

# Ispitivanje utjecaja prekomjerne ekspresije kompleksa GPI-transamidaze na ugradnju Ccw12bla proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae*

---

Pospiš, Hana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:573579>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Hana Pospiš**

0058219861

**Ispitivanje utjecaja prekomjerne ekspresije kompleksa GPI-transamidaze na  
ugradnju Ccw12bla proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae***  
**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biokemija

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

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Ispitivanje utjecaja prekomjerne ekspresije kompleksa GPI-transamidaze na ugradnju Ccw12bla proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae*

Hana Pospiš, 0058219861

**Sažetak:** „*Yeast surface display*“ (YSD) sustav jednostavnija je, efikasnija i jeftinija metoda proizvodnje i imobilizacije enzima, nego klasične imobilizacije u kojima se za vezanje proteina na neki netopljivi nosač koriste kemikalije i postupci koje često imaju negativan utjecaj na enzimsku aktivnost. Rekombinantni protein mora sadržati protein od interesa fuzioniran sa nativnim proteinom stanične stijenke. Nedostatci ove metode su potencijalno smanjenje aktivnosti proteina i neuspješna ugradnja na površinu stanice. Bitna prepreka za industrijsku primjenu ove metode je njena još uvijek niska efikasnosti. Stoga se i dalje radi na tome da se efikasnost YSD poveća. Cilj ovog rada jest ispitati utjecaj prekomjerne ekspresije kompleksa GPI-transamidaze na ugradnju Ccw12bla proteina na površinu stanice. Ccw12bla protein eksprimiran je u stanicama kvasca divljeg tipa i u stanicama koje su bile transformirane plazmidima koji su sadržali genetičku informaciju za povećanu ekspresiju podjedinica kompleksa GPI-transamidaze. Uspješnost provedenog eksperimenta ispitana je mjerenjem aktivnosti  $\beta$ -laktamaze i imunoblotom ukupnih proteina stijenke.

**Ključne riječi:** Ccw12bla protein, stanična stijenka, GPI-transamidaza, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -laktamaza

**Rad sadrži:** 32 stranica, 10 slika, 10 tablica, 24 literaturnih 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:** Tea Martinić Cezar, mag. ing. biotech.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Examination of the effect of overexpression of the GPI-transamidase complex on the incorporation of Ccw12bla protein into the cell wall of the yeast *S. cerevisiae*

Hana Pospiš, 0058219861

**Abstract:** "Yeast surface display" (YSD) system is a simpler, more efficient and cheaper method of enzyme production and immobilization than classic immobilizations in which chemicals and procedures used to attach proteins to some insoluble carrier often have a negative effect on enzyme activity. The recombinant protein must contain protein of interest fused to some native cell wall protein. The disadvantages of this method are the potential reduction of protein activity and unsuccessful incorporation on the cell surface. Low efficiency of YSD remains a significant obstacle for industrial application of this method, and efforts are still being made to improve its efficiency. The aim of this work is to examine the influence of overexpression of the GPI-transamidase complex on the incorporation of the Ccw12bla protein on the cell surface. The Ccw12bla protein was expressed in wild-type yeast cells and in cells transformed with plasmids containing genetic information for overexpression of the GPI-transamidase complex subunits. The success of the conducted experiment was tested by measuring  $\beta$ -lactamase activity and immunoblot of cell wall proteins.

**Keywords:** Ccw12bla protein, GPI-transamidase, cell wall, yeast *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -lactamase

**Thesis contains:** 32 pages, 10 figures, 10 tables, 24 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** Tea Martinić Cezar, mag. ing.

## SADRŽAJ

|   |          |
|---|----------|
| <b>1. UVOD.....</b>   | <b>1</b> |
| <b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>  | <b>2</b> |
| 2.1. KVASAC <i>S. cerevisiae</i> .....  | 2        |
| 2.2. STANIČNA STIJENKA.....   | 2        |
| 2.3. GPI VEZANI PROTEINI.....   | 4        |
| 2.4. GPI-TRANSAMIDAZA.....  | 6        |
| 2.5. IZLAGANJE REKOMBINANTNIH PROTEINA NA POVRŠINI STANICE<br>KVASCA <i>S. cerevisiae</i> ..... | 6        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>  | <b>8</b> |
| 3.1. MATERIJALI.....  | 8        |
| 3.1.1. Kemikalije.....  | 8        |
| 3.1.2. Uređaji.....   | 8        |
| 3.1.3. Laboratorijski sojevi.....   | 9        |
| 3.1.4. Hranjive podloge.....  | 9        |
| 3.1.5. Plazmidi.....  | 14       |
| 3.2. METODE.....  | 19       |
| 3.2.1. Transformacija stanica kvasca pomoću litijevog acetata.....                              | 19       |
| 3.2.2. Obilježavanje i izdvajanje proteina stijenke.....  | 19       |
| 3.2.3. Elektroforeza i imunoblot.....   | 20       |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.4.    | Indukcija PHO5 promotora .....  | 21        |
| 3.2.5.    | Mjerenje aktivnosti $\beta$ -laktamaze vezane na površinu stanice kvasca..... | 21        |
| <b>4.</b> | <b>REZULTATI I RASPRAVA.....</b>  | <b>22</b> |
| 4.1.      | REZULTATI.....  | 22        |
| 4.1.1.    | Rezultati analize proteinskih profila stijenke .....                          | 22        |
| 4.1.2.    | Rezultati mjerenja aktivnosti CCw12bla proteina .....                         | 23        |
| 4.2.      | RASPRAVA .....  | 25        |
| <b>5.</b> | <b>ZAKLJUČCI.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>6.</b> | <b>POPIS LITERATURE.....</b>  | <b>28</b> |

## 1. UVOD

Uporaba kvasaca za proizvodnju rekombinantnih proteina s vremenom postaje sve učestalija zahvaljujući novim saznanjima i sve naprednijim tehnikama u genetičkom inženjerstvu. Zbog specifične građe stanične stijenke kvasca, koja se sastoji od dva međusobno povezana sloja od kojih jedan sloj čine glikoproteini koji se koriste za imobilizaciju proteina na površini stanične stijenke, kvasci predstavljaju idealne domaćine za proizvodnju rekombinantnih proteina. Izlaganje proteina na površini stanice (*yeast surface display* sistem, kratica YSD) sve češće se koristi za proizvodnju heterolognih proteina umjesto imobilizacije željenog proteina na netopive nosače pomoću kemijskih postupaka koji mogu uzrokovati denaturaciju proteina. Osim kvasca, za proizvodnju heterolognih proteina također se mogu koristiti i stanice drugih organizama kao što su sisavci, kukci i bakterije, no kvasac je među navedenima najčešće korišten zbog: mogućnosti provođenja posttranslacijskih modifikacija sličnih onima u humanim stanicama, olakšane genetičke manipulacije i jednostavnog uzgoja. Kako bi se protein od interesa (POI) izložio na površini stanice, potrebno je otvoreni okvir čitanja koji kodira za POI fuzionirati sa otvorenim okvirom čitanja koji kodira za neki protein stanične stijenke. Korišteni protein mora sadržavati određene signalne sekvence koje će mu omogućiti ulazak u sekretorni put i imobilizaciju na površinu stanice.

U ovom radu, željeni protein je  $\beta$ -laktamaza, a protein stanične stijenke koji se koristi za imobilizaciju na površini stanice je Ccw12. Ccw12 protein na staničnu stijenku kvasca veže se preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra za  $\beta$ -1,6-glukan. Vežanje GPI sidra, preko čijeg ostatka je protein vezan za staničnu stijenku kvasca, obavlja kompleks GPI-transamidaze koji je građen od pet podjedinica.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj prekomjerne ekspresije kompleksa GPI-transamidaze na ugradnju Ccw12bla proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae*. Prekomjerna ekspresija GPI-transamidaze bila je postignuta transformacijom stanica kvasca plazmidima koji su sadržavali genetičku informaciju za podjedinice GPI-transamidaze. Uspješnost provedenog eksperimenta provjerena je mjerenjem aktivnosti  $\beta$ -laktamaze i imunoblotom proteina stanične stijenke.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KVASAC *S. cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae*, također poznat kao pekarski, pivski i prehrambeni kvasac, jednostanična je i nepatogena gljiva iz carstva *Fungi* čija je uporaba proširena kroz prehrambenu i biotehnološku industriju te je stoga poznat kao jedan od najvažnijih industrijskih mikroorganizama (Stewart, 2014).

Jednostavan uzgoj, lako transformiranje stranom DNA, kratko generacijsko vrijeme, sekvencionirani genom te dostupnost različitih mutantata samo su neki od razloga zašto se *S. cerevisiae* smatra modelnim organizmom za provođenje istraživanja gotovo svih bioloških procesa u eukariotskim organizmima (Stewart, 2014). Blago kiseli pH između 4 i 6 je preferirani pH okoline za njegov rast, no optimalni pH varira ovisno o fazi rasta i korištenom mediju, odn. o koncentraciji otopljenog kisika (engl.: *dissolved oxygen*), prisutnosti određenih nutrijenata i metalnih iona (Salari i Salari, 2017).

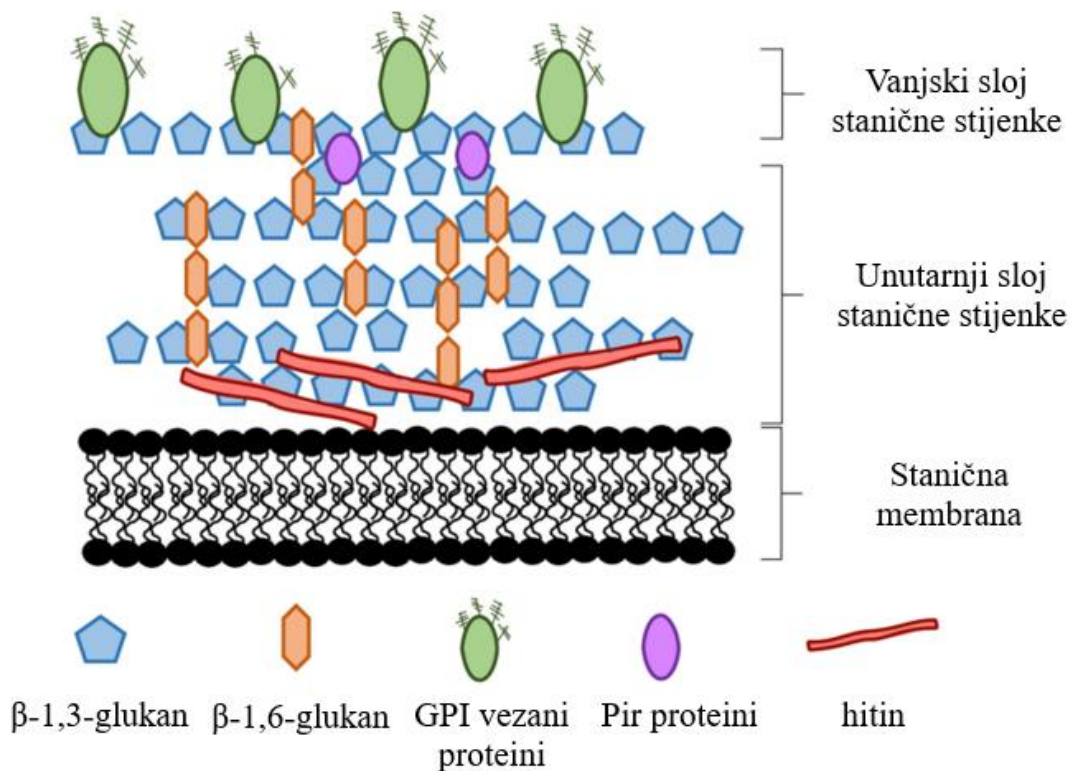
Zbog svojeg visokog fermentativnog kapaciteta koji je popraćen proizvodnjom ugljikovog dioksida i etanola, već je stoljećima korišten za proizvodnju piva, vina, kruha i drugih fermentiranih proizvoda.

