *bla* koji je fuzioniran s genom *PIR2* čijom ekspresijom nastaje rekombinantni protein koji se kovalentno veže u staničnu stijenku preko svog N-terminalnog dijela. Plazmid je konstruiran PCR metodom i umnožen u stanicama *E. coli*.



Slika 5. Plazmid pRSII423 *PIR2bla*

## d) pRSII423 *PIR2*

Plazmid pRSII423 *PIR2* sadrži umjesto gena koji kodira za rekombinantni protein kopiju gena *PIR2* koji kodira za nativni protein stanične stijenke Pir2.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Izolacija plazmida iz stanica *E. coli***

Stanice *E. coli* koje sadrže željene plazmide precjepljene su s trajnih kultura na čvrste LB hranjive podloge s ampicilinom i preko noći inkubirane na 37°C. Sljedeći dan porasle kolonije nacjepljene su u 5 mL LB tekuće hranjive podloge s ampicilinom i ponovno preko noći inkubirane u tersilici na 180 rpm pri 37 °C. Iz takvih prekonocnih kultura izolirani su plazmidi pomoću „NucleoSpin® Plasmid“ kita (Macherey-Nagel) prema uputama proizvođača. Izolirani plazmidi čuvaju se u zamrzivaču pri -20°C.

### **3.2.2. Određivanje koncentracije DNA**

Koncentracija plazmidne DNA određivana je pomoću „NanoDrop One“ uređaja prema uputama proizvođača (ThermoFischer).

### **3.2.3. Restriksijska analiza izoliranih plazmida**

Kako bi se provjerila ispravnost plazmida, provodi se restriksijska analiza. Analiza se provodi pomoću restriksijskog enzima BglI koji cijepa plazmide na odgovarajućim mjestima. Restriksijske smjese (enzim, plazmid, odgovarajući pufer i sterilna voda) (tablica 9.) inkubirane su preko noći u termobloku pri 37°C. Veličine fragmenata dobivenih restrikcijom određene su gel elektroforezom.

**Tablica 9.** Sastav restrikcijske smjese.

Restrikcijska smjesa	Sastav
<i>CCW12bla</i>	0,6 $\mu$ L plazmida, 0,3 $\mu$ L enzima BglI, 1 $\mu$ L pufera, 8,1 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
<i>CCW12</i>	0,8 $\mu$ L plazmida, 0,3 $\mu$ L enzima BglI, 1 $\mu$ L pufera, 7,9 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
<i>PIR2bla</i>	0,8 $\mu$ L plazmida, 0,3 $\mu$ L enzima BglI, 1 $\mu$ L pufera, 7,9 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
<i>PIR2</i>	0,7 $\mu$ L plazmida, 0,3 $\mu$ L enzima BglI, 1 $\mu$ L pufera, 7,9 $\mu$ L H <sub>2</sub> O

### 3.2.4. DNA elektroforeza

Veličine fragmenata dobivenih restrikcijskom analizom određene su DNA gel elektroforezom. Za gel elektroforezu koristi se 1%-tni agarozni gel pripremljen s TAE puferom (40 mmol/L TRIS-HAc pH=8,0; 1 mmol/L EDTA). U uzorke plazmida i standarda dodaje se komercijalna otopina boja (Gel Loading Dye, New England BioLabs) koja omogućuje praćenje elektroforeze te se uzorci unose u jačice gela. Elektroforeza se provodi pri 90 V u TAE puferu. Nakon završetka elektroforeze, slijedi vizualizacija DNA uranjanjem gela u otopinu etidij-bromida (100 mg/mL). Etidij-bromid interkalira u molekule DNA te apsorbira UV zračenje i emitira svjetlost što omogućuje vizualizaciju vrpce DNA u gelu.

### 3.2.5. Transformacija kvašćevih stanica LiAc metodom

Kako bi se transformirale stanice kvasca (*wt*, *pmt1*, *pmt2*, *pmt3* i *pmt4*) (Gietz i Schiestl, 1995.), stanice su uzgojene do logaritamske faze rasta ( $OD_{600} \sim 2$ ) u 10 mL YNB hranjive podloge bez histidina. Suspenzija stanica je zatim centrifugirana 5 minuta na 6000 okretaja/min nakon čega je odbačen supernatant. Talog je resuspendiran u 10 mL sterilne destilirane vode te ponovno centrifugiran 5 min na 6000 okretaja/min. Nakon odbacivanja supernatanta, talog je resuspendira u 4 mL 0,1 M LiAc i po 1 ml suspenzije stanica je prenesen u sterilne eppendorf epruvete. Suspenzija je ponovno centrifugirana 30 sekundi na 8000 okretaja/min uz odbacivanje supernatanta. Na talog je sljedećim redoslijedom dodano: 240  $\mu$ L

50%-tnog PEG-a, 36  $\mu$ L 1 M LiAc, 25  $\mu$ L jednolančane „carrier“ DNA i 50  $\mu$ L smjese odgovarajućeg plazmida i sterilne vode. Prije upotrebe, odgovarajući volumen jednolančane „carrier“ DNA (laxDNA) potreban za transformaciju je prokuhan na 100°C 10-15 min i ohlađen. Transformacijska smjesa je vorteksirana dok ne postane homogena te je inkubirana 30 minuta pri 30°C. Slijedi toplinski šok pri čemu je transformacijska smjesa inkubirana 20 minuta pri 42°C. Nakon 20 minuta, suspenzija stanica je centrifugirana na 8000 okretaja/min 15 sekundi i uklonjen je supernatant. Talog je resuspendiran u 1 mL sterilne vode i 100  $\mu$ L suspenzije je naciepljeno na krute selektivne hranjive podloge (YNB His<sup>-</sup>). Ploče su inkubirane u termostatu na 30°C do porasta kolonija.

### **3.2.6. Uzgoj kvasaca uz indukciju *PHO5* promotora**

Kvaščev promotor *PHO5* jaki je promotor čija indukcija ovisi o unutarstaničnoj koncentraciji fosfata. Kako bi došlo do njegove aktivacije stanice kvasca moraju se uzgajati u hranjivim podlogama bez fosfata. Stanice su najprije uzgajane u 10 mL hranjive podloge obogaćene fosfatom (YNBP His<sup>-</sup>) do logaritamske faze rasta ( $OD_{600} \sim 2$ ). Nakon uzgoja, izračunat je potreban volumen inokuluma, tako da u željenom volumenu podloge bez fosfata  $OD_{600}$  stanica bude 0,3/mL, koji je zatim prenesen u sterilne falkonice. Suspenzija stanica centrifugirana je 5 minuta na 3000 okretaja/min nakon čega je odbačen supernatant. Talog stanica resuspendiran je u 10-15 mL sterilne vode i ponovno centrifugiran 5 minuta pri 3000 okretaja/min nakon čega je supernatant odbačen. Kako bi došlo do maksimalne razine indukcije promotora *PHO5*, talog stanica resuspendiran je u 10 mL podloge bez fosfata te uzgajan preko noći na tresilici pri 30°C kako bi potrošile unutarstanične zalihe fosfata.

