

Ispitivanje utjecaja N-glikozilacije i endocitoze na ugradnju heterolognih proteina u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Orešković, Nikolina

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:159:832036>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Nikolina Orešković

7543/BT

**ISPITIVANJE UTJECAJA N-GLIKOZILACIJE I
ENDOCITOZE 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 N-GLIKOZILACIJE I ENDOCITOZE NA UGRADNJU HETEROLOGNIH PROTEINA U STANIČNU STIJENKU KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Nikolina Orešković, 0006033879

Sažetak: Izlaganje proteina na staničnoj površini ("surface display") predstavlja poboljšanu tehniku imobilizacije proteina te omogućuje kontinuiranu sintezu rekombinantnih proteina zahvaljujući fuziji gena koji kodira za ispitivani enzim i gena koji kodiraju za native proteine stanične stijenke. U ovom radu rekombinantni protein β -laktamaza (gen *bla*) fuzioniran je sa proteinom Pir2, odnosno sa dijelom proteina Ccw12. Pir2 veže se za stijenkiju svojim N-terminalnim dijelom. Dio gena *CCW12*, korišten u ovom radu, kodira za C-terminalnu signalnu sekvencu na koju se veže GPI-sidro, preko kojeg se protein veže u stijenkiju. Najveći je nedostatak ovakvog pristupa mali prinos imobiliziranih proteina u stijenkiju. S pretpostavkom da mutacije u N-glikozilaciji i endocitozi povećavaju učinkovitost imobilizacije ispitivan je utjecaj mutacija u N-glikozilaciji (*och1* mutant i *mnn* mutanti) te mutacija u endocitozi (*vam4* mutant i *end* mutanti) na efikasnost ugradnje rekombinantnog proteina u stijenkiju mjerenjem aktivnost β -laktamaze, što omogućuje procjenu količine imobiliziranog rekombinantnog proteina u staničnoj stijenci.

Ključne riječi: "surface display" sustav, N-glikozilacija, endocitoza, Pir2, Ccw12

Rad sadrži: 36 stranica, 13 slika, 10 tablica, 34 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: dr. sc. Mateja Lozančić

Datum obrane: 16. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

EFFECT OF N-GLYCOSYLATION AND ENDOCYTOSIS ON INCORPORATION OF HETEROLOGUS PROTEINS IN THE *Saccharomyces cerevisiae* CELL WALL

Nikolina Orešković, 0006033879

Abstract: „Surface display“ system provides enhanced immobilization technique that enables continuous synthesis of recombinant protein. This is possible because of the genetic fusion between genes encoding for native cell wall proteins and enzyme that is researched. In this study the enzyme β -lactamase (gene *bla*) and Pir2 or a fragment of Ccw12 are fused. Pir2 is linked to the cell wall on its N-terminal end, while Ccw12 is linked to the cell wall by GPI anchor on C-terminal region. One of the major disadvantages of this approach is low yield in protein immobilization. With the assumption that mutation in N-glycosylation and endocytosis enhances surface display system efficiency, this system was examined in mutants in N-glycosylation (*och1* mutant and *mnn* mutants) and in mutants in endocytosis (*vam4* mutant and *end* mutants). By measuring β -lactamase activity, it is possible to estimate the amount of recombinant protein immobilized in cell wall.

Keywords: „surface display“ system, N-glycosylation, endocytosis, Pir2, Ccw12

Thesis contains: 36 pages, 13 figures, 10 tables, 34 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: Ph.D. Renata Teparić, Full professor

Technical support and assistance: Ph.D. Mateja Lozančić

Defence date: September 16th 2021

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. Stanična stijenka kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2.1. Polisaharidi stanične stijenke.....	3
2.2.2. Proteini stanične stijenke	3
2.3. Ugradnja heterolognih proteina u staničnu stijenku kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.4. Glikozilacija.....	6
2.4.1. O-glikozilacija	7
2.4.2. N-glikozilacija.....	8
2.5. Endocitoza.....	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Kemikalije.....	11
3.1.2. Uređaji.....	11
3.2. Laboratorijski sojevi, hranjive podloge i plazmidi	12
3.2.1. Sojevi kvasaca i bakterija	12
3.2.1.1. Soj bakterije <i>E. coli</i>	12
3.2.1.2. Sojevi kvasca <i>S. cerevisiae</i>	12
3.2.2. Hranjive podloge.....	13
3.2.2.1. Podloga za uzgoj bakterija <i>E. coli</i> (LB)	13
3.2.2.2. Podloga za uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> (YNBP).....	13
3.2.2.3. Hranjiva podloga za indukciju <i>PHO5</i> promotora	14
3.2.3. Plazmidi	16
3.2.3.1. Plazmid pRSII423 <i>PIR2</i>	16
3.2.3.2. Plazmid pRSII423 <i>PIR2bla</i>	16
3.2.3.3. Plazmid pRSII423 <i>CCW12bla</i>	17
3.2.3.4. Plazmid pRSII423 <i>CCW12</i>	17
3.3. Metode.....	18
3.3.1. Izolacija plazmida iz stanica <i>E. coli</i>	18
3.3.2. Određivanje koncentracije DNA	18
3.3.3. Restriksijska analiza izoliranih plazmida.....	18
3.3.4. Gel elektroforeza DNA	19

3.3.5. Transformacija stanica kvasca litij-acetatnom metodom.....	19
3.3.6. Uzgoj kvasaca uz indukciju PHO5 promotora	20
3.3.7. Određivanje aktivnosti β -laktamaze na površini stanica kvasca.....	20
3.3.8. Određivanje aktivnosti β -laktamaze u hranjivim podlogama	21
4. REZULTATI	22
4.1. Restriksijska analiza i gel elektroforeza plazmidne DNA	22
4.2. Transformacija stanica kvasaca	23
4.3. Mjerenje aktivnosti transformiranih stanica i odgovarajućih hranjivih podloga.....	23
5.RASPRAVA.....	27
6.ZAKLJUČCI	32
7.LITERATURA	33

1.UVOD

U posljednje vrijeme, proizvodnja heterolognih proteina u kvascu poboljšala se zbog napretka u modernim sintetskim biološkim pristupima i sustavima. Kako bi se izbjegla mogućnost denaturacije enzima uslijed kemijskog tretmana prilikom imobilizacije na netopive nosače, koristi se sustav izlaganja proteina na površini stanice („surface display“ sistem). Tom se metodom rekombinantni protein eksprimira u stanici kvasca te se kovalentno ugradi na površinu stanice. Protein korišten za imobilizaciju proteina od interesa mora imati odgovarajuću signalnu sekvencu koja će omogućiti fuzioniranom proteinu ulazak u sekretorni put kvasca i čvrsto vezanje rekombinantnog proteina za površinu stanice. Način fuzioniranja željenog heterolognog proteina sa proteinom stanične stijenke kvasca vrlo je bitan jer utječe na efikasnost imobilizacije, posttranslacijske modifikacije te aktivnost heterolognog proteina.

Ugradnja rekombinantnih proteina od interesa u staničnu stijenku nudi poboljšanje u vidu manje mogućnosti denaturacije nosintetiziranog proteina tijekom imobilizacije na krute nosače. Uz navedeno, prednost takve imobilizacije proteina je smanjeni trošak izolacije i pročišćavanja proteina. U posljednje vrijeme pretpostavlja se kako mutacije u genima koji kodiraju za proteine uključene u procese N-glikozilacije i endocitoze posjeduju potencijal za postizanje većih prinosa heterolognih proteina ekspimiranih u stanici kvasca.

Cilj je ovog rada ispitati utjecaj N-glikozilacije i endocitoze na ugradnju heterolognih proteina u staničnu stijenku kvasca. Mutanti u endocitozi i N-glikozilaciji transformirani su plazmidima koji sadrže fuzionirane gene za enzim β -laktamaze i gene koji kodiraju za proteine stanične stijenke. Pritom su korištena dva proteina stanične stijenke koji se na različite načine ugrađuju u stijenku. Ccw12 protein ugrađuje se u stijenku preko GPI-sidra na svom C-terminalnom kraju, dok se Pir2 protein svojim N-terminalnim krajem veže kovalentno na stijenku. Korištena su dva različita načina kovalentne ugradnje kako bi se odredio prihvatljiviji način imobilizacije za ovaj rekombinantni enzim. Mjereći aktivnost β -laktamaze, odnosno spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije produkta razgradnje nitrocefina, procijenila se količina ekspimiranog rekombinantnog proteina i njegova količina u staničnoj stijenci, odnosno u hranjivim podlogama različitih mutanata kvasca u endocitozi i N-glikozilaciji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* nepatogeni je jednostanični eukariotski organizam koji pripada carstvu *Fungi*. Optimalna mu je temperatura rasta u rasponu od 28°C do 30°C te je aktivan i u kiselom okruženju uz toleranciju na visoke koncentracije etanola i nisku razinu kisika. Pri optimalnoj temperaturi, generacijsko vrijeme iznosi približno 90 minuta, što je relativno kratko te zbog toga pogodno za mnoga istraživanja. Može se razmnožavati spolno, mejozom i nespolno, pupanjem. Osim navedenog, karakteriziraju ga i jeftin uzgoj te laka genetička manipulacija. Genom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prvi je sekvencionirani genom nekog eukariotskog organizma. Zbog navedenih karakteristika, kvasac *S. cerevisiae* izvrsna je eukariotska platforma za kemijsku proizvodnju te proizvodnju biogoriva. Također, modelni je organizam korišten za jednostavna istraživanja koja omogućavaju otkriće funkcionalne povezanosti između sekvence gene i genskog produkta u carstvu *Fungi*, no također i u višim organizmima. Koristi se i kao platforma za proizvodnju biofarmaceutskih proizvoda te gotovo 20% odobrenih proizvoda sintetizira ovaj domaćin (Ferrer-Miralles i sur., 2009).

2.2. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dinamična je struktura koja stanici kvasca osigurava mehaničku i osmotsku stabilnost te stanici daje čvrstoću i oblik (Eamus i sur., 1986). S druge strane, podložna je promjenama u kemijskom sastavu, fizičkim svojstvima te obliku, ovisno o fazi staničnog rasta, tijekom parenja ili sporulacije (Klis i sur., 2002). Sastoji se od unutarnjeg sloja građenog od polisaharida, koji osigurava osmotsku i mehaničku stabilnost te vanjskog sloja građenog od manoproteina, koji osigurava komunikaciju stanice s okolinom.