### 2.2. STANIČNA STIJENKA

Stanična stijenka kvasca složena je tvorevina koja stanici pruža zaštitu, čvrstoću i oblik, a građena je od sloja polimera D-glukoze ( $\beta$ -1,3-glukana i  $\beta$ -1,6-glukana) koji su međusobno povezani glikozidnim vezama i od sloja glikoproteina u kojima su mananski lanci kovalentno vezani na proteine te male, no esencijalne količine hitina (slika 1). Debljina, raspored te sastav pojedinih komponenti u staničnoj stijenci ovisi o: soju kvasca, fiziološkom stanju, fazi rasta te o uvjetima u kojima je uzgajan kvasac. Hitin je građen od linearnog polimera N-acetilglukozamina te ima značajnu ulogu u pružanju mehaničke čvrstoće i fleksibilnosti staničnoj stijenci što je iznimno bitno za održavanje oblika stanice (Baek i sur., 2024). Stanična stijenka vrlo je hidrofilna, a to svojstvo pružaju joj manoproteini koji se protežu od površine stanične stijenke sve do dubljih slojeva. Osim manoproteina, hidrofilnosti stanične stijenke također pridonosi i glukan, točnije hidroksilne skupine glukoznih monomera. Hidrofilnost stanične stijenke bitno je svojstvo koje stanici kvasca omogućava: interakcije s drugim stanicama, apsorpciju nutritivnih tvari i reakcije na podražaje iz okoline. Vanjski sloj manoproteina štiti unutarnji glukanski sloj od vanjskih faktora i oštećenja te onemogućava pristup vanjskim agresorima u unutrašnjost stanice (Ribeiro, Bourbon-Melo i Sá-Correia, 2022).



Manoproteini na površini stanične stijenke kvasca vezani su za unutarnji glukanski sloj na razne načine. Mogu biti vezani nekovalentnim vezama za  $\beta$ -1,3-glukan, kovalentnim vezama preko ostataka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra za  $\beta$ -1,6-glukan te kovalentno preko esterskih veza osjetljivih na lužnatu okolinu koje se stvaraju između ostataka glutamina u specifičnim proteinskim sekvencama i glukana (Teparić, Stuparević i Mrša, 2010). U skupinu proteina vezanih alkalno-osjetljivim vezama spadaju proteini iz PIR (engl.: *proteins with internal repeats*) porodice (Ribeiro, Bourbon-Melo i Sá-Correia, 2022). Osim navedenih veza između unutarnjeg i vanjskog sloja, također postoje još neki načini vezanja proteina alkalno-osjetljivom kovalentnom vezom, no te veze još nisu dovoljno istražene (Teparić i sur., 2010).

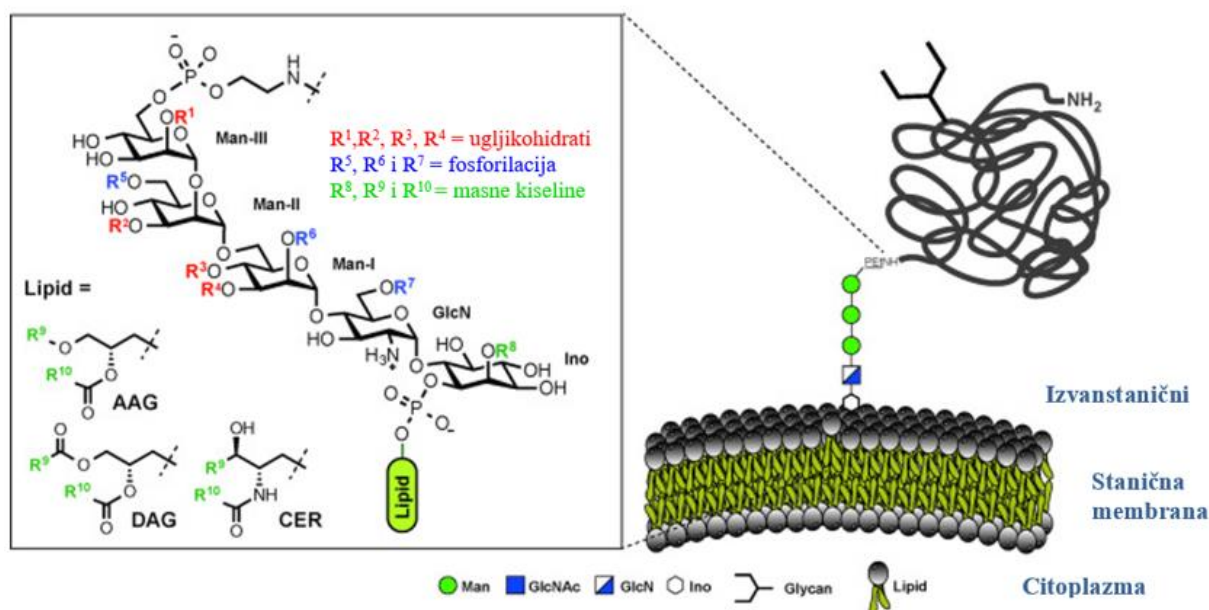


**Slika 1.** Shematski prikaz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (prema Ribeiro, Bourbon-Melo i Sá-Correia, 2022).

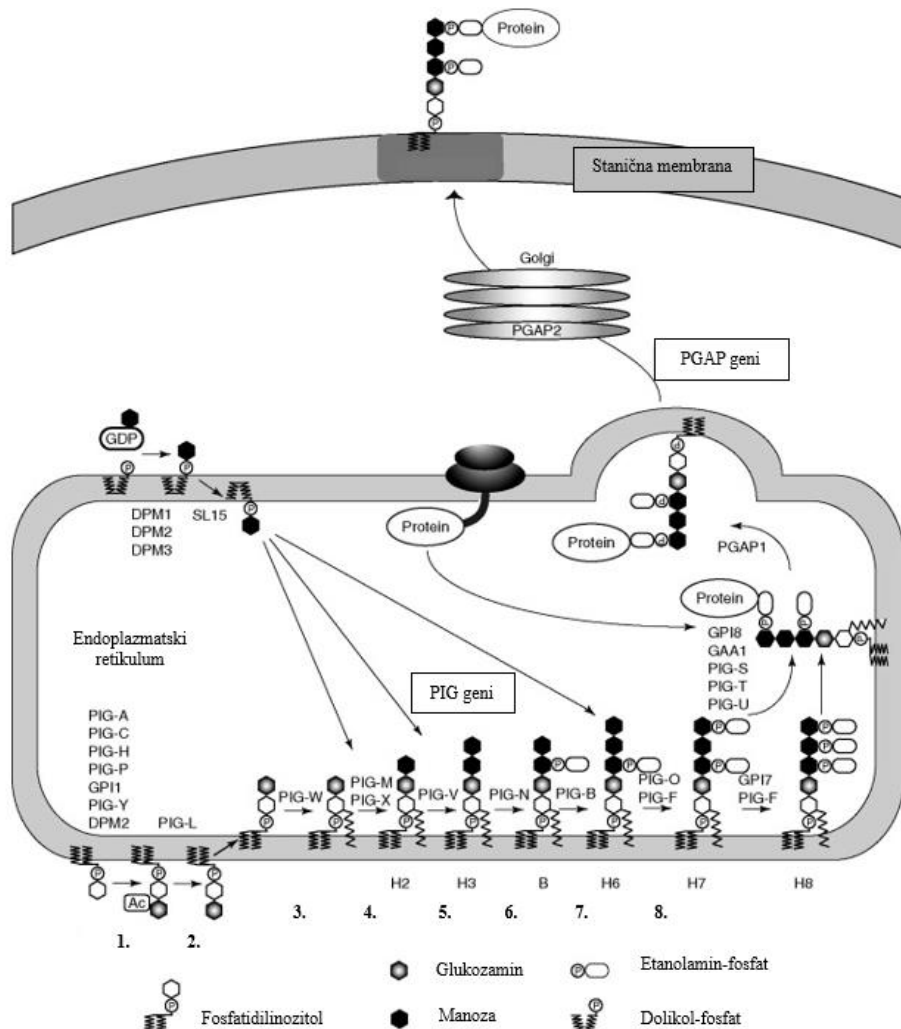
### 2.3. GPI VEZANI PROTEINI

Glikozilfosfatidilinozitol (GPI) vezani proteini su proteini koji se nalaze na površini stanične stijenke kvasca vezani kovalentno preko ostatka GPI sidra.

Na slici 2. vidljiva je najčešća struktura GPI sidra kvasca. Primijećeno je kako među različitim organizmima dolazi do podudaranja strukture okosnice GPI sidra koja veže protein za lipidni dio te kako su enzimi koji sudjeluju u stvaranju tih struktura sveprisutni u eukariotima (Pittet i Conzelmann, 2007). Spomenuta okosnica GPI sidra sastoji se od jedinice fosfoetanolamina vezane na manozu označenu kao Man-III koja je vezana na Man-II  $\alpha$ -1,2-glikozidnom vezom, dok je Man-II vezana za Man-I  $\alpha$ -1,6-glikozidnom vezom. Man-I je na glukozamin vezana  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom dok je inozitol, koji veže već opisan dio GPI sidra za fosfolipid stanične membrane, povezan s glukozaminom preko  $\alpha$ -1,6-glikozidne veze. Navedena okosnica može imati različite modifikacije bočnih struktura što ovisi o vrsti organizma (Garg i sur., 2016).