### **3.2.7. Izolacija stijenki i proteina stijenki kvasca *S. cerevisiae***

Za izolaciju stijenki i proteina stijenki, kvaščeve stanice uzgojene su do logaritamske faze rasta ( $OD_{600} \sim 2$ ) u 50 mL hranjive podloge bez fosfata u Erlenmeyerovim tikvicama kao što je opisano u odjeljku 3.2.6. Nakon uzgoja, suspenzija stanica je centrifugirana 5 minuta pri 3000 okretaja/min nakon čega je odbačen supernatant. Talog je ispran dva puta s 30 mL destilirane vode i dva puta s 10-15 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH=8,0. Između svakog koraka ispiranja stanice su centrifugirane 5 minuta pri 3000 okretaja/min i supernatant je odbačen. Po

završetku ispiranja, suspenzija stanica je prebačena u posebne kivete za razbijanje stanica i u takvu suspenziju su dodane staklene kuglice u volumenu jednakom 75-100% volumena suspenzije stanica. Stanice su razbijene pomoću BeadBug TM uređaja u dva intervala po 3 minute pri 4000 rpm. Nakon svakog intervala suspenzija je hlađena u ledu kako bi se ograničila aktivnost proteaza. Staklene kuglice su odvojene od stanica dekantiranjem, dok je intracelularni sadržaj odvojne od stijenki centrifugiranjem 1 minutu pri 8000 okretaja/min. Talog stijenki ispiran je četiri puta sa po 10 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH=8,0.

### **3.2.8. SDS tretman stijenki**

Talog stijenki resuspendiran je u 1 mL Laemmli pufera (50 mM Tris-HCl pH=6,8; 2 mM EDTA III; 2% SDS; 0,001% bromfenol plavo i 5%  $\beta$ -merkaptioetanol). Suspenzija je kuhana u vrijućoj vodenoj kupelji 10 minuta, nakon čega je supernatant odvojen centrifugiranjem 2-3 minute na 8000 okretaja/min. U supernatantu se nalaze nekovalentno vezani proteini koji se čuvaju na -20°C u zamrzivaču. Talog je ponovno resuspendiran u svježih 1 mL Laemmli pufera i kuhan uz izdvajanje supernatanta. Talog je ispran četiri puta sa po 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH=8,0.

### **3.2.9. $\beta$ -1,3-glukanazni tretman stijenki**

Nakon SDS tretmana, talog stijenki je ispran sa 1 mL Tris-HCl pufera pH=7,4 te potom resuspendiran u istom puferu (75 OD jedinica u 100  $\mu$ L pufera). Zatim je dodano 2  $\mu$ L  $\beta$ -glukanaze (9 IU) u uzorak koji je nadalje inkubiran 2 sata na tresilici pri 37°C. Uzorak je potom centrifugiran 5 minuta pri 8000 okretaja/min. Supernatant sadrži ekstrahirane proteine koji su u stijenku bili vezani preko ostataka GPI-sidra.

### **3.2.10. NaOH tretman stijenki**

Nakon izdvajanja nekovalentno vezanih proteina SDS tretmanom, talog stijenki je ispran jedan put s destiliranom vodom i zatim resuspendiran u 50  $\mu$ L 30 mM NaOH. Suspenzija je preko noći inkubirana na +4°C. Nakon prekonoćne inkubacije, suspenzija je centrifugirana 5 minuta



pri 8000 okretaja/min uz izdvajanje supernatanta. Supernatant sadrži ekstrahirane proteine stijenke koji su u stijenkama bili vezani kovalentnom vezom osjetljivom na djelovanje lužine.

### **3.2.11. SDS-PAGE elektroforeza**

Gel za elektroforezu sastoji se od gela za razdvajanje (donji gel sa 12% akrilamida) i gela za sabijanje (gornji gel sa 5% akrilamida). Gel za razdvajanje sastoji se od: 2,5 mL TRIS-HCl pufera (1,5 M, pH=8,8), 3 mL 30% akrilamida, 2 mL destilirane vode, 5  $\mu$ L N, N, N, N' – tetrametil etilendiamina (TEMED) i 38  $\mu$ L APS-a. Gel polimerizira jedan sat u kalupu za pripremu gela te se njegova površina prekriva izopropanolom kako bi se spriječio kontakt površine gela sa kisikom. Nakon završetka polimerizacije izopropanol se uklanja. Gel za sabijanje sastoji se od: 4,26 mL TRIS-HCl pufera (0,5 M, pH=6,8), 600  $\mu$ L 30% akrilamida, 5  $\mu$ L N, N, N, N' – tetrametil etilendiamina (TEMED) i 45  $\mu$ L APS-a. On služi za sabijanje proteina u uzorku u usku frontu koja ulazi u gel za razdvajanje. Prije nanošenja uzoraka u gel, u uzorke proteina je dodana odgovarajuća količina Laemmli pufera. Elektroforeza je provedena u Sigma sustavu na 180 V, 150 mA, 90 minuta u puferu za elektroforezu (25 mM TRIS-glicin pufer pH=6,8; 0,1% SDS).

### **3.2.12. Western blot**

Odmah po završetku elektroforeze, gel je prebačen u sustav za western blot. Uređaj Trans-blot® Turbo™ sustav (BioRad) korišten za provedbu western blota vrši transfer proteina iz gela na nitroceluloznu membranu u električnom polju. Unutar kadice složeno je redom: osam filter papira predhodno namočenih u TRIS-glicinski pufer (25 mM TRIS, 200 mM glicin, 20% metanol) nitrocelulozna membrana, gel te ponovno osam filter papira. Kadica je zatvorena i pokrenut je program za transfer (25 minuta, 1,0 A i 25V). Nakon transfera nitrocelulozna membrana obojena je bojom Ponceau S (0,1 g/mL u 5% HAc) do pojave proteinskih vrpca. Položaj proteinskih standarda na membrani je zabilježen grafitnom olovkom. Membrana je zatim potpuno odbojena ispiranjem destiliranom vodom i inkubirana preko noći u 10 mL pufera za blokiranje (50 mM TRIS-HCl pufer pH=7,5, 150 mM NaCl, 0,1% TRITON X-100 i 1% obrano mlijeko u prahu) u hladnjaku na +4°C. Sljedeći dan pufer za blokiranje je odliven i dodano je novih 5 mL pufera za blokiranje i 4  $\mu$ L anti-HA antitijela za proteine ekstrahirane SDS-om,

odnosno 5  $\mu\text{L}$  anti-HA antitijela za proteine ekstrahirane pomoću NaOH. Membrana je inkubirana na sobnoj temperaturi na tersilici 60-90 minuta te isprana tri puta po 5-10 minuta sa 5 mL pufera za blokiranje. Western Sure Pen olovkom označen je položaj standarda na membrani i zatim je membrana inkubirana 5 minuta u BioRad Clarity Western otopini za razvijanje blota. Uporabom C-digit skenera vizualiziran je položaj proteinski vrpce na koje su se vezala antitijela.