2.2.1. Polisaharidi stanične stijenke

Staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izgrađuju polisaharidi koji su polimeri β -1,3-glukana i β -1,6-glukana, građenih od glukoze, hitin koji je građen od N-acetilglukozamina te manan koji je građen od manoze. Hitin, β -1,3-glukan i β -1,6-glukan određuju oblik stanice kvasca te osiguravaju njenu mehaničku i osmotsku stabilnost, dok manan čini polisaharidni dio manoproteina stanične stijenke i ograničava njezinu propusnost. β -1,3-glukan je ravnolančani polimer izgrađen od otprilike 1500 glukoznih jedinica povezanih u lance. Lanci β -1,3-glukana formiraju strukturu uzvojnice čime se osigurava čvrstoća i osmotska stabilnost stanične stijenke (Lesage i Bussey, 2006). Prilikom sinteze stanične stijenke prvi se sintetizira β -1,3-glukan koji se zatim kovalentno povezuje sa β -1,6-glukanom i hitinom, pri čemu se 40-50% hitina reducirajućim krajem povezuje β -1,4- glikozidnom vezom s nereducirajućim krajem β -1,3-glukana (Lesage i Bussey, 2006). Brojni proteini smješteni u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevom tijelu i staničnoj membrani utječu na količinu β -1,6-glukana u stanici (Aimanianda i sur., 2009). β -1,6-glukan stabilizira staničnu stijenku zbog uloge u povezivanju ostalih komponenata stijenke. Hitin je linearni polimer N-acetilglukozamina te je izgrađen od otprilike 190 monomernih jedinica, povezanih pomoću enzima hitin sintaze. Manan je razgranati polisaharid koji čini ugljikohidratni dio manoproteina smještenih u vanjskom sloju stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.2. Proteini stanične stijenke

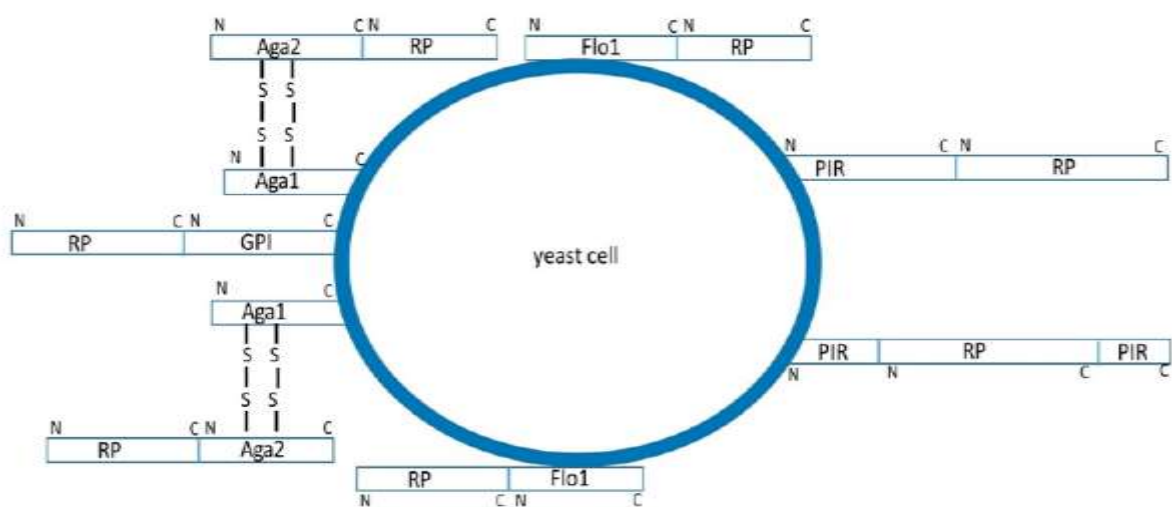
Vanjski sloj stanične stijenke *S.cerevisiae* najvećim se dijelom sastoji od manoproteina. Manoproteini, u staničnoj stijenci, zauzimaju 35% suhe tvari stanične stijenke, a do sada je otkriveno više od 30 proteina čija je uloga još uvijek većinom nerazjašnjena. Istraživanja pokazuju kako uklanjanje pojedinih proteina iz stanične stijenke ne dovodi do većih promjena osmotske stabilnosti, niti do promjene oblika, no smatra se kako prisutnost manoproteina utječe na poroznost i transport molekula iz periplazmatskog prostora u stanicu (De Nobel i sur., 1990). Manoproteini se međusobno razlikuju prema tipu glikozilacije koja može biti N-glikozilacija ostataka asparagina ili O-glikozilacija ostataka serina i treonina. Obje glikozilacije neophodne su za rast stanica kvasca, a određeni poremećaji u procesima glikozilacije mogu djelovati letalno na stanicu (Lesage i Bussey, 2006). Većina manoproteina je i N-glikozilirana i O-glikozilirana. Dugački lanci N-glikoziliranih manoproteina prekrivaju stanicu, stoga većina molekula ili stanica koja dolazi u neposrednu blizinu kvasca prvo stupa u interakciju s

mananom. Ono što i dalje interesira znanstvenike u vezi stanične stijenke je strahovita kompleksnost strukture stijenke u čijoj biosintezi sudjeluje velik broj proteina. Uz sve navedeno, na sam proces troši se pozamašna količina energije (Teparić i sur., 2010). Manoproteini se također razlikuju prema načinu vezanja na β -1,3 i β -1,6-glukan stanične stijenke te se mogu podijeliti u dvije skupine. Prvoj skupini pripadaju manoproteini koji se nekovalentno vežu u staničnu stijenku te se iz stanične stijenke izoliraju kuhanjem u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptotetanolu. Drugoj skupini pripadaju manoproteini koji se kovalentno vežu na glukanski sloj stanične stijenke. Skupini kovalentno vezanih proteina pripadaju proteini koji se na β -1,6-glukan vežu preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra, koji se iz stanične stijenke izoliraju tretmanom s glukanzama te proteini PIR porodice (Proteins with Internal Repeats) koji se iz stanične stijenke izoliraju tretmanom sa NaOH (Mrša i sur., 1997). Proteini iz PIR porodice direktno se vežu na β -1,3-glukan preko glutaminskih ostataka koji se nalaze unutar njihovih specifičnih ponavljajućih sekvenci (Ecker i sur., 2006). Uloge Pir proteina i velikog broja GPI-proteina (npr. Ccw12) i dalje su u velikoj mjeri nepoznate i nedovoljno istražene, no *ccw12* mutanti pokazuju povećanu smrtnost u stacionarnoj fazi rasta (Mrša i sur., 1999).

2.3. Ugradnja heterolognih proteina u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Proizvodnja proteina u kvascu *S.cerevisiae* nudi prednost u usporedbi s proizvodnjom proteina u kulturama stanica sisavaca ili insekata u vidu bolje nutritivne kakvoće i skalabilnosti. U posljednje vrijeme, proizvodnja heterolognih proteina poboljšala se zbog napretka u modernim sintetskim biološkim pristupima i sustavima. Takvim poboljšanjem smanjena su ograničenja koja su bila prisutna zbog niskog prinosa i problema s posttranslacijskim modifikacijama (Rodriguez-Limas i sur., 2013). Uobičajene kemijske metode imobilizacije komplicirane su i skupe te koriste kemijski tretman proteina kako bi osigurale kovalentno vezanje proteina na određeni nosač ili vezanje proteina na nosač nekovalentnim vezama. Kako bi se izbjegla mogućnost denaturacije enzima uslijed kemijskog tretmana koristi se „surface display“ sistem. Tom se metodom rekombinantni protein eksprimira u stanici kvasca te se kovalentno ugradi na površinu stanice. Tako ekspimiran i ugrađen protein čvrsto je vezan za staničnu stijenku. Kako bi se heterologni protein ugradio na površinu stanice, gen koji kodira za taj protein mora biti fuzioniran s genom za neki protein stanične stijenke ili s njihovim fragmentom. To omogućuje ugradnju na površinu stijenke (Abe i sur., 2004; Matsumoto i sur.,

2002; Nakamura i sur., 2001; van der Vaart i sur., 1997). Fuzioniranje proteina moguće je preko N- ili C-terminalnog kraja proteina ili je moguće ugraditi željeni protein unutar sekvence proteina stanične stijenke. Gdje će se ugraditi ovisi o proteinu koji se imobilizira i njegovim svojstvima. Protein korišten za imobilizaciju proteina od interesa mora imati odgovarajuću signalnu sekvencu koja će omogućiti fuzioniranom proteinu odlazak u sekretorni put kvasca i čvrsto vezanje rekombinantnog proteina za površinu stanice. Čvrsto vezanje nužno je da bi se spriječilo ispuštanje proteina sa stijenke u podlogu odnosno vanstanični prostor. Način fuzioniranja željenog heterolognog proteina vrlo je bitan jer utječe na efikasnost imobilizacije, stabilnost, posttranslacijske modifikacije te aktivnost heterolognog proteina (Teparić i sur., 2010).



Slika 1. 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; RP -rekombinantni protein koji se ugrađuje u stijenku; Aga1, Aga2, Flo1- proteini stanične stijenke.

Heterologni proteini mogu se fuzionirati s GPI-vezanim proteinima stanične stijenke (npr. Ccw12) ili mogu biti fuzionirani sa Pir proteinima (npr. Pir2). Najčešće korišteni proteini vezani preko GPI-sidra za imobilizaciju su: a-aglutinin, α -aglutinin, Cwp1, Cwp2, Ccw12 i Spi1. a-aglutinin kvasca *S.cerevisiae* sastoji se od dvije podjedinice. Prva, Aga1 povezana je sa stijenkom preko GPI-sidra, a s drugom podjedinicom odnosno Aga2 povezana je disulfidnim mostovima. Heterologni protein povezan s Aga2 podjedinicom omogućuje njegovu ugradnju i imobilizaciju na površini stanice (Ryckaert i sur., 2005; Liu i sur., 2010; Parthasarathy i sur.,

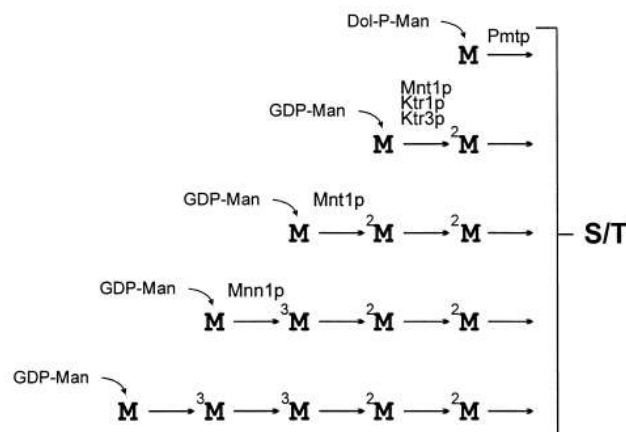
2006; Van den Beucken i sur., 2003; Lin i sur., 2003; Boder i sur., 2005). Za razliku od a-aglutitin sustava koji, zahvaljujući fuzioniranju s Aga2 podjedinicom, omogućuje imobilizaciju preko C- ili N-terminalnog kraja heterolognog proteina, Flo1 sustav pogodan je za imobilizaciju preko N-terminalnog kraja heterolognog proteina (Kondo i Ueda, 2004). N-terminalni kraj heterolognog proteina fuzionira se s flokulacijskom domenom koju posjeduje Flo1 sustav (Watari i sur., 1994) kako bi se omogućila ugradnja u staničnu stijenku. Budući da GPI-vezani proteini nisu pogodni za enzime čije je aktivno mjesto blizu C-terminalnog kraja enzima, za uspješnu imobilizaciju preko N-terminalnog kraja heterolognog proteina najperspektivnije je fuzionirati protein s proteinima Pir porodice koji na N-terminalnom kraju sadrže prepoznatljive sekvence duljine dvanaest aminokiselina koje se ponavljaju dva do jedanaest puta. Gen heterolognog proteina može se ugraditi i unutar gena koji kodira za Pir protein (Lozančić i sur., 2019)(slika 1).