**Slika 2.** Struktura i moguće modifikacije glikozilfosfatidilinozitola vezanog za proteine. Oznaka DAG kratica je za diacilglicerol, AAG označava alkilacilglicerol koji ima strukturu sličnu DAG-u, ali s alkilnim lancem vezanim na glicerol umjesto jedne od masnih kiselina, a CER je kratica za ceramid koji se sastoji od sfingozina vezanog na masnu kiselinu amidnom vezom (prema Garg i sur., 2016).



**Slika 3.** Shematski prikaz biosinteze i transpornog puta GPI vezanog proteina. Produkti ekspresije *PIG* (engl.: phosphatidylinositol glycan) gena obavljaju sintezu GPI sidra te ga vežu za protein unutar endoplazmatskog retikuluma (kratica: ER) uz popratne modifikacije koje obavljaju produkti ekspresije *PGAP* (engl.: *Post-GPI Attachment to Proteins*) gena. Brojevi 1-8 označavaju različite korake u biosintezi GPI sidra. Proces započinje stvaranjem fosfatidilinozitola (PI) u membrani ER-a. Enzim PIG-A u kompleksu sa PIG-C, PIG-H, PIG-P, GPI1, PIG-Y i DPM2 dodaje N-acetilglukozamin (GlcNAc) na PI (korak 1). Enzim PIG-L uklanja acetilnu grupu iz GlcNAc, stvarajući neacetilirani GlcN-PI (korak 2). Tri uzastopna koraka uključuju dodavanje manoznih ostataka na GlcN-PI, što je katalizirano enzimima PIG-M u kompleksu sa PIG-X, PIG-V i PIG-B (koraci 4, 5 i 7). Manoze dolaze iz dolikol-fosfata, koji služi kao donor manoze. Enzim PIG-N i PIG-O, koji je u kompleksu sa PIG-F, dodaju etanolamin-fosfat (EtNP) na manozne ostatke (koraci 6 i 8). (prema Kinoshita, Murakami i Morita, 2007).

## 2.4. GPI-TRANSAMIDAZA

GPI-transamidaza membranski je vezan enzimski kompleks koji sudjeluje u posttranslacijskim modifikacijama prekursora GPI vezanih proteina u eukariota. Njezina osnovna funkcija je prepoznavanje i cijepanje C-terminalne GPI signalne sekvence u proteinu koji ulazi u ER te premještanje proteina na prethodno sintetizirano GPI sidro na način da se novonastali C-terminalni kraj veže za amino terminalnu skupinu GPI sidra (Harvey i sur., 2002). GPI-transamidaza u sisavaca i kvasca sastoji se od pet podjedinica: PIG-K/Gpi8, GAA1/Gaa1, PIG-T/Gpi16, PIG-S/Gpi17 i PIG-U/Gab1 (Yi i sur., 2017). Na slici 3. prikazano je vezanje GPI sidra na prekursor GPI vezanog proteina. Gpi8 podjedinica sadrži aktivno mjesto za transamidaciju. Za Gaa1 podjedinicu vjeruje se da katalizira sintezu amidne veze između  $\omega$ -mjesta i EtNP na potpuno formiranom prekursoru GPI-a (Liu i sur., 2021)  $\omega$ -mjesto specifična je sekvenca u C-terminalnom dijelu proteina gdje se veže GPI sidro (Sauer i sur., 2023). Gpi16 ključan je za stabilnost i sastavljanje GPI-transamidaze (Pittet i Conzelmann, 2007). Pretpostavlja se kako je Gab1 zaslužan za prepoznavanje lipidnog dijela GPI-a, a za Gpi17 se zna kako je nezamjenjiva podjedinica GPI-transamidaze, no njegova uloga je još uvijek nejasna.

## 2.5. IZLAGANJE REKOMBINANTNIH PROTEINA NA POVRŠINI STANICE KVASCA *S. cerevisiae*

Metoda izlaganja rekombinantnih proteina na površini stanične stijenke kvasca, poznata je pod nazivom *yeast surface display* (YSD) i u današnje vrijeme postaje sve bitnija tehnika koja se koristi u biotehnologiji i biomedicini. YSD jedna je od metoda konstrukcije rekombinantnih proteina, a provodi se fuzijom gena koji kodira za POI i gena koji kodira za protein stanične stijenke koji omogućuju izlaganje rekombinantnih proteina na površini stanične stijenke. Neke druge metode izlaganja rekombinantnih proteina na površinu stanice koriste stanice drugih organizama kao što su: bakterije (Han, 2020), insekti (Tasumi i sur., 2019) i sisavci (Bruun i sur., 2017). Prednosti kvasca u odnosu na druge domačine za *surface display* su provođenje posttranslacijskih modifikacija proteina, olakšano genetičko manipuliranje zbog specifičnog haploidnog staničnog ciklusa u kojem se kvasci mogu nalaziti te brz i lagan uzgoj stanica zbog jednostavnih zahtjeva za rast i kratkog generacijskog vremena. YSD je u usporedbi s uobičajenim kemijskim metodama imobilizacije manje invazivan, jeftiniji i jednostavniji. Naime, kako bi se osiguralo kovalentno ili nekovalentno vezanje proteina na određene nosače, kemijske metode koriste tretmane s kemikalijama koje mogu uzrokovati denaturaciju proteina. Proizvodnja heterolognih proteina s vremenom sve više napreduje, zahvaljujući smanjenju ograničenja kao što su problemi s posttranslacijskim modifikacijama i niski prinosi. Željeni

protein moguće je ugraditi na N- ili C-terminalni kraja proteina ili unutar sekvence proteina stanične stijenke (Cherf i Cochran, 2015). U stanicama kvasca, željeni protein se najčešće fuzionira s proteinom stanične stijenke (engl.: *cell wall protein*, kratica CWP) koji se veže na staničnu stijenku preko ostatka GPI sidra (Teymennet-Ramírez, Martínez-Morales i Trejo-Hernández, 2022). U slučaju YSD-a, provodi se transformacija stanica korištenjem vektora koji sadrže genetičku informaciju za rekombinanti protein.

Općenito, prekursori GPI vezanih proteina na N-terminalnom kraju sadrže specifičnu signalnu sekvencu koja usmjerava sintezu proteina na membranu ER na način da protein ulazi u ER gdje se prethodno odvijalo sastavljanje GPI sidra koje se potom veže na C-terminalni kraj proteina (Harvey i sur., 2002). Kako bi vezanje GPI sidra na C-terminalni kraj bilo moguće, na prekursorima GPI vezanih proteina također se nalazi specifična signalna sekvencu za GPI sidrenje koju prepoznaje i uklanja GPI-transamidaza te na njeno mjesto veže GPI sidro (Pittet i Conzelmann, 2007). Sintetizirani GPI vezani protein transportnim vezikulama prelazi u Golgijev aparat gdje se dodatno modificira nakon čega se šalje prema određenim mikrodomenama stanične stijenke gdje se imobilizira (Kinoshita, Murakami i Morita, 2007). Shematski prikaz izlaganja rekombinantnih proteina na površinu stanične stijenke prikazan je na slici 3.

Uz Ccw12 korištenog u svrhe izrade ovog završnog rada, kvasac nudi više opcija za proteine koji se imobiliziraju na površini stanične stijenke kao što su: Aga $\alpha$ 1, Aga2, Cwp1, Cwp2, Tip1, Flo1, Sed1, YCR89w i Tir113 (Cherf i Cochran, 2015). Osim preko GPI sidra, heterologni proteini mogu se usidriti na staničnu stijenku preko Pir proteina.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Kemikalije**

- Uracil, leucin, triptofan, asparagin – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- Soli: kalijev klorid, kalijev dihidrogenfosfat, natrijev klorid, magnezijev sulfat heptahidrat, kalcijev klorid dihidrat, natrijev citrat – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- D(+) glukoza bezvodna – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Riboflavin – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce biotin – ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- Polietilenglikol (PEG), litijev acetat – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- Ponceau S – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- Nitrocefina – Millipore, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- ECL otopine za razvijanje imunoblotova – BioRad (Hercules, California, SAD)

##### **3.1.2. Uređaji**

- Spektrofotometar BioSpectrometer Basic – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- Spektrofotometar Helios  $\gamma$  – ThermoElectric Corporation (West Chester, Philadelphia, SAD)
- Beadbug homogenizator – Benchmark Scientific (Sayreville, New Jersey, SAD)
- Uređaj za Western blot Trans-Blot Turbo – Bio Rad (Hercules, California, SAD)
- Blot skener C-DiGit – LI-COR (Lincoln, Nebraska, SAD)

### 3.1.3. Laboratorijski sojevi

U eksperimentima korišten je soj kvasca *S. cerevisiae* BY4741, genotipa MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0.

### 3.1.4. Hranjive podloge, otopine i puferi

Sve hranjive podloge korištene u provođenju eksperimentalnog dijela ovog završnog rada bile su pripremljene otapanjem prethodno izvaganih, odn. izmjerenih sastojaka u destiliranoj vodi te su nakon toga bile sterilizirane u autoklavu pri temperaturi od 121 °C u trajanju od 20 minuta i nadtlaku od 1 bar.

Za transformaciju kvasca *S. cerevisiae* korištena je YPD podloga koja sadrži 10 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, 20 g L<sup>-1</sup> peptona, 0,1 g L<sup>-1</sup> adenina i 20 g L<sup>-1</sup> glukoze.

Za uzgoj transformanata korištena je YNB His<sup>-</sup> podloga koja sadrži kvašćeve dušične baze bez aminokiselina (6,7 g L<sup>-1</sup>), smjesu „drop-out“ (1,6 g L<sup>-1</sup>), kalijev dihidrogenfosfat (1,0 g L<sup>-1</sup>), uracil (0,08 g L<sup>-1</sup>), triptofan (0,08 g L<sup>-1</sup>) i leucin (0,16 g L<sup>-1</sup>). Netom prije naciepljivanja u podlogu je dodana 50% otopina glukoze tako da je konačna koncentracija glukoze u hranjivoj podlozi iznosila 2%. Za pripremu krute YNB His<sup>-</sup> podloge dodan je agar (20 g L<sup>-1</sup>). Sastav „drop-out“ smjese prikazan je u Tablici 1.

Za indukciju *PHO5* promotora korištena je P<sup>-</sup> His<sup>-</sup> podloga. U sastav P<sup>-</sup> His<sup>-</sup> podloge ulaze sastojci navedeni u Tablici 2. Navedeni sastojci otopljeni su u destiliranoj vodi te je pH podloge podešen na 5,5 dodatkom koncentrirane otopine klorovodične kiseline. U podlogu dodana 1000 puta koncentrirana otopina vitamina 1 (Tablica 4), 250 puta koncentrirana otopina vitamina 2 (Tablica 5), i 50% otopina glukoze tako da je konačna koncentracija glukoze u hranjivoj podlozi iznosila 2%.