### **3.2.13. Mjerenje aktivnosti $\beta$ -laktamaze sa stanicama kvasca**

Kao supstrat za  $\beta$ -laktamazu korištena je 0,1 mM otopina nitrocefina. Nitrocefin apsorbira svjetlost pri 217 nm te njegovom razgradnjom nastane produkt koji apsorbira svjetlost pri 486 nm. Mjerenjem apsorbancije jedne od te dvije molekule može se pratiti tijek reakcije. U ovom eksperimentu spektrofotometrijski se mjerila količina nastalog produkta pri 486 nm.

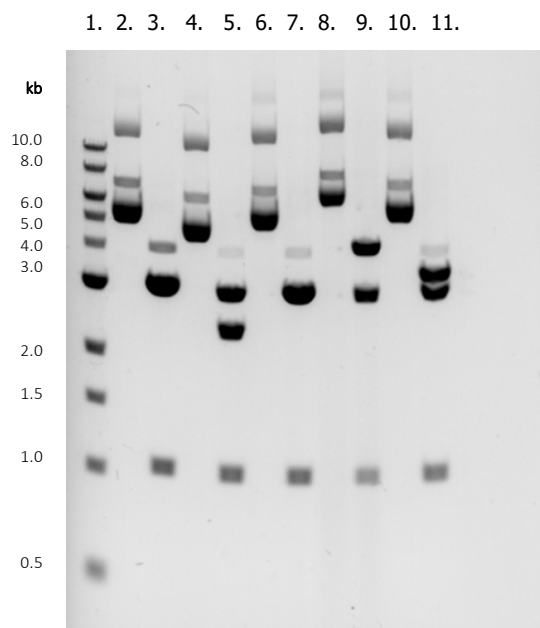
Stanice kvasca su uzgojene uz indukciju promotora *PHO5* kao što je opisano u odjeljku 3.2.6. Nakon uzgoja, stanice su odvojene od podloge centrifugiranjem te jedan put isprane sterilnom vodom, a drugi put 100 mM K-fosfatnim puferom pH=7,0. Isprane stanice su resuspendirane u istom puferu na konačnu koncentraciju od 10 OD/mL. U reakcijsku smjesu je dodano 435  $\mu\text{L}$  100 mM K-fosfatnog pufera pH=7,0 i 15  $\mu\text{L}$  pripremljene suspenzije stanica tako da je konačna koncentracija stanica u reakcijskoj smjesi iznosila 0,3 OD/mL. Prije dodavanja supstrata, reakcijska smjesa je predinkubirana 2 minute na termobloku pri 30°C. Nakon predinkubacije dodano je 50  $\mu\text{L}$  0,1 mM nitrocefina i provedena je reakcija 5 minuta na termobloku pri 30°C uz miješanje pri brzini od 1200 rpm. Reakcija je zaustavljena centrifugiranjem reakcijske smjese 15 sekundi pri 8000 okretaja/min kako bi se supstrat fizički odvojio od stanica, odnosno enzima. Koncentracija nastalog produkta mjerena je spektrofotometrijski pri 486 nm.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Restriksijska analiza i gel elektroforeza plazmidne DNA

Kako bi provjerili ispravnost izoliranih plazmida pRSII423 *PIR2bla*, pRSII423 *PIR2*, pRSII423  $\Delta$ *bla*, pRSII423 *CCW12bla* i pRSII423 *CCW12*, provedena je restriksijska analiza pomoću enzima BglI. Nakon restrikcije provedna je gel elektroforeza kako bi se utvrdila veličina dobivenih fragmenata. Ako su plazmidi odgovarajućih veličina očekuju se: kod plazmida pRSII423 *PIR2bla* tri fragmenata veličine 4239 pb, 3041 pb i 1066 pb, kod plazmida pRSII423 *PIR2* tri fragmenata veličine 3429 pb, 3041 pb i 1066 pb, kod plazmida pRSII423  $\Delta$ *bla* tri fragmenata veličine 3060 pb, 3041 pb i 1066 pb, kod plazmida pRSII423 *CCW12bla* tri fragmenata veličine 3132 pb, 3041 pb i 1066 pb i kod plazmida pRSII423 *CCW12* tri fragmenata veličine 3041 pb, 2184 pb i 1066 pb.

Iz slike 6. možemo vidjeti da su dobiveni fragmenti plazmida odgovarajuće veličine.



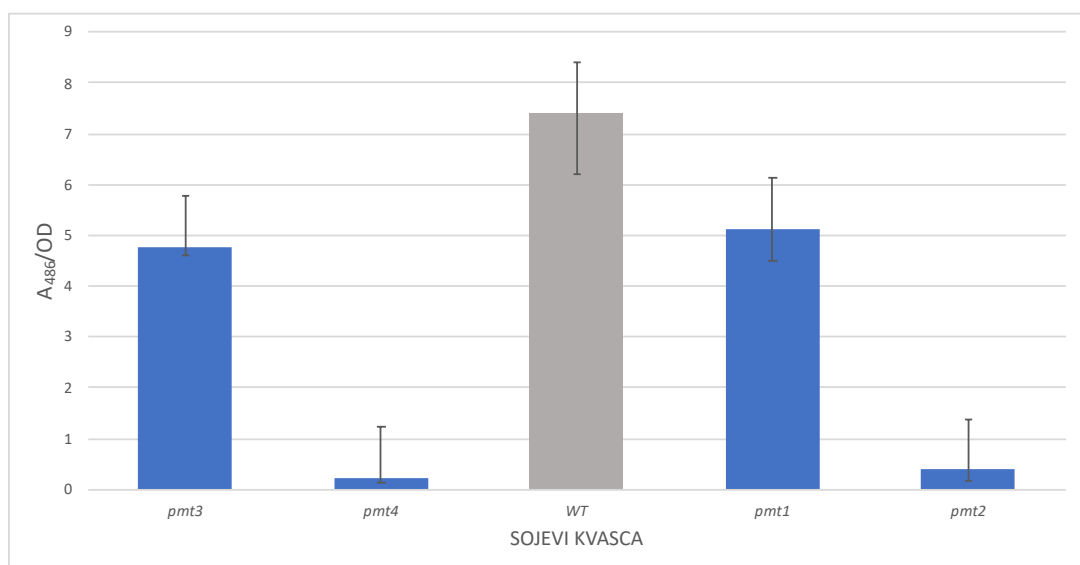
**Slika 6. Rezultati restriksijske analize s BglI enzimom.** Uzorci: 1. standard DNA Ladder (1kb), 2. nepocijepani plazmid pRSII423 *CCW12bla*, 3. plazmid pRSII423 *CCW12bla* pocijepan enzimom BglI, 4. nepocijepani plazmid pRSII423 *CCW12*, 5. plazmid pRSII423 *CCW12* pocijepan enzimom BglI, 6. nepocijepani plazmid pRSII423  $\Delta$ *bla*, 7. plazmid pRSII423  $\Delta$ *bla* pocijepan enzimom BglI, 8. nepocijepani plazmid pRSII423 *PIR2bla*, 9. plazmid pRSII423 *PIR2bla* pocijepan enzimom BglI, 10. nepocijepani plazmid pRSII423 *PIR2*, 11. plazmid pRSII423 *PIR2* pocijepan enzimom BglI.