2.4. Glikozilacija

Glikozilacija proteina sveprisutna je u eukariota i najčešća je posttranslacijska modifikacija koja se zbiva u sekretornom putu kvasca. Glikozilacija sudjeluje u širokom spektru biokemijskih i staničnih procesa kao što su: smatanje proteina, održavanje staničnih struktura, interakcija receptora i liganda te stanično signaliziranje, međusobno prepoznavanje stanica te obrana (Helenius i Aebi, 2004; Dube i Bertozzi, 2005). Najveći dio glikoziliranih proteina kvasca *Saccharomyces cerevisiae* čine već spomenuti manoproteini koji se nalaze u vanjskom sloju stanične stijenke. Enzime, koji sudjeluju u procesu glikozilacije, dijelimo na glikoziltransferaze i glikozidaze. Glikozidaze kataliziraju reakciju hidrolize glikozidnih veza u strukturi glikana, dok glikoziltransferaze kataliziraju prijenos šećera na supstrat s donora šećera u obliku nukleotidnog donora. Postoje dva osnovna tipa glikozilacije: N-glikozilacija i O-glikozilacija. Razlikuje ih mjesto dodatka odgovarajućih ugljikohidratnih jedinica. Ukoliko se ugljikohidrat dodaje na specifični ostatak asparagina radi se o N-glikozilaciji, dok dodatak ugljikohidrata na ostatke treonina ili serina obilježava O-glikozilaciju. N-glikani razgranati su i dugački te ih odlikuje N-glikozidna veza. Za razliku od N-glikana, O-glikani povezani su O-glikozidnom vezom te su češći, kraći i nisu razgranati (Tanner i sur., 1998). Glikozilacija je nužna kod heterolognih proteina kojima je određen stupanj glikozilacije potreban za točno smatanje i biološku aktivnost.

2.4.1. O-glikozilacija

Proces O-glikozilacije započinje u endoplazmatskom retikulumu (ER). Prvi je korak prenošenje molekule dolihol-fosfat-manoze (Dol-P-Man), koja mora biti aktivirana, na specifični treoninski ili serinski ostatak proteina. Slijedi reakcija vezanja molekule manoze, koja se prenosi s molekule Dol-P-Man. Šest proteina Pmt porodice može provoditi ovu reakciju (Pmt1-Pmt6) (Strahl-Bolsinger i sur., 1999). Pmt proteini pripadaju jednoj od tri podskupine Pmt proteina (PMT1, PMT2, PMT4) i funkcioniraju kao homo- ili heterodimeri, čije se podjedinice povezuju ovisno o tome kojoj od 3 podskupine pripadaju. Isključivo protein Pmt4 tvori homodimere, dok ostali Pmt proteini tvore heterodimere. Ono što razlikuje navedene dimere različita je sposobnost vezanja na različite proteine. Nakon što se vezala prva molekula manoze, glikoprotein se transportira u Golgijev aparat, gdje dolazi do daljnje nadogradnje do gotovog O-glikana. Manoziltransferaze Kre2, Ktr1 i Ktr3 kataliziraju produljivanje α -1,2-manoznih lanaca. Četvrta i peta molekula manoze povezuju se α -1,3-glikozidnom vezom uz pomoć enzima Mnn1, Mnt2 i Mnt3. Za vezanje četvrte molekule manoze najzaslužniji je enzim Mnn1, dok su Mnt2 i Mnt3 zaslužni za povezivanje pete molekule manoze u procesu nastanka O-glikana (Romero i sur. 1998) (slika 2).

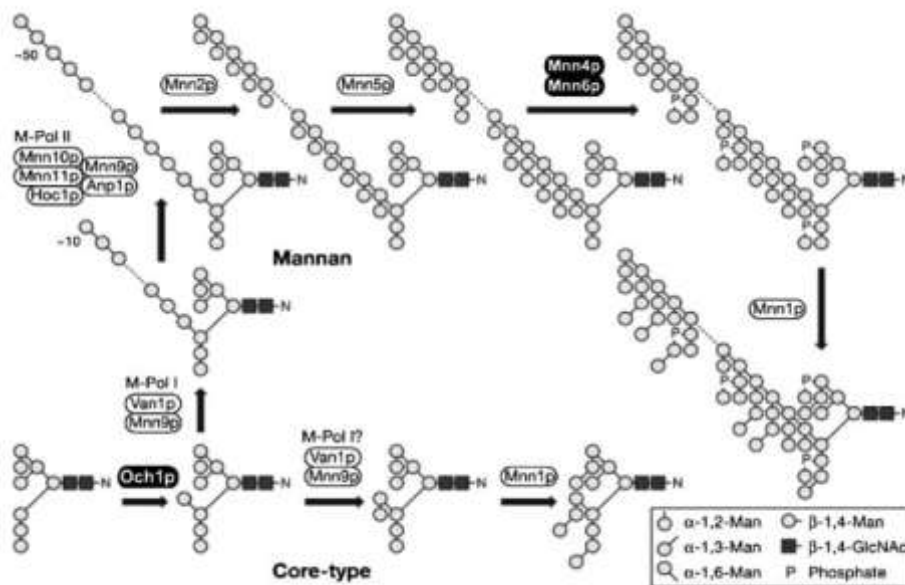


Slika 2. Struktura i biosinteza O-glikana u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Proteini Pmt skupine (Pmt1 do Pmt6); proteini Mnt1, Ktr1, Ktr3 i Mnn1 su manoziltransferaze koje sudjeluju u sintezi O-glikana (Stahl-Bolsinger i sur.,1999).

2.4.2. N-glikozilacija

Proces N-glikozilacije, baš poput O-glikozilacije započinje u endoplazmatskom retikulumu (ER). Dolihol-pirofosfat oligosaharid ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$), poznat i kao središnja jedinica, sintetizira se i prenosi na specifični asparaginski ostatak proteina u nastajanju. Potom se pomoću OST kompleksa (oligosaccharyltransferase) novosintetizirani protein zajedno sa dolihol-pirofosfat oligosaharidom prenosi u ER (Kelleher i Gilmore, 2006). Nakon nastajanja kompleksa proteina i oligosaharida, iz oligosaharidnog lanca uklanja se jedna manozna i tri glukozne jedinice (Herscovics, 1999). Navedeni korak ključan je zbog smatanja proteina u endoplazmatskom retikulumu. Pogrešno smotane proteine prepoznaju posebni enzimi i šalju ih u sustav za degradaciju pogrešno smotanih proteina, dok pravilno smotani glikoproteini putuju u Golgijev aparat, gdje se dalje modificiraju. U kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, za razliku od sisavaca, ne dolazi do skraćivanja novonastalog N-glikana, nego dolazi do nadogradnje u vidu dvije različite opće strukture. Prva moguća struktura sastoji se od dugačkih polimernih lanaca sastavljenih od približno 200 jedinica šećera manoze. Ovakve strukture prisutne su kod proteina periplazme i stanične stijenke (Guillen i sur., 1999). Proces manozilacije započinje u početnom dijelu Golgijevog aparata, gdje protein Och1 (α -1,6-manoziltransferaza) katalizira reakciju dodatka jedne molekule manoze (Nakayama i sur., 1992; Nakanishi-Shindo i sur., 1993; Harris i Waters, 1999). Glavni je izvor manoze u procesu manozilacije UDP-manoza. Uz Och1, u početnom dijelu Golgijevog aparata, nalaze se još dvije α -1,6-manoziltransferaze (M-Pol I i M-Pol II kompleksi) (Jungmann i sur., 1999; Kojima i sur., 1999). Strukturama koje su građene od dugačkih razgranatih polimera duljine približno 200 manoznih molekula, M-Pol I kompleks dodaje 10 molekula manoze na postojeći lanac. Zatim M-Pol II kompleks produljuje do 50 jedinica manoze. Enzimi Mnn10 i Mnn11, dio su kompleksa manoziltransferaze, te su odgovorni za većinu α -1,6-polimerazne aktivnosti (Bartkevičiūtė i sur., 2004). Enzimi Mnn2 i Mnn5, koji posjeduju α -1,2-manoziltransferaznu aktivnost, omogućuju grananja α -1,6-manozne okosnice. Protein Mnn4 regulator je proteina Mnn6 te, regulacijom razine transkripcije gena za protein Mnn4 (gen *MNN4*), dolazi do regulacije prijenosa manozilfosfata na manan (Jigami i Odani, 1999; Odani i sur., 1997). Na kraju procesa, enzim Mnn1 dodaje manoze α -1,3-glikozidnom vezom na rastući lanac manana (Graham i sur., 1994; Yip i sur., 1994). Manoziltransferaze Kre2, Ktr1 i Ktr3, koje sudjeluju u biosintezi O-glikana, također sudjeluju i u sintezi manana (Lussier i sur., 1999). Druga moguća struktura nalazi se kod intracelularnih proteina i slična je već spomenutoj središnjoj strukturalnoj jedinici, s razlikom što se na nju veže još nekoliko jedinica ugljikohidrata (Gemmill i Trimble, 1999). Kod ovakvih struktura sinteza također započinje s enzimom Och1. Taj enzim veže

molekulu manoze α -1,6-glikozidnom vezom na lanac N-glikana. Na molekulu manoze α -1,2-glikozidnom vezom veže se još jedna molekula manoze koja sprječava produljivanje α -1,6-manoznog lanca. Proteini koji dodaju α -1,2-povezane molekule manoze nisu otkriveni, ali pretpostavka je da u tom procesu sudjeluju M-Pol I kompleks, te proteini Van1 i Mnn9 (Lewis i Ballou, 1991; Stolz i Munro 2002; Rodionov i sur. 2009). Na kraju procesa, kao i kod prve opće strukture, Mnn1 dodaje α -1,3-manozu na lanac N-glikana (slika 3).



Slika 3. Biosintetski put N-glikana u Golgijevom aparatu (Jigami, 2014).