**Tablica 1.** 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 kiselina | 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 kiselina  | 2,0 g | L-valin                   | 2,0 g |
| L-glicin                | 2,0 g | p-aminobenzojeva kiselina | 0,2 g |
| L-izoleucin             | 2,0 g | inozitol                  | 2,0 g |



**Tablica 2.** Sastav YNBP<sup>-</sup> His<sup>-</sup> podloge

|  |                         |
|--|-------------------------|
| KCl  | 1,0 g L <sup>-1</sup>   |
| Asparagin                                      | 2,0 g L <sup>-1</sup>   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O          | 0,5 g L <sup>-1</sup>   |
| NaCl   | 0,1 g L <sup>-1</sup>   |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O          | 0,1 g L <sup>-1</sup>   |
| Na-citrat                                      | 5,88 g L <sup>-1</sup>  |
| „drop-out“ smjesa                              | 2,0 g L <sup>-1</sup>   |
| Uracil   | 0,08 g L <sup>-1</sup>  |
| Leucin   | 0,016 g L <sup>-1</sup> |
| Triptofan                                      | 0,08 g L <sup>-1</sup>  |
| Elementi u tragovima (500 puta koncentrirani)* | 2,00 mL                 |

\*Sastav 500 puta koncentrirane otopine „elementi u tragovima“ prikazana u Tablici 3.

**Tablica 3.** Sastav 500 puta koncentrirane otopine „elementi u tragovima“

|   |                        |
|---|------------------------|
| Borna kiselina  | 0,25 g L <sup>-1</sup> |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O   | 0,20 g L <sup>-1</sup> |
| KI  | 0,05 g L <sup>-1</sup> |
| FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O   | 0,10 g L <sup>-1</sup> |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O   | 0,20 g L <sup>-1</sup> |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O | 0,10 g L <sup>-1</sup> |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O   | 0,20 g L <sup>-1</sup> |

**Tablica 4.** Sastav 1000 puta koncentrirane otopine vitamina 1

|                              |                        |
|------------------------------|------------------------|
| Biotin                       | 0,02 g L <sup>-1</sup> |
| Ca-pantotenat                | 4,00 g L <sup>-1</sup> |
| Niacin (nikotinska kiselina) | 4,00 g L <sup>-1</sup> |
| Piridoksal-HCl               | 4,00 g L <sup>-1</sup> |
| Tiamin-HCl                   | 4,00 g L <sup>-1</sup> |
| Folna kiselina               | 0,02 g L <sup>-1</sup> |

**Tablica 5.** Sastav 250 puta koncentrirane otopine vitamina 2

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| Riboflavin                | 0,05 g L <sup>-1</sup> |
| p-aminobenzojeva kiselina | 0,05 g L <sup>-1</sup> |
| Inozitol                  | 0,50 g L <sup>-1</sup> |

**Tablica 6.** Sastav Laemmli pufera

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| Tris             | 0,03 g mL <sup>-1</sup>  |
| EDTA             | 3,8 g mL <sup>-1</sup>   |
| SDS              | 0,1 g mL <sup>-1</sup>   |
| Glicerol         | 0,4 mL mL <sup>-1</sup>  |
| β-merkaptoetanol | 0,25 mL mL <sup>-1</sup> |
| Brom-fenol plavo | 0,05 g L <sup>-1</sup>   |

**Tablica 7.** 30% otopina akrilamida

|              |                          |
|--------------|--------------------------|
| Akrilamid    | 0,3 g mL <sup>-1</sup>   |
| Bisakrilamid | 0,008 g mL <sup>-1</sup> |

**Tablica 8.** sastav pufera za elektroforezu

|        |                       |
|--------|-----------------------|
| Tris   | 30 g L <sup>-1</sup>  |
| Glicin | 144 g L <sup>-1</sup> |
| SDS    | 10 g L <sup>-1</sup>  |

**Tablica 9.** sastav pufera za blokiranje

|              |                           |
|--------------|---------------------------|
| Tris         | 6 g L <sup>-1</sup>       |
| NaCl         | 8,8 g L <sup>-1</sup>     |
| Triton X-100 | 0,001 mL mL <sup>-1</sup> |

### 3.1.5. Plazmidi

Plazmidi korišteni za izradu ovog završnog rada sadrže selektivni biljeg *HIS3* koji omogućava prepoznavanje uspješno transformiranih auktotrofnih mutanata za histidin time što mogu rasti na podlozi koja ne sadrži histidin. Također sadrže inducibilni kvašćev promotor *PHO5* i selektivni biljeg *AmpR*.

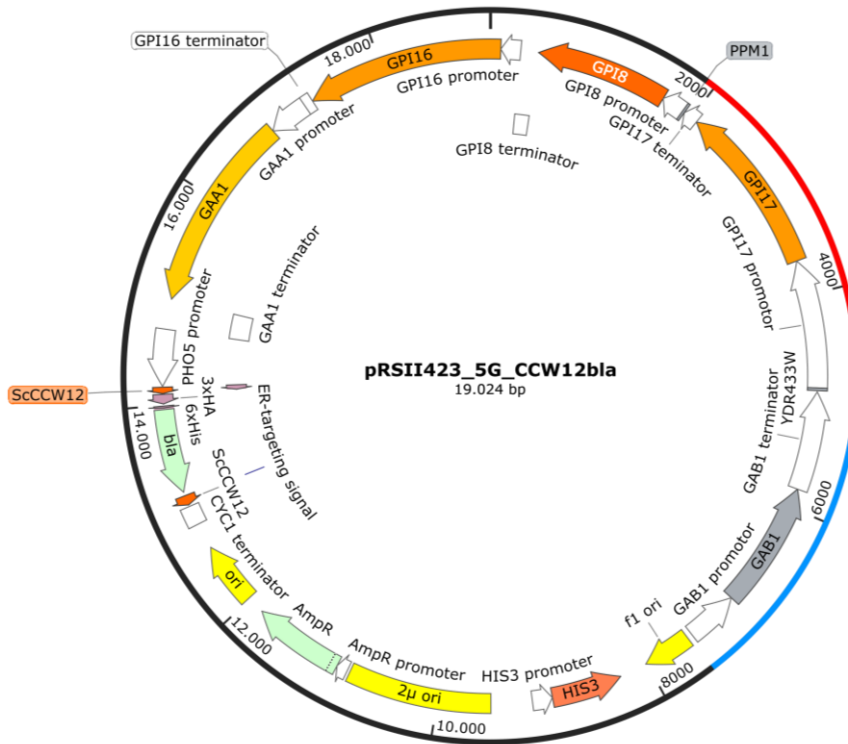
U ovom eksperimentu korištena su tri para plazmida: pRSII423\_5G\_CCW12bla i pRSII423\_5G\_CCW12, pRSII423\_3G\_CCW12bla i pRSII423\_3G\_CCW12 pRSII423\_CCW12bla i pRSII423\_CCW12. Ovi plazmidi međusobno se razlikuju po tome što jedan plazmid iz para sadrži gen *CCW12bla* dok drugi sadrži gen *CCW12* te su transformanti koji su primili gen *CCW12* imali ulogu negativne kontrole.

Plazmidi pRSII423\_5G\_CCW12bla i pRSII423\_5G\_CCW12 sadrže gene za prekomjernu ekspresiju svih pet podjedinica GPI-transamidaze, a plazmidi pRSII423\_3G\_CCW12bla i pRSII423\_3G\_CCW12 sadrže gene za samo tri podjedinice dok pRSII423\_CCW12bla i pRSII423\_CCW12 ne sadrže gene za prekomjernu ekspresiju kompleksa GPI-transamidaze te ih koristimo kao kontrolu za efikasnost YSD u sojevima u kojima nema prekomjerne ekspresije kompleksa GPI-transamidaze .

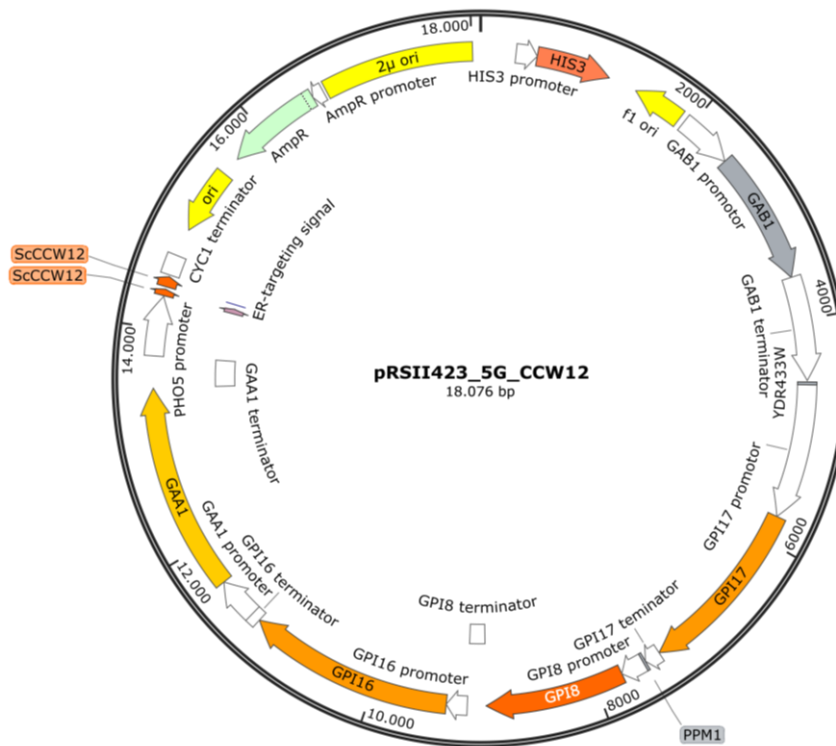
Dodatne informacije i opisi plazmida korištenih u izradi ovog završnog rada mogu se pronaći u Tablici 10.