## 4.2. Transformacija stanica kvasaca

Transformacija kvasaca provedena je prema postupku opisanom u odjeljku 3.2.5. Dobiveno je više od deset transformanata. Sa svake ploče odabrano je po osam transformanata koji su naciepljeni na svježe selektivne ploče kako bi povećali broj stanica koje se mogu koristiti za inokulaciju tekuće podloge.

## 4.3. Mjerenje aktivnosti transformiranih stanica

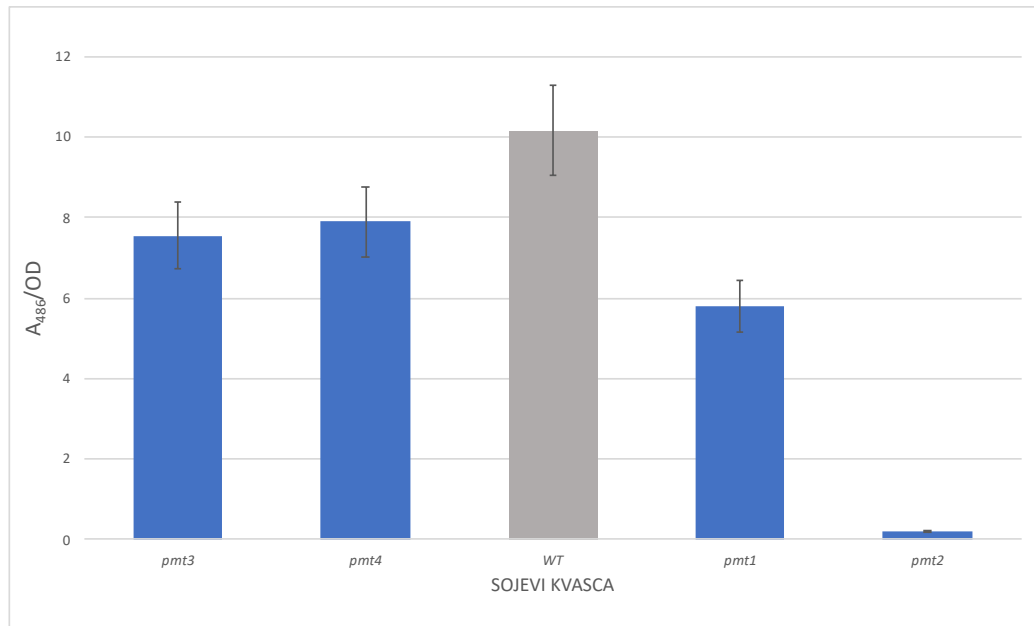
Transformirane kvaščeve stanice uzgajane su u tekućim hranjivim podlogama (YNBP His<sup>-</sup>). Nakon što su stanice postigle logaritamsku fazu rasta, isprane su i prebačene u podlogu bez fosfata (P<sup>-</sup> podloga) za indukciju *PHO5* promotora. Iz takvih kultura, stanice su odvojene centrifugiranjem te isprane 100 mM K-fosfatnim puferom pH=7,0. Stanice su resuspendirane u istom puferu na konačnu koncentraciju od 10 OD/mL. U reakcijsku smjesu dodano je 15 µL suspenzije stanica koncentracije 10 OD/mL (koncentracija stanica u reakcijskoj smjesi iznosi 0,3 OD/mL), 435 µL 100 mM K-fosfatnog pufera pH=7 te 50 µL 0.1 M otopine supstrata nitrocefina. Mjerenje je provedeno u dvije paralele.



**Slika 7. Rezultati mjerenja aktivnosti Pir2bla rekombinantnog enzima eksprimiranog na površini stanica divljeg tipa i različitih *pmt* mutanata.** Aktivnost je mjerena spektrofotometrijski pri 486 nm.

Iz slike 7. vidljivo je kako rekombinantni enzim eksprimiran u stanicama divljeg tipa ima veću aktivnost od enzima eksprimiranih u stanicama mutanata. Enzimi eksprimirani u stanicama mutanata *pmt3* i *pmt1* imaju približno jednaku aktivnost dok enzimi eksprimirani u stanicama

mutanata *pmt2* i *pmt4* imaju znatno manju aktivnost. Niska aktivnost enzima eksprimiranog u stanicama *pmt2* i *pmt4* mutanata mogla bi se objasniti malom količinom enzima u staničnoj stijenci, njegovom nepravilnom konformacijom ili otpuštanjem enzima u podlogu.



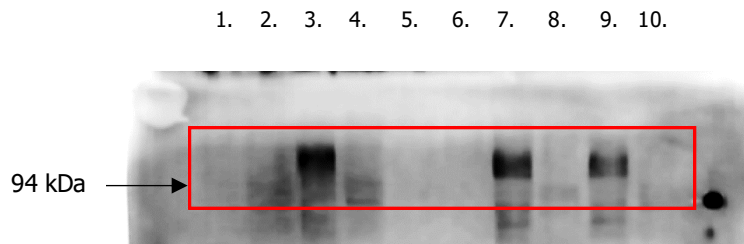
**Slika 8. Rezultati mjerenja aktivnosti Ccw12bla rekombinantnog enzima eksprimiranog na površini stanica divljeg tipa i različitih *pmt* mutanata.** Aktivnost je mjerena spektrofotometrijski pri 486 nm.

Iz slike 8. vidljivo je kako enzim Ccw12bla eksprimiran u stanicama divljeg tipa ima najveću aktivnost u usporedbi s enzimima eksprimiranim u stanicama mutanata, kao što je utvrđeno i za Pir2bla enzim. Enzimi eksprimirani u stanicama *pmt3* i *pmt4* mutanata imaju približno jednake aktivnosti, enzimi eksprimirani u stanicama *pmt1* nešto manju, a najmanju aktivnost pokazuju enzimi eksprimirani u stanicama *pmt2* mutanata, tj. možemo reći da u stanicama *pmt2* mutanata praktički nema detektirane aktivnost.

#### 4.4. Određivanje količine enzima u staničnoj stijenci kvasaca

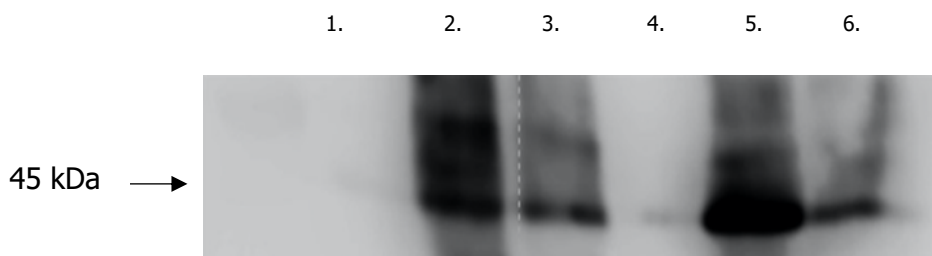
Kako bi ispitali kolika se količina enzima ugradila u staničnu stijenu, potrebno je najprije izolirati proteine iz stijenci transformiranih kvasaca. Transformirani kvasci su uzgajani na isti način kao i za mjerenje aktivnosti i izolacija stijenci je provedena kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Talog stijenci prvo je tretiran SDS-om te potom s NaOH, postupkom opisanim u odjeljku 3.2.7., te su izolirani proteini razdvojeni SDS elektroforezom i analizirani western blot analizom. Na blotu je enzim detektiran pomoći HA-antitijela koja se specifično

veže za HA-sekvencu na enzimu. Western blot analizom se dokazuje prisutnost enzima u stijenci te se može usporediti intenzitet vrpce u ekstraktima proteina stijenci mutanata sa intenzitetom proteinskih vrpce u ekstraktu proteina stijenci divljeg tipa kvasca.