2.5. Endocitoza

Endocitoza je mehanizam koji omogućuje da eukariotska stanica unosi u sebe molekule iz okolnog medija te isto tako može unositi molekule iz citoplazme u stanične organele. Unos proteina u stanicu kvasca endocitozom započinje uvrtanjem citoplazmatske membrane koja potom stvara vezikule. Te vezikule odvajaju se od membrane i pritom unose izvanstanični sadržaj u stanicu u obliku endosoma. U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* eksprimirani heterologni proteini mogu ostati u citoplazmi ili se izlučiti u okolni medij (Porro i sur., 2005). Heterologni proteini koji posjeduju signalne sekvence koje ih usmjeravaju u sekretorni put zahtijevaju puno jednostavnije procese izolacije i pročišćavanja proteina (Chigra i sur., 2008; Hackel i sur., 2006; Kjeldsen i sur., 1996; Liu i sur., 2012; Rakestraw i sur., 2009). Sekretorni

put kvasca pažljivo je reguliran i uključuje više organela na putu proteina prema ekstracelularnom prostoru, staničnoj membrani ili vakuoli (Ellgaard i sur., 1999). Proteini koji su predodređeni za izvanstanični prostor ili organele u sekretornom putu sintetizirani su na ribosomima vezanim za endoplazmatski retikulum i kotranslacijski se prenose u endoplazmatski retikulum (Anelli i sur., 2008). Izlaz iz ER-a pažljivo je kontroliran te samo dobro smotani proteini dopiju do Golgijevog aparata, gdje se događaju važne modifikacije proteina, poput glikozilacije. Ovisno o krajnjoj destinaciji proteina, sortiranje proteina poslije Golgijevog aparata može ići u više različitih smjerova, no jednom kad heterologni protein uđe u egzocitozni put, u stanicu se može ponovno asimilirati endocitozom. Rekombinantni sekretorni proteini se iz periplazmatskog prostora lako vraćaju endocitozom u stanicu prije nego što uspiju difundirati kroz staničnu stijenku (Kübler i sur., 1993). U posljednjem desetljeću genetičko inženjerstvo pokazalo se kao najbolja skupina metoda kojima se pokušavaju riješiti problemi povezani sa sekrecijom proteina. Istraživanja pokazuju da aktinski citoskelet igra veliku ulogu u koraku unošenja molekula u endocitozi kod kvasca (Kübler i sur., 1993). Protein End3 potreban je za baš za taj korak endocitoze kojim se unose molekule u stanicu i za organizaciju citoskeleta (Benedetti i sur., 1994). Mutacije proteina End6 uzrokuju delokalizacije aktina te je takvim kvascima također blokiran korak endocitoze u kojem se unose molekule u stanicu (Munn i sur., 1995). Nekoliko gena u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* igraju ulogu u biogenezi vakuole i usmjeravaju proteine u vakuole. Vakuola je jedan od najistaknutijih organela u stanici kvasca. U stanicama divljeg tipa vakuola zauzima približno četvrtinu volumena stanice kvasca. Međutim, malo se zna o molekularnom mehanizmu biogeneze vakuole. Izolacijom mutanata *vam4* otkriveno je da, za razliku od divljeg tipa, stanica mutanta ima vakuolu koja ima mnogo odjeljaka, odnosno vakuola je fragmentirana. Prilikom izolacije gena *VAM4* otkriveno je da je gen identičan genu *YPT7* koji spada u obitelj GTPaza (Wada i sur., 1996). Protein Vam4/Ypt7 mala je GTPaza obitelji Rab/Ypt u *S. cerevisiae* te igra vitalnu ulogu u nasljeđivanju vakuole (Haas i sur., 1995), prijenosu endosoma u Golgijev aparat (Schimmöller i Riezman, 1993) te endocitozi (Wichmann i sur., 1992). Postoji 9 Vam proteina koji djeluju na morfologiju vakuole. Mutante Vam proteina možemo podijeliti u dvije skupine. Prvoj skupini pripadaju: *vam1*, *vam5*, *vam8* i *vam9*, dok drugoj skupini pripadaju: *vam2*, *vam3*, *vam4*, *vam6* i *vam7*. Druga skupina, kojoj pripada i mutant *vam4*, korišten u ovom eksperimentalnom radu, sadrži brojne male vezikule koje se boje histokemijskim markerima za vakuole te, isto tako, mutant *vam4* sadrži zrele oblike proteina vakuole (Wada i sur., 2002).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- agaroz – Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
- agar – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- antibiotik ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- D(+) glukoza bezvodna – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- ekstrakt kvasca – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- aminokiseline histitin, leucin, triptofan i uracil – Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
- restrikcijski 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, β -merkaptotanol i Na-dodecilsulfat – Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
- N, N, N, N' – tetrametil etilendiamin (TEMED) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- kit za izolaciju plazmida iz stanica *E.coli* NucleoSpin® Plasmid – Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)

Tijekom eksperimentalnog rada kemikalije koje su korištene, a nisu prethodno navedene, nabavljene su od standardnih dobavljača i analitičke su čistoće.

3.1.2. Uređaji

- NanoDrop One – ThermoFischer
- BioSpectromete® basic – Eppendorf

3.2. Laboratorijski sojevi, hranjive podloge i plazmidi

3.2.1. Sojevi kvasaca i bakterija

3.2.1.1. Soj bakterije *E. coli*

Genotip bakterijskog soja *E. coli* (DH5 α) korišten za umnažanje plazmida:

F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1

3.2.1.2. Sojevi kvasca *S. cerevisiae*

Tablica 1. Genotip svih kvasaca koji su korišteni u ovom eksperimentu

Soj kvasca	Genotip
BY4741 wt	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0;
BY4741 <i>vam4</i>	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YML001w::kanMX4
BY4741 <i>end3</i>	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YNL084c::kanMX4
BY4741 <i>end6</i>	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YCR009Yc::kanMX4
BY4741 <i>mnn2</i>	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR015c::kanMX4
BY4741 <i>mnn9</i>	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPL050c::kanMX4
BY4741 <i>mnn10</i>	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR245w::kanMX4
BY4741 <i>och1</i>	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YGL038c::kanMX4

3.2.2. Hranjive podloge

3.2.2.1. Podloga za uzgoj bakterija *E. coli* (LB)

Prema navedenoj tablici (Tablica 2) izvažu se potrebni sastojci za hranjivu podlogu te se dobro otope u deioniziranoj vodi. Potom je pripremljenu hranjivu podlogu potrebno sterilizirati u autoklavu 20 minuta pri uvjetima od 121°C i 1 atm. Ohlađenoj podlozi, nakon sterilizacije, filtracijom se dodaje 1 μ L antibiotika ampicilina (koncentracije 100 mg/mL) na 1mL podloge.

Tablica 2. Sastav hranjive podloge

LB podloga	baktotripton	Kvaščev ekstrakt	NaCl	Agar
kruta	10 g/L	5 g/L	5 g/L	15 g/L
tekuća	10 g/L	5 g/L	5 g/L	/

3.2.2.2. Podloga za uzgoj kvasaca *S. cerevisiae* (YNBP)

Sastojci navedeni u tablici 3., te smjesa različitih vitamina i aminokiselina („drop-out“), navedenih u Tablici 4., otopljeni su u deioniziranoj vodi te sterilizirani 20 minuta u autoklavu (121°C i 1 atm). Neposredno prije nacjepljivanja kvasaca, u podlogu se dodaje 50%-tna sterilna otopina glukoze u takvom omjeru da konačna koncentracija glukoze u podlozi iznosi 2%.

Tablica 3. Sastav hranjive podloge

YNB podloga	YNB-AA/AS	„drop-out“	Aminokiseline			agar	glukoza
			Uracil (Ura)	Triptofan (Trp)	Leucin (Leu)		
kruta	7 g/L	1,6 g/L	0,08 g/L	0,08 g/L	0,016 g/L	15 g/L	20 g/L
tekuća	7 g/L	1,6 g/L	0,08 g/L	0,08 g/L	0,016 g/L	/	/

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

3.2.2.3. Hranjiva podloga za indukciju *PHO5* promotora

Sastojci krutoga agregatnoga stanja, navedeni u Tablici 5, otope se u 480 mL deionizirane vode. Nakon otapanja krutih sastojaka, u podlogu se dodaje 1 mL 500 puta koncentrirane otopine elemenata u tragovima sastava navedenog u tablici 7. Prije sterilizacije podešava se pH podloge na vrijednost 5,5 dodatkom koncentrirane otopine HCl-a. Pod uvjetima od 121°C i 1 atm, otopina se sterilizira u autoklavu 20 minuta. Neposredno nakon sterilizacije u podlogu se dodaju otopine riboflavina i biotina (tablica 6. i 8.) koje je također potrebno sterilizirati filtracijom prije dodatka u sterilnu podlogu.

Tablica 5. Sastav Wickerhamove sintetske minimalne podloge (podloga bez fosfata)

P- podloga	KCl	Asparagin	MgSO ₄ x 2H ₂ O	NaCl	CaCl ₂ x 2H ₂ O	Na-citrat	„drop- out“	Elementi u tragovima
tekuća	1 g/L	2 g/L	0,5 g/L	0,1 g/L	0,1 g/L	5,882 g/L	2 g/L	1 mL

Tablica 6. Sastav otopine „riboflavina“.

Komponenta smjese	Koncentracija
riboflavin	0,05 g/L
p-aminobenzojeva kis	0,05 g/L
inozitol	0,5 g/L

Tablica 7. Sastav otopine „elementi u tragovima“.

Komponenta otopine	Koncentracija
borna kiselina	0,25 g/L
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
KI	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 8. Sastav otopine „biotina“.

Komponenta otopine	Koncentracija
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