**Tablica 10.** Plazmidi korišteni prilikom izrade ovog završnog rada

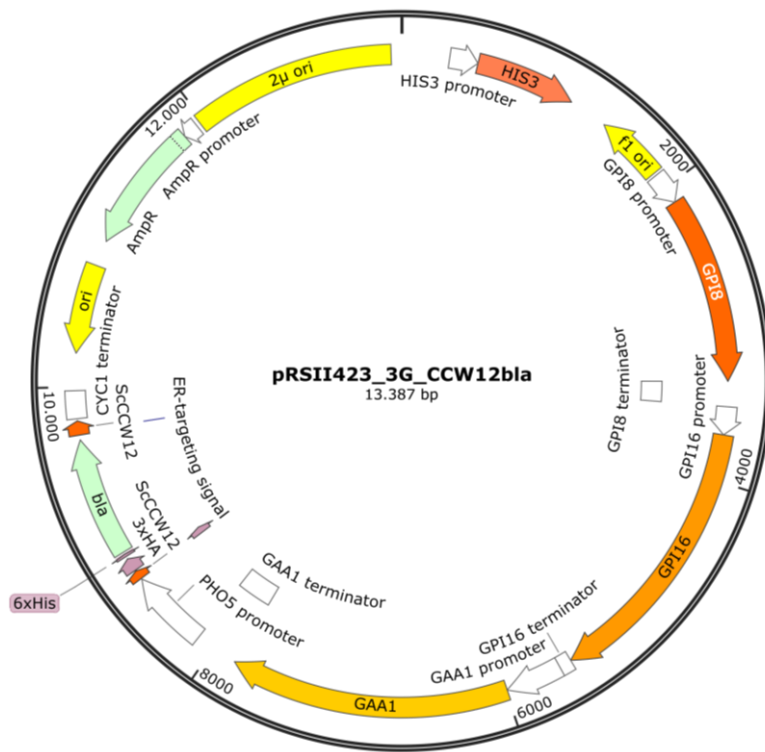
| Plazmidi                           | Opis  | Selektivni biljeg         |
|------------------------------------|---|---------------------------|
| pRSII423_5G_CCW12bla<br>(Slika 4.) | Plazmid sadrži gen <i>CCW12bla</i> koji se eksprimira sa promotora <i>PHO5</i> . Sadrži gene <i>GAB1</i> , <i>GPI17</i> , <i>GPI8</i> , <i>GPI16</i> , <i>GAA1</i> čiji su produkti ekspresije podjedinice GPI-transamidaze.  | <i>AmpR</i> , <i>HIS3</i> |
| pRSII423_5G_CCW12<br>(slika 5.)    | Plazmid sadrži gen <i>CCW12</i> koji se eksprimira sa promotora <i>PHO5</i> . Stanice kvasca koje su bile transformirane ovim plazmidom služile su kao negativna kontrola tijekom provođenja ovog eksperimenta. Sadrži gene <i>GAB1</i> , <i>GPI17</i> , <i>GPI8</i> , <i>GPI16</i> , <i>GAA1</i> . | <i>AmpR</i> , <i>HIS3</i> |
| pRSII423_3G_CCW12bla<br>(slika 6.) | Plazmid sadrži gen <i>CCW12bla</i> koji se eksprimira sa promotora <i>PHO5</i> . Sadrži gene <i>GPI8</i> , <i>GPI16</i> , <i>GAA1</i> .   | <i>AmpR</i> , <i>HIS3</i> |
| pRSII423_3G_CCW12<br>(slika 7.)    | Plazmid sadrži gen <i>CCW12</i> koji se eksprimira sa promotora <i>PHO5</i> . Stanice kvasca koje su bile transformirane ovim plazmidom služile su kao negativna kontrola tijekom provođenja ovog eksperimenta. Sadrži gene <i>GPI8</i> , <i>GPI16</i> , <i>GAA1</i> .                              | <i>AmpR</i> , <i>HIS3</i> |
| pRSII423_CCW12bla<br>(slika 8.)    | Plazmid sadrži gen <i>CCW12bla</i> koji se eksprimira sa promotora <i>PHO5</i>  | <i>AmpR</i> , <i>HIS3</i> |
| pRSII423_CCW12<br>(slika 9.)       | Plazmid sadrži gen <i>CCW12</i> koji se eksprimira sa promotora <i>PHO5</i> . Stanice kvasca koje su bile transformirane ovim plazmidom služile su kao negativna kontrola tijekom provođenja ovog eksperimenta.   | <i>AmpR</i> , <i>HIS3</i> |



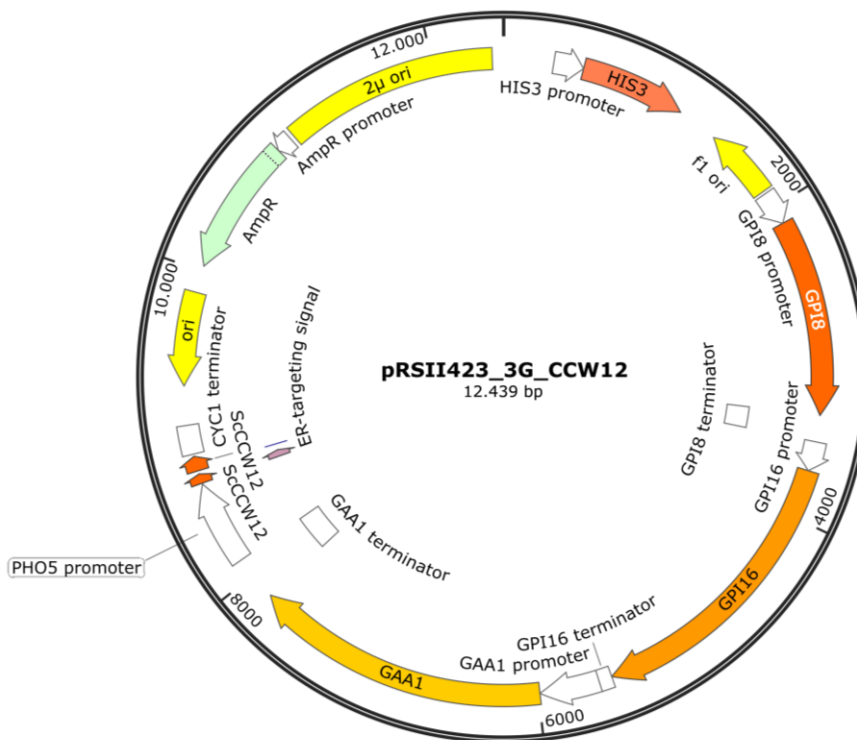
Slika 4. Mapa plazmida pRSII423\_5G\_CCW12bla



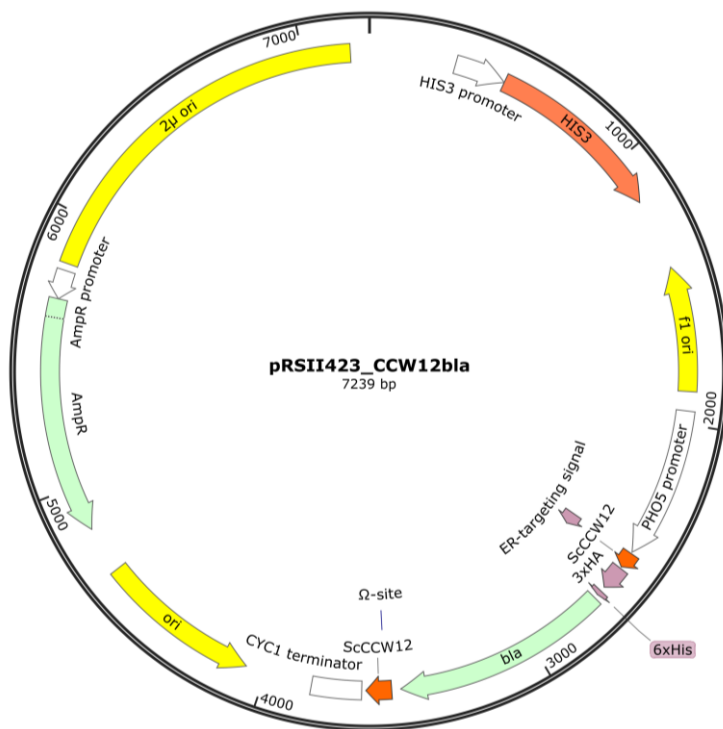
Slika 5. Mapa plazmida pRSII423\_5G\_CCW12



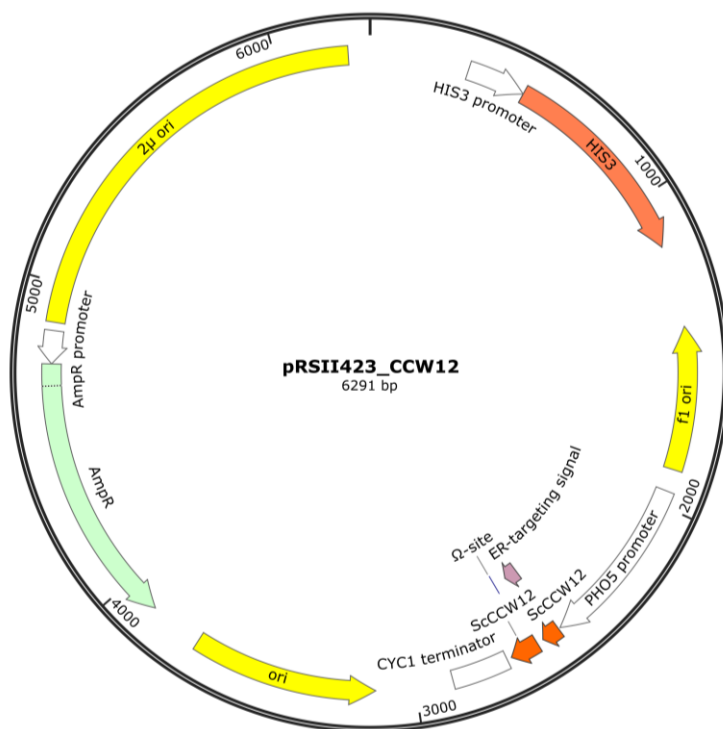
Slika 6. Mapa plazmida pRSII423\_3G\_CCW12bla



Slika 7. Mapa plazmida pRSII423\_3G\_CCW12



Slika 8. Mapa plazmida pRSII423\_CCW12bla



Slika 9. Mapa plazmida pRSII423\_CCW12



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Transformacija stanica kvasca pomoću litijevog acetata

Najprije su uzgojene stanice kvasca u 10 mL tekuće YPD podloge do eksponencionalne faze rasta odn. do približno  $2 \text{ OD}_{600}/\text{mL}$ . Stanice su zatim isprane dva puta. Postupak ispiranja krenuo je s centrifugiranjem stanica 5 min/3000 rpm nakon čega je supernatant odbačen, a zaostali talog resuspendiran u 10 mL sterilne destilirane vode ( $\text{sdH}_2\text{O}$ ). Nakon drugog ispiranja zaostali talog se resuspendirao u 500  $\mu\text{L}$   $\text{sdH}_2\text{O}$ . Zatim se po 150  $\mu\text{L}$  navedenog supernatanta prebacio u sterilne eppendorf epruvete koje su bile centrifugirane 30 s/13000 rpm te se na kraju odvojeni supernatant odbacio. Na zaostali talog u svaku eppendorf epruvetu redom je nanoseno: 60  $\mu\text{L}$  50% otopine PEG-a 3350, 9  $\mu\text{L}$  1M LiAc, 12,5  $\mu\text{L}$  lax DNA, 1  $\mu\text{L}$  određenog plazmida i 7,5  $\mu\text{L}$   $\text{sdH}_2\text{O}$ . Nakon toga priređene transformacijske smjese snažno su vorteksirane sve dok se sav talog nije resuspendirao. Priređene transformacijske smjese ostavljene su na inkubaciju na 40 min pri 42 °C. Nakon što je provedena inkubacija transformacijske smjese centrifugirane su 30 s/13000 rpm te je supernatant bio odbačen. Talog zaostao u eppendorf epruveti resuspendiran je u 100  $\mu\text{L}$   $\text{sdH}_2\text{O}$  i dobivena suspenzija je zatim metodom iscrpljivanja nanosena na krutu YNB/His<sup>-</sup> selektivnu hranjivu podlogu. Na kraju su naciepljene hranjive podloge ostavljene na inkubaciju 3 dana na 30 °C.