**Slika 9. Rezultati western blot analize NaOH ekstrakta proteina stijenci wt i *pmt* mutanata koji ekspimiraju Pir2bla rekombinantni enzim.** Uzorci: 1. *pmt4*+Pir2bla, 2. *pmt4*+Pir2, 3. wt+Pir2bla, 4. wt+Pir2, 5. *pmt2*+Pir2bla, 6. *pmt2*+Pir2, 7. *pmt1*+Pir2bla, 8. *pmt1*+Pir2, 9. *pmt3*+Pir2bla, 10. *pmt3*+Pir2.

Na slici 9. prikazani su rezultati western blot analize proteina stijenci *pmt* mutanata koji ekspimiraju Pir2bla rekombinantni enzim. Vidljivo je u kojim mutantima je došlo do ekspresije i ugradnje enzima u staničnu stijenu. Kod *pmt2* i *pmt4* mutanata nisu vidljive proteinske vrpce što znači da nije došlo do ugradnje enzima u stijenu ili da je količina ugrađenih proteina premala da bi se mogla detektirati ovom metodom, dok su kod stanica divljeg tipa kvasca, *pmt3* i *pmt1* mutanata vidljive proteinske vrpce. Dobiveni rezultati western blota su u skladu s rezultatima mjerenja aktivnosti. Iako western blot nije precizna kvantitativna metoda, možemo po intenzitetu vrpce procijeniti koliko je enzima ugrađeno u stijenu. Najjači intenzitet proteinske vrpce vidljiv je kod stanica divljeg tipa kvasca te možemo zaključiti da se u njegove stijene ugradila najveća količina enzima. Intenzitet proteinskih vrpce u ekstraktima *pmt1* i *pmt3* mutanata u usporedbi s divljim tipom kvasca je manji te možemo zaključiti da se manja količina enzima ugradila u stijene ovih mutanata.



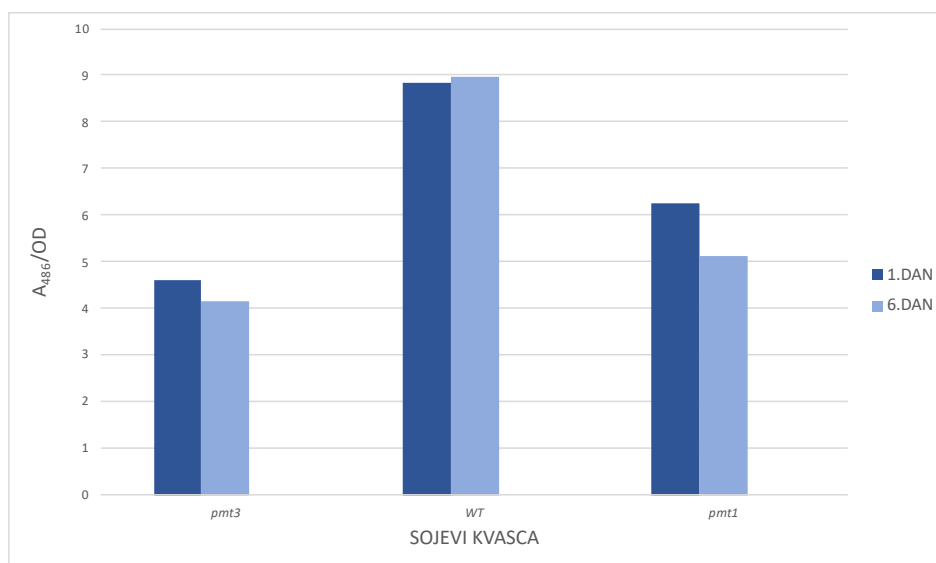
**Slika 10. Rezultati western blot analize gluklaznog ekstrakta proteina stijenci wt i *pmt* mutanata koji ekspimiraju Ccw12bla rekombinantni enzim.** Uzorci: 1.

wt+Ccw12, 2. wt+Ccw12bla, 3. *pmt1*+Ccw12bla, 4. *pmt2*+Ccw12bla, 5. *pmt3*+Ccw12bla, 6. *pmt4*+Ccw12bla.

Na slici 10. prikazani su rezultati western blot analize proteina stijenki *pmt* mutanata koji eksprimiraju rekombinantni enzim Ccw12bla. Na temelju dobivenih rezultata možemo vidjeti kod kojih mutanata je došlo do ekspresije i ugradnje enzima te otprilike procijeniti količinu ugrađenih enzima prema intenzitetu vrpce. Kod *pmt1*, *pmt3* i *pmt4* mutanata vidljive su proteinske vrpce što znači da se enzim uspješno eksprimirao i ugradio u stijenku. Proteinske vrpce izolirane iz stijenki divljeg tipa te *pmt3* i *pmt4* mutanata su otprilike jednakog intenziteta, dok je proteinska vrpca *pmt1* mutanata manje intenzivna u usporedbi s ostalim vrpcama. To znači da se u stanicam divljeg tipa, *pmt3* i *pmt4* mutantima nalazi više enzima nego u *pmt1* mutantima. Kod *pmt2* mutanata nema proteinske vrpce što znači da se enzim nije uspješno ugradio u stijenku ili se nije eksprimirao. Tako dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima mjerenja aktivnosti (slika 8.).

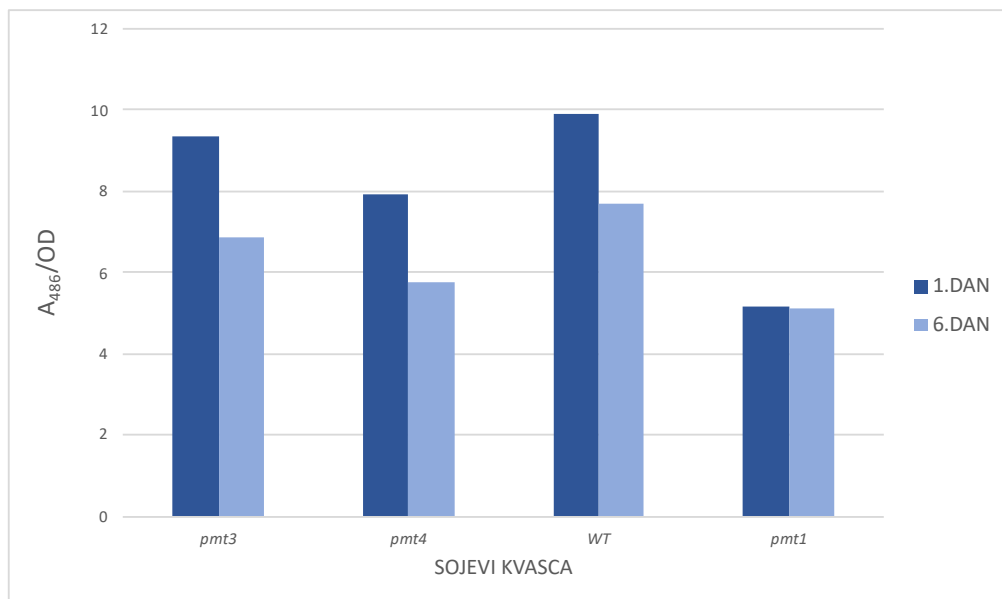
#### 4.5. Ispitivanje stabilnosti enzima

Kako bi se ispitala stabilnost na površini stanica imobiliziranog enzima, suspenziju stanica, resuspenidranu u 100 mM K-fosfatnom puferu pH=7,0, čuva se u hladnjaku na +4°C. Nakon šest dana mjerena je aktivnost stanica prema istom protokolu.