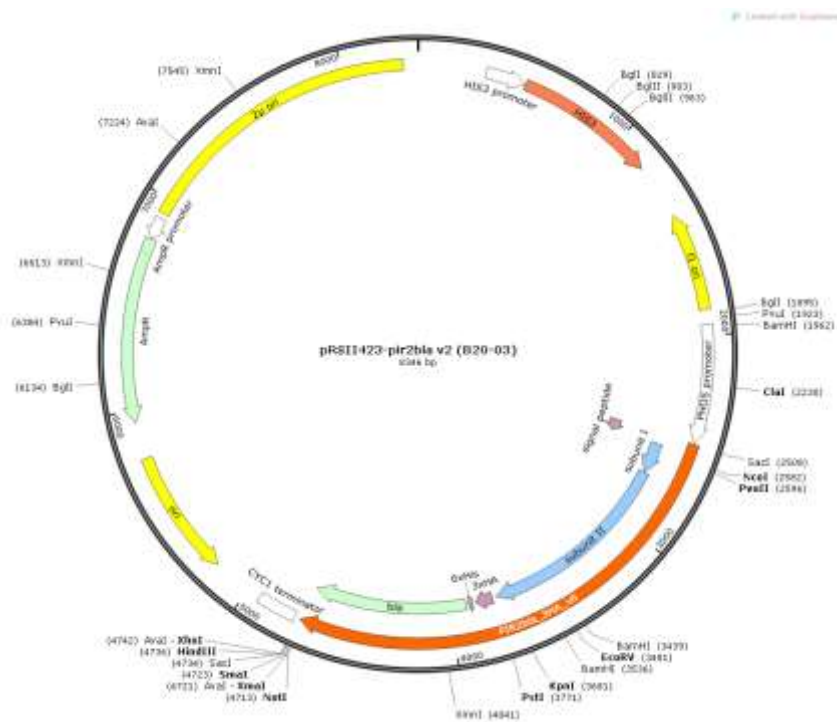
3.2.3. Plazmidi

3.2.3.1. Plazmid pRSII423 *PIR2*

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

3.2.3.2. Plazmid pRSII423 *PIR2bla*

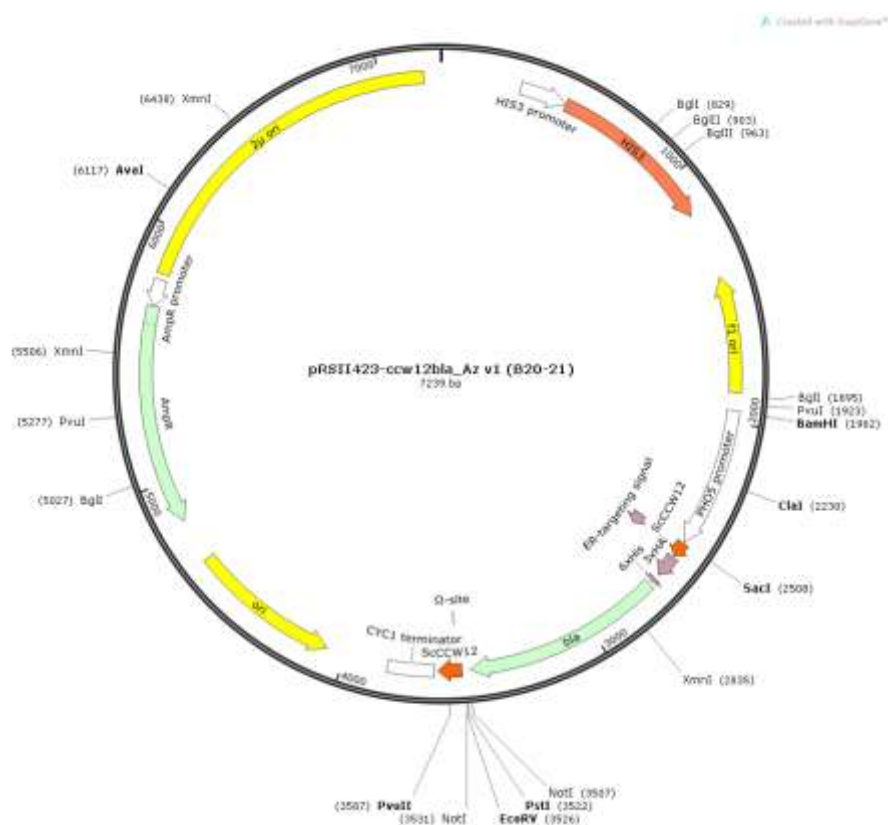
Plazmid pRSII423 *PIR2bla*, prikazan na Slici X, sadrži gen *bla* fuzioniran s genom *PIR2*. Ekspresijom gena *PIR2bla* nastaje rekombinantni protein, koji se kovalentno veže na staničnu stijenkicu svojim N-terminalnim dijelom. Plazmid je konstruiran PCR metodom te umnožen u stanicama *E. coli*, postupkom navedenim u poglavlju 3.3. Kako bi selekcija transformiranih stanica bila moguća, plazmid sadrži dva selektivna markera. Jedan selektivni marker potreban je za bakterijske stanice, dok je drugi potreban za kvaščeve stanice. Gen *bla*, koji kodira za intracelularni enzim β -laktamazu, selektivni je marker koji omogućuje rast bakterijskih stanica na podlogama s antibiotikom ampicilinom (Amp^R). S druge strane, selektivni je marker za stanice kvasca gen *HIS3*. Gen *HIS3* omogućuje stanicama kvasca rast na podlogama bez histidina, tj. na podlozi YNBP His⁻. *PHO5* je promotor gena koji inducira ekspresiju strukturnih gena pod njegovom kontrolom u podlogama bez fosfata.



Slika 4. Plazmid pRSII423 *PIR2bla*

3.2.3.3. Plazmid pRSII423 CCW12bla

U plazmidu pRSII423 *CCW12bla*, gen *bla* fuzioniran je s dijelom gena *CCW12* koji kodira za signalnu sekvencu. Signalna sekvencu koristi se kako bi se na C-terminalni kraj proteina vezalo GPI-sidro. Plazmid je konstruiran metodom PCR-a te umnožen u stanicama *E. coli*. Na kraju sekvence Ccw12 nalazi se „His-tag“, odnosno niz od šest histidina, te tzv. -HA oznaka, koju prepoznaju specifična antitijela. Gen *CCW12bla*, kao i gen *PIR2bla*, je pod kontrolom promotora PHO5, koji ekspresiju gena inducira samo u podlogama bez fosfata.



Slika 5. Plazmid pRSII423 *CCW12bla*

3.2.3.4. Plazmid pRSII423 CCW12

Plazmid pRSII423 *CCW12* sadrži samo kopiju dijela gena *CCW12* koja kodira za signalnu sekvencu proteina Ccw12.

3.3. Metode

3.3.1. Izolacija plazmida iz stanica *E. coli*

S trajnih kultura stanica *E. coli*, koje sadrže željene plazmide, kolonije su precijepljene na čvrste LB hranjive podloge s ampicilinom te su inkubirane preko noći na 37 °C. Porasle kolonije naciepljene su u 5 mL LB tekuće hranjive podloge s ampicilinom te su, ponovno preko noći, inkubirane na tresilici pri 37 °C i 180 rpm. Izolacija plazmida provedena je prema uputama proizvođača uz pomoć kita „NucleoSpin® Plasmid“ (Macherey-Nagel). Nakon izolacije plazmide je potrebno čuvati na -20 °C u zamrzivaču.

3.3.2. Određivanje koncentracije DNA

Uređaj koji je korišten za određivanje koncentracije plazmidne DNA je „NanoDrop One“ proizvođača ThermoFischer. Tijekom korištena uređaja slijeđene su upute navedenog proizvođača.

3.3.3. Restriksijska analiza izoliranih plazmida

Restriksijska je analiza provedena kako bi se provjerila ispravnost izoliranih plazmida. Enzim koji je korišten za restrikciju (restriksijski enzim BglI) cijepa plazmide na odgovarajućim mjestima. Restriksijska smjesa sadrži sterilnu vodu, odgovarajući pufer, enzim BglI te plazmid (tablica 9). Tako pripremljene smjese inkubirane su preko noći u termo bloku pri temperaturi od 37 °C . Nakon restrikcije dobiveni su različiti fragmenti DNA te je njihova veličina potom određena gel elektroforezom.

Tablica 9. Sastav reakcijskih smjesa

Reakcijska smjesa	sastav
pRSII423 <i>CCW12bla</i>	0,6 µl plazmida, 0,3 µL enzima, 1 µL pufera i 8,1 µL vode
pRSII423 <i>CCW12</i>	0,8 µL plazmida, 0,3 µL enzima, 1 µL pufera i 7,9 µL vode
pRSII423 <i>PIR2bla</i>	0,8 µL plazmida, 0,3 µL enzima, 1 µL pufera i 7,9 µL vode
pRSII423 <i>PIR2</i>	0,7 µL plazmida, 0,3 µL enzima, 1 µL pufera i 7,9 µL vode

3.3.4. Gel elektroforeza DNA

Za gel elektroforezu koristi se 1%-tni agarozni gel za čiju je pripremu potreban TAE pufer sljedećeg sastava: 40 mmol/L TRIS-HAc pH=8,0; 1 mmol/L EDTA. Kako bi se lakše pratila elektroforeza, u otopine plazmide i standarda, dodaje se komercijalno dostupna otopina boja (Gel Loading Dye, New England BioLabs). Potom su uzorci nanješeni u jažice gela te je provedena gel elektroforeza pri 90V u TAE puferu, koji je istog sastava kao i TAE pufer za pripremu gela. Vizualizacija vrpca DNA omogućena je uranjanjem gela u otopinu etidij-bromida koncentracije 100 mg/mL i vizualizacijom vrpca pod UV-lampom.

3.3.5. Transformacija stanica kvasca litij-acetatnom metodom

Postupak transformacije korišten u ovom eksperimentalnom radu započinje uzgojem stanica kvasca do logaritamske faze rasta u 10 mL odgovarajuće podloge, što je u ovom slučaju YNB podloga bez histidina. Uzgoj do logaritamske faze provjerava se mjerenjem OD₆₀₀. Smatra se da je kvasac postigao logaritamsku fazu rasta ukoliko mu OD₆₀₀ približno postiže vrijednost 2. Suspenzija stanica je zatim centrifugirana 5 minuta na 6000 okretaja u minuti, nakon čega je odbačen supernatant. Izdvojeni talog je resuspendiran u 10 mL sterilne destilirane vode te ponovno centrifugiran 5 min na 6000 okretaja u minuti. Nakon ponovnog odbacivanja supernatanta, talog je resuspendiran u 4 mL 0,1 M LiAc. U 4 sterilne eppendorf epruvete pipetirano je po 1 ml suspenzije stanica prethodno resuspendiranih u 0,1 M LiAc. Suspenzija je ponovno centrifugirana 30 sekundi na 8000 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja odvojen je supernatant te je na talog stanica sljedećim redoslijedom dodano: 240 µL 50%-tnog PEG-a, 36 µL 1 M LiAc, 25 µL jednolančane „carrier“ DNA i 50 µL smjese odgovarajućeg plazmida i sterilne vode. Posebno je bitno da se ove kemikalije dodaju navedenim redoslijedom kako bi se sloj po sloj kemikalija slagao iznad stanica uz što manje miješanje slojeva. Kao „carrier“ koristi se DNA sperme lososa (lax DNA) te je prije upotrebe, u zasebnu eppendorf epruvetu, potrebno izdvojiti volumen potreban za transformaciju uz mali suvišak te ga prokuhati 5 do 10 minuta u vrućoj kupelji. Prokuhavanje je nužno kako bi došlo do denaturacije DNA. Zbog sprječavanja renaturacije, nakon prokuhavanja, eppendorf epruvetu stavlja se u led ili hladni blok. Nakon pripreme transformacijske smjese prema prethodno navedenom postupku, smjesa je vortexirana približno 1 minutu, odnosno sve dok smjesa ne postane homogena. Nakon homogenizacije, smjesa je inkubirana u termo bloku 30 minuta na 30°C. Slijedi toplinski šok koji traje 20 minuta u termo bloku pri temperaturi od 42°C. Talog je od supernatanta odvojen centrifugiranjem suspenzije 15 sekundi na 8000

okretaja u minuti i pipetiranjem kompletnog supernatanta iznad taloga. Talog je resuspendiran u 1 mL sterilne vode te je 100 μ L tako pripremljene suspenzije nacijepljeno na krute selektivne hranjive podloge (YNB His⁻). Nacijepljene krute hranjive podloge inkubirane su u termostatu na 30 °C u vremenskom periodu koji je potreban za porast kolonija stanica.

3.3.6. Uzgoj kvasca uz indukciju PHO5 promotora

Promotor stanica kvasca PHO5, čija indukcija ovisi o unutarstaničnoj koncentraciji fosfata, zahtijeva da stanice kvasca budu uzgojene u hranjivim podlogama bez fosfata. Naime, PHO5 jak je promotor, za čiju je indukciju nužno da stanice potroše unutarstanične zalihe fosfata. Stanice kvasca uzgajane su u volumenu od 10 mL u hranjivoj podlozi s fosfatom (YNBP His⁻) do logaritamske faze rasta, odnosno dok im OD₆₀₀ ne postigne vrijednost koja približno iznosi 2. Nakon postignute logaritamske faze rasta, potrebno je izračunati koliki je volumen suspenzije stanica potrebno prebaciti u podlogu bez fosfata da stanice u njoj budu u koncentraciji 0,3 OD₆₀₀/mL. Stanice kvasca uzgajaju se u 25 mL podloge bez fosfata u Erlenmeyerovim tikvicama. Prije nacijepljivanja stanica kvasca iz podloge s fosfatom na podlogu bez fosfata, stanice je potrebno isprati dva puta u po 10 mL sterilne vode te se tako isprane stanice mogu nacijepiti na podlogu bez fosfata. Kako bi se potrošile sve unutarstanične zalihe fosfata, kvasci su u podlozi bez fosfata uzgajani preko noći na tresilici pri 30°C.