### 3.2.2. Obilježavanje i izdvajanje proteina stijenke

Stanice kvasca uzgojene su pri 30 °C u 50 mL YPD podloge u svrhu obilježavanja i izdvajanja proteina stijenke. Nakon toga stanice su centrifugirane 5 min/3000 rpm od čega je supernatant odbačen, a zaostali talog ispran destiliranom vodom. Postupak ispiranja destiliranom vodom ponovljen je dva puta te je na isti način provedeno ispiranje 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8 (KP8). Nakon ispiranja stanice su resuspendirane u 9 mL navedenog pufera uz dodatak 1 mL 0,5 mg mL<sup>-1</sup> biotina te su potom inkubirane 90 min na ledu. Nakon isteka vremena inkubacije stanice su dva puta isprane TM puferom (50 mM Tris, 100 mM MgCl<sub>2</sub>) te ponovo dva puta u KP8.

Zatim su stanice, resuspendirane u 10 mL K-fosfatno pufera pH 8, podvrgnute razbijanju pomoću staklenih kuglica u Beadbug uređaju za homogenizaciju. Odvajanje stanične stijenke od unutarstaničnog sadržaja postignuto je centrifugiranjem pri 8000 rpm/ 3 min. Tako izdvojene stanične stijenke potom se ispiru KP8 i to četiri puta. Izolacija proteina stijenki krenula je inkubiranjem staničnih stijenki u 1 mL Laemmli pufera (tablica 6) koji nije sadržao glicerol na 10 minuta u kipućoj vodi. Time je došlo do izolacije nekovalentno vezanih proteina stijenke. SDS ekstrakt ovih proteina odvojen je od staničnih stijenki centrifugiranjem i

skladišten na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ovaj postupak izolacije nekovalentno vezanih proteina ponovljen je dva puta. Nakon toga se polovica staničnih stijenki tretirala s  $30\text{ mM NaOH}$ . Na  $1\text{ mg}$  stanične stijenke dodano je po  $1\text{ }\mu\text{L}$   $30\text{ mM}$  otopine  $\text{NaOH}$  te inkubirano na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  preko noći. Poslije inkubacije, uzorak se centrifugira, iz njega se izdvoji supernatant, doda Laemmli pufer za uzorke koji sadrži glicerol te se čuva na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ovim postupkom izolirani su i pripremljeni za daljnje analize proteini vezani kovalentnom vezom koja je nestabilna u lužnatoj okolini. Druga polovica staničnih stijenki najprije se ispiru u  $50\text{ mM}$  K-fosfatnom puferu pH 6, a zatim resuspendira u istom puferu uz dodatak  $\beta$ -1,3-glukanaze ( $1\text{ }\mu\text{L}$   $\beta$ -1,3-glukanaze na  $25\text{ }\mu\text{L}$  KP6 pufera) te se potom ostavlja na inkubaciju 2h na  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Postupak koji se provodi poslije inkubacije jednak je kao i za polovicu uzorka koja je bila tretirana  $\text{NaOH}$ . Ovim postupkom dolazi do izolacije svih proteina vezanih na staničnu stijenku kovalentnom vezom. Vaganjem mokre mase stijenki u koraku koji prethodi izolaciji nekovalentno vezanih proteina i mjerenjem volumena ekstrakata koji su korišteni za imunoblot može se postići semi-kvantitativnost postupka s obzirom na masu stijenki iz kojih je ekstrakt dobiven.

### 3.2.3. Elektroforeza i imunoblot

Uzorci pripremljeni postupcima opisanim u potpoglavlju 3.2.2. najprije su odmrznuti kako bi se mogla provest njihova SDS-PAGE elektroforeza. Ova metoda provodi se u diskontinuiranom sustavu koji se sastoji od gela za sabijanje i od gela za razdvajanje, odn. gornjeg i donjeg gela. Za izradu donjeg gela izmiješano je:  $2,25\text{ mL}$   $30\%$  akrilamida (tablica 7),  $1,5\text{ mL}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ,  $3,75\text{ }\mu\text{L}$  katalizatora polimerizacije N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED),  $28,5\text{ }\mu\text{L}$  inicijatora polimerizacije amonijevog persulfata ( $10\%$  APS) i  $1,875\text{ mL}$  Tris-HCl pufera pH 8,8. Gornji gel sastojao se od:  $0,225\text{ mL}$   $30\%$  akrilamida,  $1,875\text{ }\mu\text{L}$  TEMED-a,  $16,875\text{ }\mu\text{L}$  APS-a i  $1,597\text{ mL}$  Tris-HCl pufera pH 6,8. Kako bi se postigla denaturacija proteina, u uzorak koji je sadržao izolirane nekovalentno vezane proteine dodan je Laemmli pufer. Uzorci koji su sadržali Pir proteine i GPI vezane proteine već su u prijašnjim koracima bili tretirani Laemmli puferom u svrhu denaturacije. Napon pri kojem se provodi elektroforeza iznosi  $180\text{ V}$ , a jakost struje  $380\text{ mA}$  (sastav pufera za elektroforezu naveden je u tablici 8). Elektroforeza traje sve dok obojena fronta ne dosegne donji rub gela, a kada se to dogodi uređaj za elektroforezu se ugasi. Proteini razdvojeni na elektroforezi prenose se iz gela na površinu poliviniliden difluoridnu (PVDF) membranu aktivirane u metanolu, uporabom uređaja za polu-suhi prijenos proteina. Za provođenje polu-suhog prijenosa proteina također je potreban Towbin pufer ( $25\text{ mM}$  Tris;  $195\text{ mM}$  glicin;  $20\%$  (v/v) metanol), a sam proces traje  $20\text{ min}$  i odvija se pri naponu od  $25\text{ V}$  i jakosti struje od  $1\text{ A}$ . Nakon inkubacije, membrana se sat vremena inkubira u puferu za blokiranje (tablica 9) uz dodatak  $5\%$  (m/v) albumina iz goveđeg seruma (BSA). Nakon

toga, uklanja se pufer za blokiranje te se membranu inkubira 30 minuta u dodanom streptavidin-peroksidaza konjugatom razrijeđenog u puferu za blokiranje uz dodatak 1 % (m/v) BSA. Nakon ove inkubacije, membrana se ispiri tri puta puferom za blokiranje i poslije ispiranja dodaju se ECL-otopine (700  $\mu$ L otopine peroksida + 700  $\mu$ L luminol/otopine pojačivača). Membrana se inkubira u ECL-otopini 5 minuta i nakon toga slijedi vizualizacija rezultata na C-diget skeneru, a dobivene slike se zatim obrađuju u programu Image Studio Software.

#### 3.2.4. Indukcija *PHO5* promotora

Stanice kvasca najprije su nacijeppljene u 5 mL tekuće YNBHis<sup>-</sup> hranjive podloge te su ostavljene na prekonocni uzgoj na tresilici na 30 °C/180 rpm do stacionarne faze rasta. Drugi dan provedeno je precjeppljivanje prekonocnih kultura u 15 mL iste hranjive podloge do vrijednosti optičke gustoće stanica približne 0,5 OD<sub>600</sub>/mL. Stanične kulture inkubirane na 30 °C/180 rpm kako bi ušle u eksponencionalnu fazu rasta sve do 2 OD<sub>600</sub>/mL. Poslije inkubacije, stanice su najprije isprane destiliranom vodom te su prebačene u 15 mL tekuće P<sup>-</sup>His<sup>-</sup> hranjive podloge na početnu optičku gustoću stanica od približno 0,3 OD<sub>600</sub>/mL.

#### 3.2.5. Mjerenje aktivnosti $\beta$ -laktamaze vezane na površinu stanice kvasca

Mjerenje aktivnosti  $\beta$ -laktamaze vezane na površinu stanice kvasca provedeno je spektrofotometrijski uz dodatak nitrocefina kao supstrata  $\beta$ -laktamaze. Mjerenje aktivnosti  $\beta$ -laktamaze se temelji na promjeni obojenja žutog supstrata  $\beta$ -laktamaze, nitrocefina, u crveno-obojevu cefalosporinsku kiselinu. Svaki uzorak mjeran je u tri biološke replike, dok je aktivnost svake replike mjerena u tri tehničke replike. Stanice kvasca koje su bile uzgojene u tekućoj P<sup>-</sup>His<sup>-</sup> hranjivoj podlozi (poglavlje 3.2.4.) centrifugirane su 5 min na 3000 rpm-a. Zaostali talog ispran u sdH<sub>2</sub>O, a nakon toga u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 7 (KP7). Nakon ispiranja taloga, stanice kvasca ponovo su resuspendirane u KP7 do 100 OD<sub>600</sub>/mL. Prije samog mjerenja provedena je inkubacija uzoraka, koji su sadržali 7,5  $\mu$ L prvog decimalnog razrjeđenja stanica kvasca i 467,5  $\mu$ L KP7 i slijepa probe koja je sadržala 475  $\mu$ L pufera, na termobloku 30 °C/2 min/1200 rpm. Nakon inkubacije u njih je dodano 25  $\mu$ L otopine nitrocefina (1 mM, otopljen u 50 mM KP7 puferu s 5% DMSO). Uzorci su ostavljeni u termobloku na 30 °C/5 min/1200 rpm kako bi se provela enzimska reakcija, nakon čega su reakcijske smjese centrifugirane 30 s/8000 rpm. Apsorbancija je mjerena na 482 nm u 300  $\mu$ L supernatanta.