**Slika 11. Rezultati ispitivanja stabilnosti Pir2bla rekombinantnog enzima.**

Iz slike 11. vidljivo je kako se aktivnost enzima smanjuje s vremenom. Nakon 6 dana kod *pmt3* mutanata aktivnost enzima smanjila se za 10% u usporedbi s prvim danom, kod *pmt1* mutanata za 20%, a u stanicama divljega tipa aktivnost enzima ostala je nepromjenjena. To ukazuje da je enzim u *pmt* mutantima i u stanicama divljeg tipa stabilan unutar tjedan dana. Enzimu u *pmt2* i *pmt4* mutantima nije ispitivana stabilnost jer je početna aktivnost bila jako niska.



**Slika 12. Rezultati ispitivanja stabilnosti Ccw12bla rekombinantnog enzima.**

Na slici 12. vidljivo je kako se kod mutanata koji eksprimiraju Ccw12bla enzim nakon 6 dana, za razliku od mutanata s Pir2bla enzimom, aktivnost smanjila za 20-28% u usporedbi s prvim danom mjerenja. Jedini mutant koji ne pokazuje trend padanja aktivnosti je *pmt1* mutant kojima se aktivnost nije značajnije smanjila. Enzimu u *pmt2* mutantu nije ispitivana stabilnost jer je početna aktivnost bila jako niska.



## 5. RASPRAVA

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* modelni je organizam za istraživanje eukariota. Za razliku od bakterija, kvasci posjeduju mehanizme smatanja proteina te sekretorni put sličan višim eukariotima koji im omogućuje odvijanje odgovarajućih posttranslacijskih modifikacija i točno smatanje mnogih proteina sisavaca. U proteklih nekoliko godina, velika pozornost posvećuje se alternativnoj metodi imobilizacije koja se temelji na ugradnji heterolognih proteina u staničnu stijenkku kvasca. Stanična stijenkka kvasca sastoji se od dva sloja, unutarnjeg i vanjskog. Unutarnji sloj sastavljen je od polisaharida  $\beta$ -1,3-glukana,  $\beta$ -1,6-glukana i hitina, a vanjski sloj čine proteini glikozilirani mananom (manoproteini). Proteine stijenkke dijelimo u nekoliko grupacija obzirom na način njihovog vezanja u stijenkku koje može biti kovalentno ili nekovalentno. Jednu grupu kovalentno vezanih proteina čine Pir proteini koji se povezuju na  $\beta$ -1,3-glukan preko glutaminskih ostataka koji se nalaze unutar specifičnih ponavljajućih sekvenci Pir proteina (Ecker i sur., 2006.) te drugu grupu čine GPI-proteini koji se povezuju na  $\beta$ -1,3-glukan preko ostatka GPI-sidra i  $\beta$ -1,6-glukana (Montijn i sur., 1994.; Van der Vaart i sur., 1995.; Kapteyn i sur., 1996.). Geni koji kodiraju za heterologne proteine najčešće se fuzioniraju s dijelovima ili čitavim genima proteina stanične stijenkke. Ekspresija rekombinantnih proteina i njihova ugradnja u staničnu stijenkku kvasca predstavlja novi alat za proizvodnju i primjenu heterolognih proteina. Nedostatci primjene kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u ove svrhe su potencijalna hiperglikozilacija rekombinantnih proteina i relativno mala količina na ovaj način imobiliziranih rekombinantnih proteina na površini stanica.

Jedna od najčešćih i najznačajnijih posttranslacijskih modifikacija proteina jest glikozilacija proteina. Glikozilacija označava dodavanje ugljikohidratnih jedinica na specifične asparaginske ostatke (N-glikozilacija) ili na specifične treoninske ili serinske ostatke (O-glikozilacija) proteina. Za razliku od razgranatih i dugačkih N-glikozidnom vezom povezanih ugljikohidratnih lanaca, O-glikozidnom vezom povezani lanci su kraći i nisu razgranati te su češće prisutni (Tanner i sur., 1998.). Najveći udio glikoziliranih proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* nalazi se u staničnoj stijenci.

U ovom radu je ispitivan utjecaj O-glikozilacije na ekspresiju heterolognih proteina i njihovu ugradnju u staničnu stijenkku. Kako bi se ispitaio utjecaj O-glikozilacije, koriste se *pmt* mutanti (*pmt1*, *pmt2*, *pmt3* i *pmt4*) u kojima je inhibirana prva reakcija O-glikozilacije, vezanje jedinice manoze, koja se prenosi s aktivirane molekule dolihol-fosfat-manoze (Dol-P-Man), na specifični treoninski ili serinski ostatak novosintetiziranog proteina. Kao modelni enzim korištena je  $\beta$ -