3.3.7. Određivanje aktivnosti β -laktamaze na površini stanica kvasca

Kao supstrat za enzim β -laktamazu korištena je 0,1 mM otopina nitrocefina. Nitrocefina je antibiotik koji apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 217 nm, no njegovom razgradnjom, koju katalizira enzim β -laktamaza, nastaje produkt koji apsorbira svjetlost valne duljine 486 nm. Apsorbancija se može mjeriti ili nitrocefina ili produkta reakcije koju katalizira β -laktamaza te se tako može pratiti tijekom reakcije. U ovom je radu spektrofotometrijski mjerena količina nastalog produkta pri 486 nm. U poglavlju 3.3.6. opisao je uzgoj stanica kvasca uz indukciju promotora PHO5. Tako uzgojene stanice su centrifugiranjem odvojene od podloge u kojoj se kasnije također mjeri aktivnost. Talog odvojen od podloge, odnosno stanice kvasca, potrebno je isprati u sterilnoj vodi, centrifugirati i odbaciti supernatant. Postupak ispiranja ponavlja se još jednom, no ovaj put u 100 mM K-fosfatnom puferu pH=7. Navedeni pufer korišten je tijekom cijelog postupka mjerenja aktivnosti β -laktamaze. Nakon drugog ispiranja, odbaci se

supernatant te se stanice resuspendiraju u istom puferu na koncentraciju 100 OD₆₀₀/ mL. Nakon toga je još jedanput izmjeren OD₆₀₀ u svrhu preciznosti kasnijeg izračuna. Mjerenje je provedeno s 5 µL suspenzije kvasca i 795 µL destilirane vode, odnosno mjerenje je provedeno sa 160 puta razrijeđenom suspenzijom kvasca. Potom je iz originalne suspenzije kvasca (cca. 100 OD/ml) pripremljeno prvo decimalno razrjeđenje tako da je na 10 µL originalne suspenzije kvasca dodano 90 µL pufera. Mjerenje je provedeno u 2 paralele u kojima je po 7,5 µL razrijeđene suspenzije stanica kvasca pomiješano sa 442,5 µL pufera. Potrebno je napomenuti da su neka mjerenja zahtijevala dodatno smanjenje količine kvasca, jer su rezultati mjerenja izlazili iz opsega linearnosti metode. U tim slučajevima je u reakcijsku smjesu dodano 3,75 µL razrijeđene suspenzije kvasca i 446,25 µL pufera. Slijepa proba pripremljena je sa 450 µL pufera. Prije samog početka mjerenja aktivnosti uključen je termo blok s miješanjem na 30°C, centrifuga podešena na 8000 okretaja u minuti te spektrofotometar podešen na mjerenje pri valnoj duljini od 482 nm. U termo bloku na 30°C eppendorf epruvete sa slijepom probom i s uzorcima za mjerenje su inkubirane 2 minute. Nakon 2 minute dodano je po 50 µL otopine supstrata te je reakcija trajala 5 minuta u termo bloku na 30°C uz intenzivno miješanje. Nakon 5 minuta reakcija je prekinuta centrifugiranjem na 8000 o/min 15 sekundi nakon čega je odvojen supernatant i provedeno spektrofotometrijsko mjerenje na 486 nm.

3.3.8. Određivanje aktivnosti β-laktamaze u hranjivim podlogama

Aktivnost u hranjivim podlogama, u kojima su uzgajane stanice kvasca za mjerenje aktivnosti (izdvojene i sačuvane prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.7.), mjerena je u dvije paralele, koje su pripremljene dodatkom 220 µL podloge i 230 µL K-fosfatnog pufera. Postupak mjerenja aktivnosti istovjetan je mjerenju aktivnosti na površini stanica kvasca, uz razliku što podloge nije potrebno centrifugirati nakon završetka reakcije, već im se direktno mjeri apsorbancija na spektrofotometru.

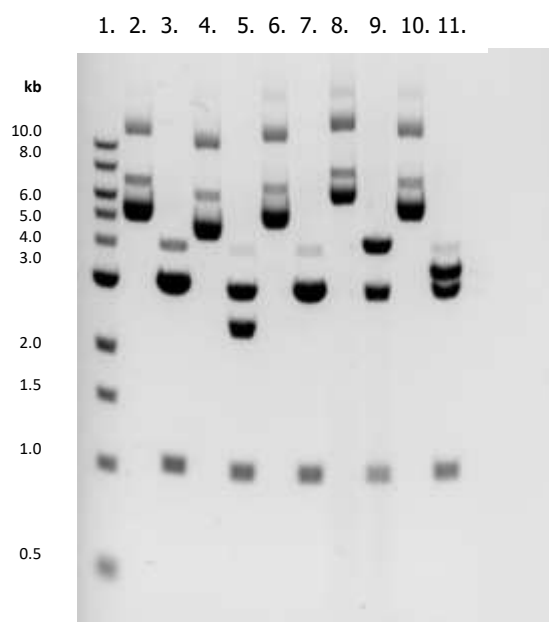
4. REZULTATI

4.1. Restriksijska analiza i gel elektroforeza plazmidne DNA

Restriksijska analiza, pomoću enzima BglI, provedena je u svrhu provjere ispravnosti izoliranih plazmida (pRSII423 *PIR2bla*, pRSII423 *PIR2*, pRSII423 Δ *bla*, pRSII423 *CCW12bla* i pRSII423 *CCW12*). Nakon restrikcije provedena je gel elektroforeza kako bi se utvrdila duljina dobivenih fragmenata plazmidne DNA. Ukoliko su plazmidi odgovarajuće sekvence, očekuje se duljina fragmenata prema dolje navedenoj tablici 10.

Tablica 10. Duljine fragmenata nakon restriksijske analize plazmidne DNA pomoću enzima BglI

Plazmidi	Duljina fragmenata
pRSII423 <i>PIR2bla</i>	4239 pb, 3041 pb i 1066 pb
pRSII423 <i>PIR2</i>	3429 pb, 3041 pb i 1066 pb.
pRSII423 Δ <i>bla</i>	3060 pb, 3041 pb i 1066 pb
pRSII423 <i>CCW12bla</i>	3132 pb, 3041 pb i 1066 pb
pRSII423 <i>CCW12</i>	3041 pb, 2184 pb i 1066 pb



Slika 6. Rezultati restrikcijske 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 Δbla , 7. plazmid pRSII423 Δbla 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.

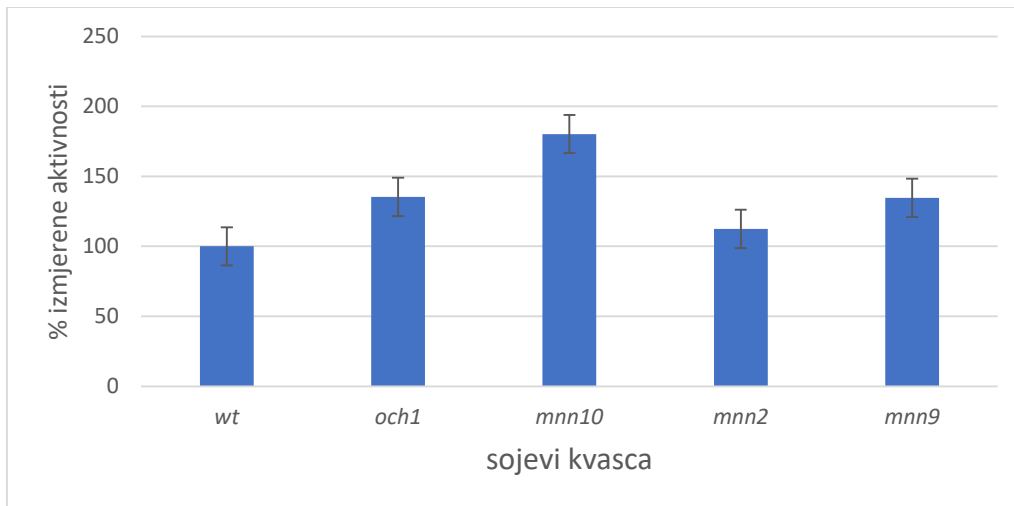
Iz slike 6. može se zaključiti da su dobiveni fragmenti plazmida odgovarajuće veličine te da su sekvence plazmida u skladu s očekivanima.

4.2. Transformacija stanica kvasaca

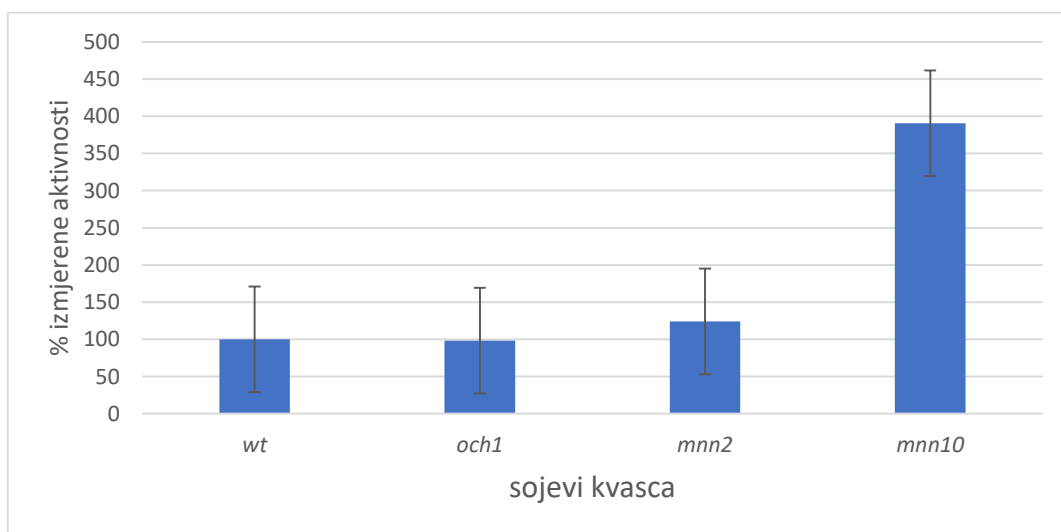
Prema poglavlju 3.3.5. provedena je transformacija stanica kvasaca. Na krutim hranjivim podlogama poraslo je više od deset transformanata. Sa svake krute hranjive podloge odabrano je po 8 kolonija, koje su nacijepljene na svježje krute selektivne hranjive podloge (YNB His⁻). Razlog precjepljivanja povećanje je broja stanica transformanta, koje se potom mogu koristiti za inokulaciju tekućih hranjivih podloga, potrebnih za daljnji eksperiment.