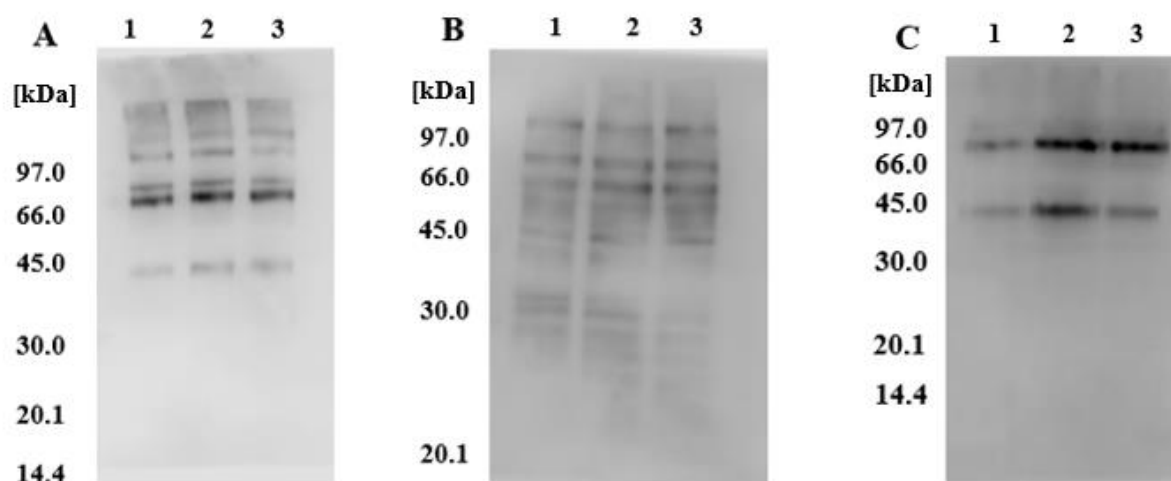
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. REZULTATI

Cilj ovog završnog rada bio je analizirati i usporediti količinu imobiliziranih rekombinantnih proteina Ccw12bla na staničnoj stijenci kvasca transformiranog plazmidom pRSII423\_3G\_CCW12bla, pRSII423\_5G\_CCW12bla i pRSII423\_CCW12bla, kako bi se analizirao utjecaj prekomjerne ekspresije GPI-transamidaze na imobilizaciju ovog proteina na staničnoj stijenci. Ovo istraživanje pokazalo je kako se prekomjernom ekspresijom GPI-transamidaze smanjuje količina rekombinantnih proteina Ccw12bla koji se ugrađuju u staničnu stijenkku kvasca *S. cerevisiae*.

#### 4.1.1. Rezultati analize proteinskih profila stijenske

Kako bismo dobili informaciju o proteinskom sastavu staničnih stijenki analiziranog kvasca, korištena je tehnika biotinizacije proteina stijenske. Nakon provedenog vezanja biotina za proteine izložene na staničnoj stijenci, označeni proteini su podijeljeni u tri ekstrakta na temelju razlika u načinu njihovog vezanja za staničnu stijenkku. Ekstrakt koji je dobiven kuhanjem uzorka uz dodatak SDS-a u reducirajućim uvjetima sadržavao je nekovalentno vezane proteine te će navedeni ekstrakt u daljnjem tekstu biti naveden pod imenom SDS ekstrakt. Ekstrakt koji je sadržavao proteine koji su vezani na staničnu stijenkku kovalentnom vezom koja je nestabilna u lužnatoj okolini dobiven je tretmanom stijenki sa 30 mM NaOH nakon što su iz njih uklonjeni nekovalentno vezani proteini kuhanjem uz dodatak SDS-a u reducirajućim uvjetima. Ovaj ekstrakt će se u daljnjem tekstu nazivati NaOH ekstrakt. Ekstrakt koji je sadržavao proteine vezane za staničnu stijenkku kovalentnom vezom preko ostatka GPI sidra dobiven je tretiranjem stijenki s  $\beta$ -1,3-glukanazom nakon što su iz njih uklonjeni nekovalentno vezani proteini kuhanjem uz dodatak SDS-a u reducirajućim uvjetima, te će u daljnjem tekstu biti naveden pod imenom  $\beta$ -glukanazni ekstrakt (detaljni postupak dobivanja pojedinih ekstrakata objašnjen je u poglavlju 3.2.2). Na slici 10. su prikazane proteinske vrpce razdvojene SDS-PAGE, nakon čega su prenesene na PVDF membranu i vizualizirane pomoću kompleksa streptavidin-peroksidaze. Proteinska vrpca rekombinantnog proteina Ccw12bla vidljiva je na 66 kDa, dok ostale vrpce predstavljaju preostale proteine stanične stijenske.

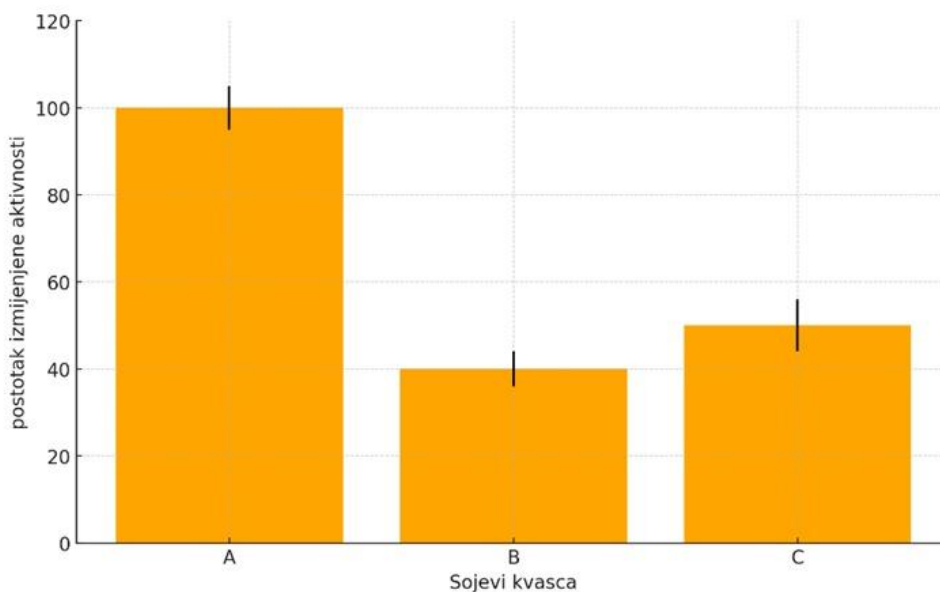


**Slika 10.** Imunoblot proteina iz: (A)  $\beta$ -glukanaznog ekstrakta, (B) SDS ekstrakta i (C) NaOH ekstrakta. Uzorak 1 sadrži proteine stanične stijenke divljeg tipa kvasca transformiranog s pRSII423\_CCW12bla, uzorak 2 sadrži proteine stanične stijenke kvasca transformiranog plazmidom pRSII423\_3G\_CCW12bla i uzorak 3 sadrži proteine stanične stijenke kvasca transformiranog plazmidom pRSII423\_5G\_CCW12bla.

Rezultati pokazuju da je količina nekovalentno vezanih proteina stijenke (slika 10B) i proteina koji su u stijenku vezani preko ostatka GPI-sidra (slika 10A) u oba mutanta sa povećanom ekspresijom GPI-transamidaze podjednaka onoj u divljem tipu kvasca, dok je količina proteina vezana kovalentnom alkalno labilnom vezom nešto veća kod ovih mutanata u odnosu na divlji tip kvasca.

#### 4.1.2. Rezultati mjerenja aktivnosti Ccw12bla proteina

Za mjerenje količine prisutnog Ccw12bla proteina, najprije je inducirana njegova ekspresija s promotora *PHO5* na način da se kvasac uzgajao na hranjivoj podlozi bez fosfata (poglavlje 3.2.5). Usporedbom aktivnosti  $\beta$ -laktamaze na staničnoj stijenci divljeg tipa transformiranog s pRSII423\_CCW12bla, kojem je pridružena aktivnost u vrijednosti od 100 %, i transformanata kod kojih je provedena prekomjerna ekspresija tri ili pet podjedinica GPI-transamidaze može se zaključiti kakav je utjecaj prekomjerne ekspresije GPI-transamidaze na efikasnost imobilizacije Ccw12bla proteina na staničnu stijenu kvasca *S. cerevisiae*. Aktivnost kod kvasaca transformiranih plazmidima pRSII423\_3G\_CCW12 ili pRSII423\_5G\_CCW12 jednaka je 0 % te su korišteni kao negativna kontrola.



**Slika 11.** Rezultati mjerenja aktivnosti  $\beta$ -laktamaze u sojevima *S. cerevisiae* transformiranih s: (A) pRSII423\_CCW12bla, (B) pRSII423\_3G\_CCW12bla, (C) pRSII423\_5G\_CCW12bla. Aktivnost  $\beta$ -laktamaze kod sojeva u kojima su prekomjerno eksprimirane podjedinice GPI-transamidaze (B i C) prikazane su u odnosu na soj koji ne sadrži gene za prekomjernu ekspresiju podjedinica GPI-transamidaze (A).

Kod svih analiziranih transformanata kod kojih su bile prekomjerno eksprimirane podjedinice GPI-transamidaze došlo je do smanjenja aktivnosti  $\beta$ -laktamaze u usporedbi s njezinom aktivnošću kod divljeg tipa transformiranog s pRSII423\_CCW12bla, tj. kod pRSII423\_3G\_CCW12bla transformanata došlo je do smanjenja aktivnosti na oko 40%, a kod pRSII423\_5G\_CCW12bla transformanata na oko 50% aktivnosti u odnosu na aktivnost u divljem tipu kvasca. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako prekomjernom ekspresijom GPI-transamidaze dolazi do smanjenja aktivnosti  $\beta$ -laktamaze.

Iako se na osnovu rezultata imunoblota vidi da nema značajnije promjene u ukupnoj količini GPI vezanih proteina u stijenkama stanica koje su bile transformirane pRSII423\_3G\_CCW12bla plazmidom i onih transformiranih pRSII423\_5G\_CCW12bla plazmidom u usporedbi sa stanicama transformiranim s pRSII423\_CCW12bla plazmidom, mjerenje aktivnosti  $\beta$ -laktamaze je pokazalo da je u ovim mutantima smanjena aktivnosti imobiliziranog rekombinantnog proteina. Pri tome je izmjerena aktivnost  $\beta$ -laktamaze u uzorku koji je sadržavao stanice transformirane pRSII423\_3G\_CCW12bla plazmidom bila je neznatno niža od aktivnosti izmjerene u uzorku sa stanicama transformiranih pRSII423\_5G\_CCW12bla plazmidom.