laktamaza koja je fuzionirana s dva različita proteina stanične stijenke, Pir2 i Ccw12 kako bi se ispitala koja je metoda imobilizacije bolja za enzim. U radu su kao negativna kontrola korišteni plazmidi u kojima se nalaze gen *PIR2*, odnosno dio gena *CCW12*. Negativna kontrola potrebna je kako bi se eliminirali rezultati pozadinske aktivnosti intracelularne  $\beta$ -laktamaze kodirana genom *bla* na plazmidu koji služi kao selektivni biljeg za bakterije. Osim *PIR2*, *CCW12*, *bla* gena te rekombinantnih gena u plazmidima se nalaze i ishodište replikacije (*ori*), selektivni biljeg za kvasce (gen *HIS3*) i *PHO5* promotor. Plazmidi su replicirani i izolirani iz bakterije *E. coli* pomoću „NucleoSpin® Plasmid“ kita (Macherey-Nagel). Veličina fragmenata plazmida provjerena je restrikcijskom analizom pomoću enzima BglI. Iz rezultata restrikcije (slika 6.) vidljivo je da su fragmenti plazmida dobiveni nakon cijepanja s BglI ispravne veličine, što potvrđuje da su pripremljeni genetički konstrukti ispravni. Sekvenca rekombinantnog gena provjerena je i sekvencioniranjem u komercijalnom servisu (nije prikazano u radu). Nakon provedene restrikcije, izoliranim plazmidima transformirane su stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* divljeg tipa i *pmt* mutanata. Stanice su transformirane LiAc metodom (Giezt i Schiestl, 1995.) i nacjepljene na YNBP His<sup>-</sup> podlogu. Kako bi došlo do ekspresije rekombinantnog enzima, potrebno je tijekom uzgoja stanica inducirati promotor *PHO5*. Promotor *PHO5* je inducibilni promotor ovisan o unutarstaničnoj koncentraciji fosfata. Transformirane kvaščeve stanice stoga su najprije nacjepljene u YNBP His<sup>-</sup> podloge koje imaju visoku koncentraciju fosfata. Nakon prekonocnog uzgoja, stanice su izdvojene centrifugiranjem i dva puta isprane sterilnom vodom te je nastavljen prekonocni uzgoj u minimalnoj podlozi bez fosfata kako bi došlo do indukcije *PHO5* promotora. Stanice su zatim izdvojene centrifugiranjem i jednom isprane sterilnom vodom, a drugi put 100 mM K-fosfatnim puferom pH=7,0. Koncentracija stanica u reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 500  $\mu$ L podešana je na 0,3 OD/mL, a reakcija je provedena kao što je opisano u poglavlju „Materijali i metode“. Iz rezultata mjerenja aktivnosti Pir2bla enzima, prikazanih na slici 7., vidljivo je kako je u *pmt2* i *pmt4* mutantima detektirana vrlo niska aktivnost rekombinantnog enzima. S druge strane aktivnost Pir2bla eksprimiranog u stanicama *pmt1* i *pmt3* mutanata manja je za oko 30% od njegove aktivnosti u stanicama divljeg tipa kvasca. Western blot analizom u NaOH ekstraktima proteina stijenki *pmt2* i *pmt4* mutanata nije detektiran Pir2bla enzim (slika 9.) što je u skladu sa rezultatima dobivenim mjerenjem aktivnosti, dok je jakost proteinske vrpce u ekstraktima stijenki stanica *pmt1* i *pmt3* mutanata nešto slabija nego u ekstraktu proteina stijenki divljeg tipa kvasca. Na osnovu ovoga može se zaključiti da se u stijenke *pmt2* i *pmt4* mutanata ugrađuje jako mala količina Pir2bla enzima, pa je stoga i izmjerena aktivnost jako niska, a protein nije moguće detektirati western blot metodom vjerojatno zato što osjetljivost metode nije dovoljna da bi se detektirala ovako mala količina proteina. Kod mutanata koji

ekspimiraju Ccw12bla enzim izmjerena je vrlo niska aktivnost rekombinantnog enzima samo u stanicama *pmt2* mutanta, dok je aktivnost rekombinantnog enzima ekspimiranog u stanicama *pmt4* mutanta u ovom slučaju bila podjednaka aktivnosti izmjerenoj sa stanicama *pmt3* mutanta i nešto veća od aktivnosti izmjerene sa stanicama *pmt1* mutanta (slika 8.). U usporedbi s aktivnošću enzima u stanicama divljega tipa, *pmt3* i *pmt4* mutanti imaju za oko 25% manju aktivnost, dok *pmt1* pokazuje za oko 40% manju aktivnost. Analiza ekstrakta proteina stijenki western blotom (slika 10.) pokazala je da se rekombinantni enzim ne može detektirati u ekstraktu stijenki *pmt2* mutanta, dok je jakost proteinske vrpce u ekstraktima stijenki ostalih *pmt* mutanata nešto slabija od one u divljem tipu kvasca, što je u skladu sa rezultatima dobivenim mjerenjem enzimske aktivnosti. Na temelju rezultata ispitivanja stabilnosti (slike 11. i 12.) može se zaključiti kako je Pir2bla konstrukt unutar 6 dana puno stabilniji od Ccw12bla konstrukta. Enzim Pir2bla kod *pmt3* i *pmt1* mutanata gubi 10-20% aktivnosti, dok kod stanica divljega tipa ostaju nepromijenjeni. Enzim Ccw12bla u *pmt* mutantima i stanicama divljeg tipa gubi 20-28% početne aktivnosti što ukazuje kako je protein imobiliziran preko Ccw12 proteina nestabilniji od imobiliziranog preko Pir2 proteina.

Uzrok niske aktivnosti rekombinantnih enzima i nemogućnosti njihove detekcije western blot metodom u stanicama pojedinih *pmt* mutanata može biti degradacija enzima staničnim proteazama zbog pogrešnog smatanja nakon translacije ili problem u transportu proteina do stanične stijenke i/ili njihovoj ugradnji u stijenku. Također, moguće je da se dio enzima otpustio u podlogu tijekom uzgoja te bi se tijekom ponavljanja pokusa trebala mjeriti i aktivnost u mediju nakon uzgoja.

Kod *pmt1* i *pmt3* mutanata koji ekspimiraju Pir2bla enzim, te *pmt1*, *pmt3* i *pmt4* mutanata koji ekspimiraju Ccw12bla enzim detektirana je niža aktivnost rekombinantnog enzima nego kod stanica divljeg tipa. Na temelju western blot analize vidljivo je kako su se rekombinantni enzimi u ovim mutantima ugradili u staničnu stijenku u manjoj količini nego u stijenke divljeg tipa kvasca. Manja aktivnost izmjerena u ovim mutantima može biti direktna posljedica manje količine ovog proteina u stijenci, međutim smanjenu aktivnost može uzrokovati i promjena konformacije aktivnog mjesta enzima zbog utjecaja glikozilacije koja je u ovim mutantima izmjenjena u odnosu na divlji tip kvasca.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti:

1. Stanice *pmt* mutanata i divljega tipa kvasca uspješno su transformirane plazmidima koji nose native gene *CCW12* i *PIR2* te gene koji kodiraju za rekombinantne enzime Ccw12bla i Pir2bla koji su pod kontrolom *PHO5* promotora.
2. Rekombinanti enzim Pir2bla uspješno je eksprimiran i lokaliziran na površini stanica mutanata *pmt1* i *pmt3* te stanica divljeg tipa, dok u *pmt2* i *pmt4* mutantima nije.
3. Rekombinantni enzim Pir2bla eksprimiran na površini stanica svih ispitivanih *pmt* mutanata pokazuje za oko 30% manju aktivnost u usporedbi sa stanicama divljega tipa.
4. Rekombinantni enzim Ccw12bla uspješno je eksprimiran i lokaliziran na površini stanica mutanata *pmt1*, *pmt3* i *pmt4* te stanica divljeg tipa, dok u *pmt2* mutantu nije.
5. Rekombinantni enzim Ccw12bla eksprimiran na površini stanica svih ispitivanih *pmt* mutanata pokazuje za oko 25% manju aktivnost u usporedbi sa stanicama divljeg tipa.
6. Rekombinantni enzim Pir2bla imobiliziran na površini *pmt1* mutanata izgubi oko 30% aktivnosti, na površini *pmt3* izgubi oko 10% aktivnosti, dok na površini stanica divljeg tipa aktivnost enzima ostaje praktički nepromijenjena unutar tjedan dana.
7. Rekombinantni enzim Ccw12bla imobiliziran na površini *pmt* mutanata i stanica divljeg tipa unutar tjedan dana izgubi 20-28% aktivnosti.