4.3. Mjerenje aktivnosti transformiranih stanica i odgovarajućih hranjivih podloga

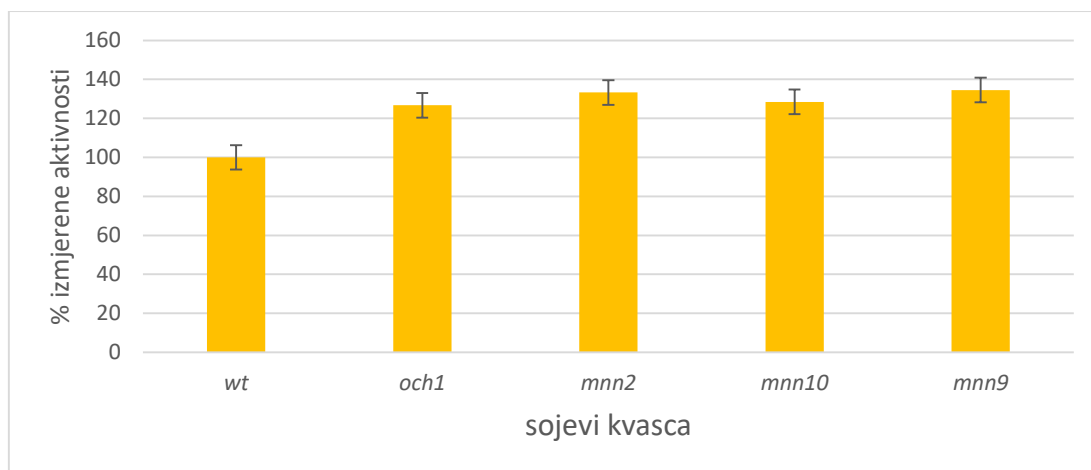
Prema poglavljima 3.3.7. i 3.3.8. provedeno je mjerenje aktivnosti β -laktamaze na površini stanica kvasca i u hranjivim podlogama bez fosfata u kojima su stanice uzgojene, a u kojima je došlo do indukcije PHO5 promotora i ekspresije gena odgovornih za sintezu rekombinantnog proteina. Na grafičkim prikazima koji slijede prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti. Naime, usporedno su prikazani rezultati mjerenja aktivnosti na površini transformiranih stanica i aktivnosti u hranjivim podlogama. Cilj je usporediti divlji tip kvasca i različite mutante s obzirom na postotak izmjerene aktivnosti na površini stanica, odnosno u hranjivim podlogama. Aktivnost izmjerena sa stanicama divljeg tipa uzeta je kao 100% moguće aktivnosti u svrhu lakše usporedbe s mutantima. Postotak aktivnosti u podlogama mutanata izračunat je u odnosu na detektiranu aktivnost izmjerenu u podlogama divljeg tipa kvasca.



Slika 7. Rezultati mjerenja aktivnosti Pir2bla rekombinantnog enzima eksprimiranog na površini stanica divljeg tipa i različitih mutanata u N-glikozilaciji

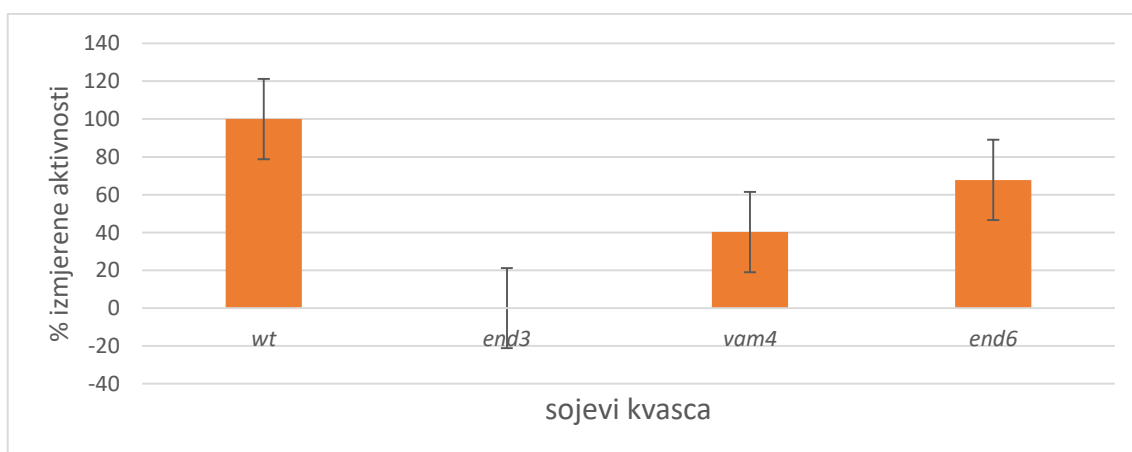


Slika 8. Rezultati mjerenja aktivnosti Pir2bla rekombinantnog enzima u hranjivim podlogama divljeg tipa i različitih mutanata u N-glikozilaciji

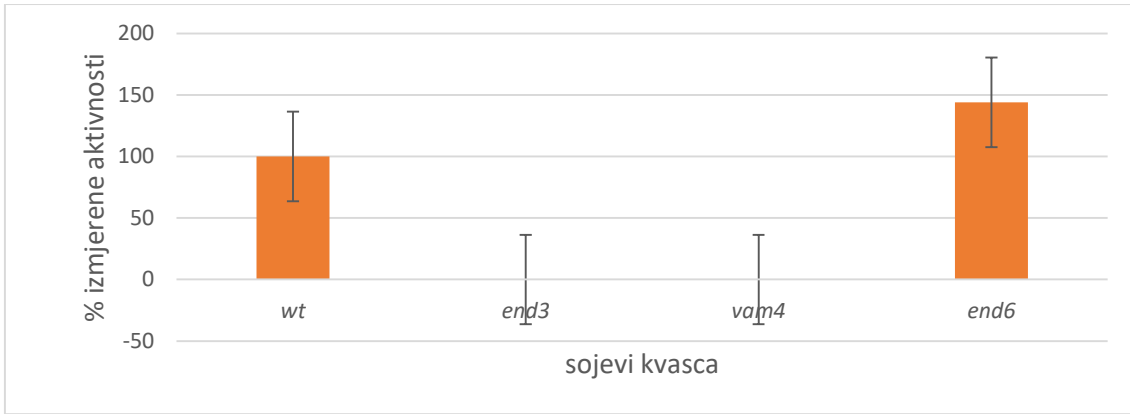


Slika 9. Rezultati mjerenja aktivnosti Ccw12bla rekombinantnog enzima eksprimiranog na površini stanica divljeg tipa i različitih mutanata u N-glikozilaciji

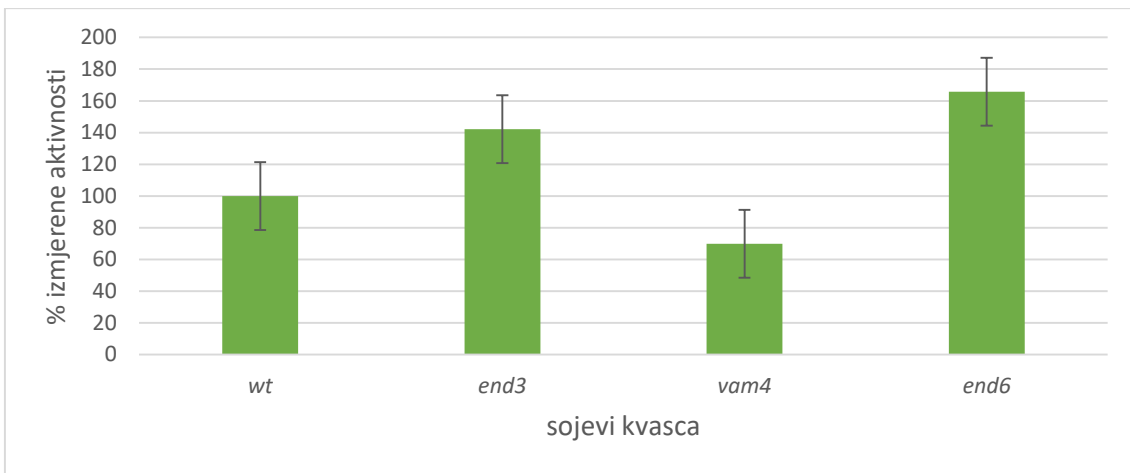
U podlogama u kojima su uzgajane stanice *mnn* mutanata i divljeg tipa koje eksprimiraju Ccw12bla rekombinantni enzim nije detektirana aktivnost.



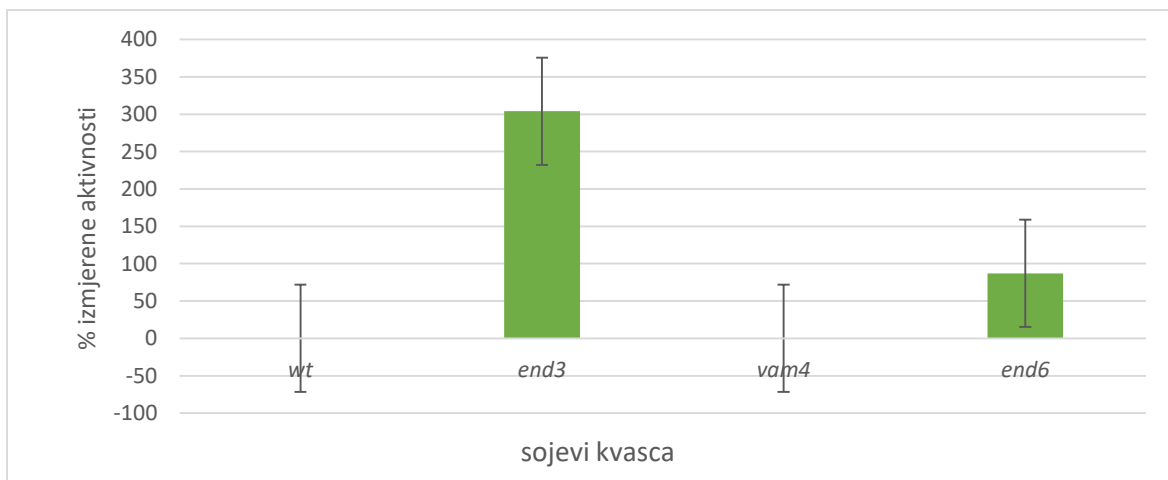
Slika 10. Rezultati mjerenja aktivnosti Pir2bla rekombinantnog enzima eksprimiranog na površini stanica divljeg tipa i različitih mutanata u endocitozi



Slika 11. Rezultati mjerenja aktivnosti Pir2bla rekombinantnog enzima u hranjivim podlogama divljeg tipa i različitih mutanata u endocitozi



Slika 12. Rezultati mjerenja aktivnosti Ccw12bla rekombinantnog enzima eksprimiranog na površini stanica divljeg tipa i različitih mutanata u endocitozi



Slika 13. Rezultati mjerenja aktivnosti Ccw12bla rekombinantnog enzima u hranjivim podlogama divljeg tipa i različitih mutanata u endocitozi

5.RASPRAVA

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* nepatogeni je jednostanični eukariotski organizam koji pripada carstvu *Fungi*. Za razliku od prokariota, kvasci posjeduju sekretorni put sličan višim eukariotima. To omogućuje posttranslacijske modifikacije i pravilno smatanje mnogih proteina sisavaca koje kao heterologne proteine ekspimiramo u stanici kvasca. Gen koji kodira za heterologni protein mora biti fuzioniran s genom za neki protein stanične stijenke ili s njegovim fragmentom. 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, kako bi se spriječilo otpuštanje proteina sa stijenke. Nedostatci kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kao domaćina u svrhu ekspresije rekombinantnih proteina, moguća su hiperglikozilacija rekombinantnih proteina i mali prinos na ovaj način imobiliziranih rekombinantnih proteina. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dinamična je struktura koja stanici kvasca osigurava mehaničku i osmotsku stabilnost te stanici daje čvrstoću i oblik (Eamus i sur., 1986). Proteini stijenke mogu biti povezani sa staničnom stijenkom kovalentnim ili nekovalentnim vezama. Skupini kovalentno vezanih proteina pripadaju proteini koji se na β -1,6-glukan vežu preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra. Primjer je takvog proteina Ccw12, korišten u ovom radu. Proteini iz PIR porodice direktno se kovalentno vežu na β -1,3-glukan preko glutaminskih ostataka koji se nalaze unutar njihovih ponavljajućih sekvenci (Ecker i sur., 2006). Uloge Pir i velikog broja GPI-proteina (npr. Ccw12) i dalje su u velikoj mjeri nepoznate i nedovoljno istražene (Mrša i sur.,1999).