## 4.2. RASPRAVA

Kvasac *S. cerevisiae* jednostanična je i nepatogena gljiva iz castva *Fungi* također poznata kao pekarski, pivski i prehrabeni kvasac, te modelni organizam za provođenje istraživanja gotovo svih bioloških procesa u eukariota. Odlikuju ga jednostavan uzgoj, kratko generacijsko vrijeme, lako transformiranje, visoka učinkovitost fermentacije i mnogo drugih poželjnih svojstava. Stanična stijenka kvasca složena je struktura koja stanici daje čvrstoću i oblik te ju štiti od vanjskih čimbenika. Građena je od  $\beta$ -1,3- i  $\beta$ -1,6-glukana, malog udjela hitina, te glikoproteina vezanih na razne načine na staničnu stijenku. Proteini se na staničnu stijenku vežu kovalentnim ili nekovalentnim vezama. Nevalentno mogu biti vezani za  $\beta$ -1,3-glukan, a kovalentno preko GPI sidra za  $\beta$ -1,6-glukan, te esterskim vezama koje se stvaraju između glutamina u repetitivnim sekvencama Pir proteina i  $\beta$ -1,3-glukana (Marcel Van Der Vaart i sur., 1995).

U posljednje vrijeme sve češće se koristi metoda YSD-a koja se temelji na konstrukciji rekombinantnih proteina fuzijom otvorenog okvira čitanja gena koji kodira za željeni protein s otvorenim okvirom čitanja gena koji kodira za native proteine stanične stijenke. Fuzija proteina od interesa kojeg želimo imobilizirati na staničnu stijenku može se obaviti vezanjem za N- ili C-terminalni kraj ili unutar nativnog proteina stanične stijenke (Lozančić i sur., 2019). U ovom završnom radu protein od interesa bila je  $\beta$ -laktamaza, a protein stanične stijenke s kojim je bila fuzionirana bio je Ccw12. Ccw12 primjer je proteina koji je za staničnu stijenku vezan preko ostatka GPI sidra (Borges i sur., 2021).

Osnovni plazmidi korišteni u ovom radu bili su pRSII423\_5G\_CCW12bla i pRSII423\_3G\_CCW12bla u kojima je gen *CCW12bla* konstruiran fuzijom otvorenog okvira čitanja gena *CCW12* s otvorenim okvirom čitanja gena *bla* koji kodira za  $\beta$ -laktamazu. Ekspresijom novokonstruiranog gena dobiva se rekombinantni protein Ccw12bla koji se na staničnu stijenku kvasca veže preko ostatka GPI sidra. Aktivnost ovog proteina bila je praćena spektrofotometrijski dodatkom žuto obojenog nitrocefina kao supstrata te mjerenjem koncentracije nastale crveno obojane cefalosporinske kiseline. Razlika između ova tri plazmida bila je to što je plazmid pRSII423\_5G\_CCW12bla sadržavao genetičku informaciju za svih pet podjedinica GPI-transamidaze, pRSII423\_3G\_CCW12bla je sadržavao samo tri, a pRSII423\_CCW12bla nijednu. Za provođenje eksperimenta kvasci transformirani plazmidima pRSII423\_3G\_CCW12, pRSII423\_5G\_CCW12, pRSII423\_CCW12 bili su korišteni kao negativna kontrola.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj prekomjerne ekspresije GPI-transamidaze na ugradnju heterolognih proteina u staničnu stijenku kvasca, i samim time, poboljšati i omogućiti daljnji razvoj metode izlaganja rekombinantnih proteina na površinu stanične stijenke. Provedenim biotiniziranjem postigli smo označavanje proteina stanične stijenke biotinom te su tako označeni proteini detektirani imunoblotom pomoću kompleksa streptavidin-peroskidaze. Intenzitet signala proporcionalan je količini proteina.

Na temelju ovih rezultata možemo zaključiti kako je za povećanu imobilizaciju rekombinantnih proteina na površinu stanične stijenke kvasca, od stanica korištenih u ovom radu, najbolje koristiti one u kojima ne dolazi do prekomjerne ekspresije GPI-transamidaze. Jedan od mogućih razloga za smanjenje količine imobiliziranog rekombinantnog proteina na površini stanične stijenke u transformantima je odgovor stanice na stres izazvan prekomjernom ekspresijom GPI-transamidaze koji može utjecati na opću funkcionalnost stanica, uključujući posttranslacijske modifikacije i transport proteina. Prekomjerna ekspresija GPI-transamidaze može izazvati stres u ER, što rezultira aktivacijom odgovora na stres, uključujući nakupljanje pogrešno smotanih proteina i aktivaciju unutarstaničnih signalnih puteva kao što je UPR (engl.: *unfolded protein response*) (Xiao i sur., 2023). Rezultati aktivacije UPR su: smanjenje sinteze proteina kako bi se smanjilo opterećenje ER-a novosintetiziranim proteinima, povećanje kapaciteta za smatanje proteina, degradacija pogrešno smotanih proteina te indukcija apoptoze u slučaju kada je ER predugo izložen stresu (Walter i Ron, 2011). Osim toga, povećana proizvodnja proteina može iscrpiti stanične resurse potrebne za pravilno smatanje i modifikaciju proteina, dodatno pojačavajući odgovor stanice na stres i potencijalno smanjujući učinkovitost imobilizacije (Gasser et al., 2008). Stoga, istovremena prekomjerna ekspresija gena koji kodiraju za rekombinantne proteine i gena koji kodiraju za podjedinice GPI-transamidaze u stanici može dovesti do sinteze veće količine rekombinantnih proteina, no oni ne moraju biti pravilno smotani ili lokalizirani (Gasser i sur., 2008). Transformacija plazmidom i prekomjerna ekspresija gena može uzrokovati preopterećenje metaboličkog kapaciteta stanica, smanjujući efikasnost sinteze i drugih staničnih proteina (Vavouri i sur., 2009). Moguće strukturne promjene stanične stijenke uslijed prekomjerne ekspresije GPI-transamidaze također mogu rezultirati slabijom imobilizacijom (Gasser i sur., 2008).



## 5. ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobivenih u ovom eksperimentalnom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Aktivnost rekombinantnog enzima Ccw12bla detektirana je u stanicama divljeg tipa kvasca i u oba transformanta koja su sadržala genetičku informaciju za prekomjernu ekspresiju GPI-tranasmidaze.
2. Prekomjernom ekspresijom GPI-transamidaze smanjuje se aktivnost rekombinantnih proteina Ccw12bla koji se ugrađuju u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae* iako nema značajnije promjene u ukupnoj količini proteina u staničnoj stijenci kvasca.

## 6. POPIS LITERATURE

Baek KR, Rani Ramakrishnan S, Kim SJ, Seo SO (2024) Yeast cell wall mannan structural features, biological activities, and production strategies. *Heliyon* **10**, e27896. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E27896>

Borges AR, Link F, Engstler M, Jones NG (2021) The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Linchpin for Cell Surface Versatility of Trypanosomatids. *Front Cell Dev Biol* **9**

Bruun TH, Grassmann V, Zimmer B, Asbach B, Peterhoff D, Kliche A, i sur. (2017) Mammalian cell surface display for monoclonal antibody-based FACS selection of viral envelope proteins. *MAbs* **9**, 1052–1064. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1364824>

Cherf GM, Cochran JR (2015) Applications of yeast surface display for protein engineering. *Methods in Molecular Biology* **1319**, 155–175. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2748-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2748-7_8)

Garg M, Seeberger PH, Varon Silva D (2016) Glycosylphosphatidylinositols: Occurrence, Synthesis, and Properties. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11657-9>

Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K, i sur. (2008) Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: A host comparative overview. *Microb Cell Fact* **7**

Han MJ (2020) Novel bacterial surface display system based on the escherichia coli

protein mipa. *J Microbiol Biotechnol* **30**, 1097–1103.  
<https://doi.org/10.4014/jmb.2001.01053>

Harvey F.L., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., i sur. (2002) *Molecular Cell Biology*, 4th edn. W. H. Freeman and Company, New York; Basingstoke.

Kinoshita T, Murakami Y, Morita YS (2007) Diseases Associated with GPI Anchors. *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology* **4–4**, 393–419. <https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00102-1>

Liu SS, Jin F, Liu YS, Murakami Y, Sugita Y, Kato T, i sur. (2021) Functional analysis of the gpi transamidase complex by screening for amino acid mutations in each subunit. *Molecules* **26**. <https://doi.org/10.3390/molecules26185462>

Lozančić M, Hossain AS, Mrša V, Teparić R (2019) Surface display—an alternative to classic enzyme immobilization. *Catalysts* **9**. <https://doi.org/10.3390/catal9090728>

Marcel Van Der Vaart J, Heleen L, Caro P, Chapman JW, Klis FM, Verrips CT (1995) Identification of Three Mannoproteins in the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*

Pittet M, Conzelmann A (2007) Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1771**, 405–420.  
<https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2006.05.015>

Ribeiro RA, Bourbon-Melo N, Sá-Correia I (2022) The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. *Front Microbiol* **13**

Salari R, Salari R (2017) Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electron Physician* **9**, 3592–3597. <https://doi.org/10.19082/3592>

Sauer LM, Canovas R, Roche D, Shams-Eldin H, Ravel P, Colinge J, i sur. (2023) FT-GPI, a highly sensitive and accurate predictor of GPI-anchored proteins, reveals the composition and evolution of the GPI proteome in *Plasmodium* species. *Malar J* **22**. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04430-0>

Stewart GG (2014) SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* 309–315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>

Tasumi S, Kobayashi K, Takanashi S, Asakawa S, Nakamura O, Kikuchi K, i sur. (2019) Expression and presentation of immune-related membrane proteins of fish by a cell surface display platform using insect cells. *Mol Immunol* **114**, 553–560. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2019.07.020>

Teparić R, Stuparević I, Mrša V (2010) Incorporation of homologous and heterologous proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Food Technol Biotechnol* **48**

Teymennet-Ramírez K V., Martínez-Morales F, Trejo-Hernández MR (2022) Yeast Surface Display System: Strategies for Improvement and Biotechnological Applications. *Front Bioeng Biotechnol* **9**

Vavouri T, Semple JI, Garcia-Verdugo R, Lehner B (2009) Intrinsic Protein Disorder

and Interaction Promiscuity Are Widely Associated with Dosage Sensitivity. *Cell* **138**, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.029>

Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081–6. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>

Xiao C, Xue S, Pan Y, Liu X, Huang M (2023) Overexpression of genes by stress-responsive promoters increases protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* **39**, 203. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03646-9>

Yi L, Bozkurt G, Li Q, Lo S, Menon AK, Wu H (2017) Disulfide Bond Formation and N-Glycosylation Modulate Protein-Protein Interactions in GPI-Transamidase (GPIT). *Sci Rep* **8**. <https://doi.org/10.1038/srep45912>

### Izjava o izvornosti

Ja                     Hana Pospiš                     izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Hana Pospiš

Vlastoručni potpis