## 7. LITERATURA

1. Abe H., Ohba M., Shimma Y., Jigami Y. (2004) Yeast cells harboring human  $\beta$ -1,3-fucosyltransferase at the cell surface engineered using Pir, a cell wall-anchored protein. *FEMS Yeast Res* **4**: 417–425.
2. Boder, E.T., Bill, J.R., Nields, A.W., Marrack, P.C., Kappler, J.W. (2005) Yeast surface display of a noncovalent MHC class II heterodimer complexed with antigenic peptide. *Biotechnol. Bioeng.* **92**: 485–491
3. Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrša V., Tanner W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to  $\beta$ -1,3- glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* **281**: 11523–11529
4. Gemmill T. R., Trimble R. B. (1998) All pyruvylated galactose in *Schizosaccharomyces pombe* N-glycans is present in the terminal disaccharide, 4, 6-O-[(R)-(1-carboxyethylidene)]-Gal $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 1-. *Glycobiology* **8**: 1087–1095
5. Gentsch M., Tanner W. (1996) The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* **15**: 5752–5759
6. Girrbach V., Strahl S. (2003) Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J. Biol. Chem.* **278**: 12554–12562
7. Graham T. R., Seeger M., Payne G. S., MacKay V. L., Emr S. D. (1994) Clathrin-dependent localization of alpha 1,3 mannosyltransferase to the Golgi complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **127**: 667–678
8. Guillen E., Abeijon C., Hirschberg C. B. (1999) The genes for the Golgi apparatus N-acetylglucosaminyltransferase and the UDP-N-acetylglucosamine transporter are contiguous in *Kluyveromyces lactis*. *J. Biol. Chem.* **274**: 6641–6646
9. Harris, S. L., Waters, M. G. (1996) Localization of a yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport. *J. Cell Biol.* **132**: 985–998
10. Herscovics, A. (1999) Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 275–285
11. Hitt R., Wolf D. H. (2004) Der1p, a protein required for degradation of malformed soluble proteins of the endoplasmic reticulum: topology and Der1-like proteins. *FEMS Yeast Res.* **4**: 815–820
12. Jakob C. A., Burda P., Roth J., Aebi M. (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J. Cell Biol.*, **142**: 1223–1233
13. Jigami Y., Odani T. (1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 335–345

14. Jungmann J., Rayner J. C., Munro S. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **274**: 6579–6585
15. Kapteyn J.C., Montijn R.C., Vink E., de la Cruz J., Llobell A., Douwes J.E., Shimoï H., Lipke P.N., Klis F.M. (1996) Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**: 337–345
16. Kojima H., Hashimoto H., Yoda K. (1999) Interaction among the subunits of Golgi membrane mannosyltransferase complexes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 1970–1976
17. Kollar R., Petrakova E., Ashwell G., Robbins P.W., Cabib E. (1995) Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1 to 3)-glucan. *J. Biol. Chem.* **270**: 1170–1178
18. Lin Y., Tsumuraya, T., Wakabayashi, T., Shiraga, S., Fujii, I., Kondo, A., Ueda, M. (2003) Display of a functional hetero-oligomeric catalytic antibody on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 226–232
19. Liu W., Jia B., Zhao H., Xu L., Yan Y. (2010) Preparation of a whole-cell biocatalyst of *Aspergillus niger* lipase and its practical properties. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 10426–10430
20. Lozančić M., Hossain A.S., Mrša V., Teparić R. (2019) Surface Display-An Alternative to Classic Enzyme Immobilization. *Catalysts* **9**, 728
21. Lussier M., Sdicu A. M., Bussey H. (1999) The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 323–334
22. Matsumoto T., Fukuda H., Ueda M., Tanaka A., Kondo, A. (2002) Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4517–4522
23. Montijn R.C., Van Rinsum J., Van Schagen F.A., Klis F.M. (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side-chain. *J. Biol. Chem.* **269**: 19338–19342
24. Nakamura Y., Shibasaki S., Ueda M., Tanaka A., Fukuda H., Kondo A. (2001) Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 500–505.
25. Nakanishi-Shindo Y., Nakayama K., Tanaka A., Toda Y., and Jigami Y. (1993) Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6- polymannose outer chain from *och1*, *och1mnn1*, and *och1mnn1alg3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**: 26338–26345
26. Nakayama K., Nagasu T., Shimma Y., Kuromitsu J., Jigami Y. (1992) *OCH1* encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *EMBO J.* **11**: 2511–2519

27. Nakayama K., Feng Y., Tanaka A., Jigami, Y. (1998) The involvement of *mnn4* and *mnn6* mutations in mannosylphosphorylation of O-linked oligosaccharide in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1425**: 255–262
28. Nguyen T.H., Fleet G.H., Rogers P.L. (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 206–212
29. Orlean P. (2012) Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics* **192**: 775–818
30. Parthasarathy R., Subramanian S., Boder E.T., Discher D.E. (2006) Post-translational regulation of expression and conformation of an immunoglobulin domain in yeast surface display. *Biotechnol. Bioeng.* **93**: 159–168
31. Romero P. A., Lussier M., Veronneau S., Sdicu A. M., Herscovics A., and Bussey H. (1999) Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha-1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology* **9**: 1045–1051
32. Ryckaert S., Martens V., Vusser K.D., Contreras R. (2005) Development of a *S. cerevisiae* whole cell biocatalyst for in vitro sialylation of oligosaccharides. *J. Biotechnol.* **119**: 379–388.
33. Stolz J., Munro S. (2002) The components of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyltransferase complex M-Pol I have distinct functions in mannan synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 44801–44808
34. Strahl-Bolsinger S., Gentsch M., Tanner W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 297–307
35. Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2010) Incorporation of homologous and heterologous proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Food Technol. Biotechnol.* **48**: 317–328
36. Teparić R., Mrša V. (2013) Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. *Curr Genet* **59**: 171–185
37. Van den Beucken T., Pieters H., Steukers M., van der Vaart M., Ladner R.C., Hoogenboom H.R., Hufton S.E. (2003) Affinity maturation of Fab antibody fragments by fluorescent-activated cell sorting of yeast-displayed libraries. *FEBS Lett.* **546**: 288–294
38. Van der Vaart J.M., Caro L.H.P., Chapman J.W., Klis F.M., Verrips C.T. (1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**: 3104–3110
39. Van der Vaart J.M., Biesbeke R., Chapman J.W. Toschka H.Y., Klis F.M., Verrips, T. (1997) Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell expression of heterologous proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 615–620
40. Wang X. H., Nakayama K., Shimma Y., Tanaka A., Jigami Y. (1997) *MNN6*, a member of the *KRE2/MNT1* family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**: 18117–18124

41. Watari J., Takata Y., Ogawa M., Sahara H., Koshino S., Onnela M.L., Airaksinen U., Jaatinen R., Penttilä M., Keränen S. (1994) Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast* **10**: 211–225
42. Yip C. L., Welch S. K., Klebl F., Gilbert T., Seidel P., Grant F. J., O'Hara P. J., MacKay V. L. (1994) Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *MNN9* and *MNN1* genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2723–2727



## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



---

ime i prezime studenta