Glikozilacija proteina najčešća je posttranslacijska modifikacija koja se zbiva u sekretornom putu kvasca. Glikozilacija je bitna u širokom spektru biokemijskih i staničnih procesa: smatanju proteina, održavanju staničnih struktura, interakciji receptora i liganda te staničnom signaliziranju, međusobnom prepoznavanju stanica te obrani (Helenius i Aebi,2004; Dube i Bertozzi,2005). Glikozilacija označava dodavanje ugljikohidratnih jedinica na specifične asparaginske ostatke (N-glikozilacija) ili na specifične treoninske ili serinske ostatke (O-glikozilacija) proteina. Najveći dio glikoziliranih proteina kvasca *Saccharomyces cerevisiae* čine manoproteini koji se nalaze u vanjskom sloju stanične stijenke. Glikozilacija je nužna kod heterolognih proteina kojima je određen stupanj glikozilacije potreban za točno smatanje i biološku aktivnost.

Endocitoza je mehanizam koji omogućuje da eukariotska stanica unosi u sebe vanstanični sadržaj te također može unositi molekule iz citoplazme u stanične organele i

odjeljke. Unos proteina u stanicu kvasca endocitozom započinje uvrtnanjem citoplazmatske membrane koja potom stvara vezikule. Te vezikule odvajaju se od membrane i pritom unose vanstanični sadržaj u stanicu u obliku endosoma. Rekombinantni sekretorni proteini se iz periplazmatskog prostora lako vraćaju endocitozom u stanicu prije nego što uspiju difundirati kroz staničnu stijenkku. Ovaj mehanizam znatno utječe na količinu rekombinantnih proteina koji se izlučuju iz stanice.

U ovom završnom radu ispitan je utjecaj N-glikozilacije i endocitoze na efikasnost ugradnje eksprimiranih heterolognih proteina u staničnu stijenkku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Kako bi se ispitaio utjecaj N-glikozilacije i endocitoze, koristili su se mutanti u određenim proteinima, odnosno enzimima, koji sudjeluju u navedenim procesima. Mutanti korišteni u dijelu rada posvećenom N-glikozilaciji su *och1*, *mnn2*, *mnn9* i *mnn10*. Proces manozilacije proteina počinje u prvom dijelu Golgijevog aparata, gdje protein Och1 (α -1,6-manoziltransferaza) na rastući glikanski lanac dodaje jednu molekulu manoze (Nakayama i sur., 1992; Nakanishi-Shindo i sur., 1993; Harris i Waters, 1999). Upravo je mutant u kojem je deletiran gen koji kodira za protein Och1 jedan od korištenih mutanata u ovom radu. Enzimi Mnn2 i Mnn5, koji posjeduju α -1,2-manoziltransferaznu aktivnost, omogućuju grananja α -1,6-manozne okosnice. Mutant *mnn2* sljedeći je u nizu korištenih mutanata. U daljnjem procesu glikozilacije se na prethodno ugrađenu molekulu manoze α -1,2-glikozidnom vezom veže još jedna molekula manoze koja sprječava daljnje produljivanje α -1,6-manoznog lanca. Proteini koji dodaju α -1,2-povezane molekule manoze nisu otkriveni, ali je pretpostavka da u tom procesu sudjeluju M-Pol I kompleks, te proteini Van1 i Mnn9 (Lewis i Ballou, 1991; Stolz i Munro 2002; Rodionov i sur. 2009). Stoga je i mutant *mnn9* ispitan u ovom radu. Posljednji mutant korišten u dijelu eksperimenata posvećenih N-glikozilaciji je *mnn10*. Enzimi Mnn10 i Mnn11 čine dio kompleksa manoziltransferaze te su odgovorni za većinu α -1,6-polimerazne aktivnosti. Objavljeno je da mutanti *mnn10* pokazuju povećanu sekreciju proteina u odnosu na divlji tip kvasca *S. cerevisiae* (Bartkevičiūtė i sur., 2004). U eksperimentima kojima se ispitivao utjecaj endocitoze na efikasnost ugradnje rekombinantnog proteina u stijenkku korištena su tri mutanta, *end3*, *vam4* i *end6*. Protein End3 potreban je za korak endocitoze u kojem se unose molekule iz okolnog medija u stanicu i za organizaciju citoskeleta (Benedetti i sur., 1994). Mutacije proteina End6 uzrokuju delokalizacije aktina te je takvim kvascima također blokiran korak endocitoze u kojem se unose molekule u stanicu (Munn i sur., 1995). Izolacijom mutanata *vam4* otkriveno je da, za razliku od divljeg tipa, stanica mutanta ima fragmentiranu vakuolu, odnosno vakuolu punu odjeljaka (Wada i sur., 1996). Prilikom izolacije gena *VAM4* otkriveno je da je gen identičan genu *YPT7*, koji spada u obitelj GTPaza (Wada i

sur., 1996). Protein Vam4/Ypt7 mala je GTPaza obitelji Rab/Ypt u *S. cerevisiae* te igra vitalnu ulogu u fuziji vakuola, prijenosu endosoma u Golgijev aparat te endocitozi.

Dva različita proteina stanične stijenke, Pir2 i Ccw12, fuzionirana su s enzimom β -laktamazom kako bi se ispitalo koja je metoda imobilizacije bolja za navedeni enzim. U eksperimentalnom radu, kao negativna kontrola, korišteni su plazmidi u kojima se nalaze nativni gen *PIR2*, odnosno dio gena *CCW12*. Negativna je kontrola potrebna kako bi se izmjerena aktivnost korigirala za pozadinsku aktivnost intracelularne β -laktamaze koja služi kao selektivni biljeg za bakterije. Nakon izolacije plazmida umnoženih u bakteriji, stanice kvasca divljeg tipa (BY 4741) i stanice mutanata *vam4*, *end3*, *end6*, *och1*, *mnn2*, *mnn9* i *mnn10* transformirane su LiAc metodom. Transformirane stanice potom su nacijeplyene na YNB podlogu bez histidina (selektivni biljeg za kvasce). Nakon transformacije, sljedeći je ključan korak indukcija promotora, budući da je ekspresija rekombinantnih proteina pod njegovom regulacijom. Indukcija PHO5 promotora opisana je u poglavlju 3.3.6. Nakon indukcije promotora, uzgojem u podlozi bez fosfata, stanice su, kako bi potrošile sve unutarstanične zalihe fosfata, uzgajane preko noći na tresilici pri 30°C. Kao supstrat za mjerenje enzimske aktivnosti korišten je antibiotik nitrocefina koji apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 217 nm, no njegovom razgradnjom, koju katalizira enzim β -laktamaza, nastaje produkt koji apsorbira svjetlost valne duljine 486 nm. Apsorbancija se može mjeriti ili nitrocefina ili produkta reakcije koju katalizira β -laktamaza te se tako može pratiti tijekom reakcije. U ovom se radu spektrofotometrijski mjerila količina nastalog produkta pri 486 nm.

Iz rezultata mjerenja aktivnosti prikazanih u poglavlju 4.3. može se izvesti sljedeći niz zaključaka. Na slici 7. prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti Pir2bla rekombinantnog enzima eksprimiranog na površini stanica divljeg tipa i različitih mutanata u N-glikozilaciji. Na slici je vidljivo da je aktivnost izmjerena na stanicama svih mutanata veća od aktivnosti divljeg tipa. U slučaju mutanta *mnn2*, to je gotovo neprimjetno veća aktivnost (12 %), dok mutanti *mnn9* i *och1* pokazuju približno 30% veću aktivnost. U skladu s očekivanjem, mutant *mnn10* pokazuje najveću aktivnost i ona je 80% veća od aktivnosti divljeg tipa kvasca. Kad se usporede navedeni podaci sa podacima na slici 8., gdje je prikazana aktivnost u pripadajućim hranjivim podlogama, može se zaključiti da je aktivnost u podlozi mutanta *och1* približno jednaka divljem tipu, u podlozi *mnn2* mutanta izmjerena je približno 30% veća aktivnost, no aktivnost izmjerena u podlozi mutanta *mnn10* gotovo je 4 puta veća od aktivnosti u podlogama divljeg tipa. Za razliku od mutanata u N-glikozilaciji, koji eksprimiraju Pir2bla enzim, mutanti koji eksprimiraju Ccw12bla enzim pokazuju ujednačenije rezultate. Na slici 9. prikazani su podaci o aktivnosti izmjerenoj na stanicama mutanata u N-glikozilaciji koji

ekspimiraju Ccw12bla enzim te se može zaključiti da svi mutanti korišteni u ovom eksperimentu pokazuju približno jednako veću aktivnost u odnosu na divlji tip (približno 20 do 40%). Velika je razlika što kod ovih mutanata nije detektirana aktivnost u podlogama (nije grafički prikazano u rezultatima). Mogući je razlog ugradnja čitave količine ekspimiranog rekombinantnog enzima u staničnu stijenkicu te njegovo čvrsto vezanje bez mogućnosti otpuštanja u podlogu. Na slikama 10. i 11. prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti Pir2bla konstrukta na površini stanica divljeg tipa i mutanata u endocitozi (slika 10.) te u pripadajućim hranjivim podlogama (slika 11.). Iz rezultata je odmah uočljivo da nije došlo ugradnje enzima u stijenkicu mutanta *end3*. Njegova aktivnost izostaje i u hranjivoj podlozi. Mogući je razlog pogrešno smatanje proteina prilikom prolaska kroz sekretorni put. Ukoliko je tako, stanica svojim mehanizmima takve proteine podvrgava degradaciji te je nemoguća njegova prisutnost u staničnoj stijenci ili podlozi. Rezultati dobiveni sa mutantom *end6* pokazuju da dolazi do ugradnje rekombinantnog enzima u stijenkicu jer je prisutna aktivnost enzima (slika 10.), no ona je gotovo 40% manja u odnosu na divlji tip kvasca. Pojačana je aktivnost rekombinantnog enzima u podlozi *end6* mutanta, što upućuje na pretpostavku da se rekombinantni protein nije čvrsto vezao za stanicu i dobar dio njegove količine je otpušten u podlogu. *vam4* mutant pokazuje 60% manju aktivnost u odnosu na divlji tip kvasca (slika 10.) te nije detektirana aktivnost u podlozi. Na slikama 11. i 12. prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti Ccw12bla konstrukta kod mutanata u endocitozi i divljem tipu kvasca. Zanimljivo je da divlji tip kvasca u ovom slučaju ne pokazuje aktivnost u podlozi. Ovakav rezultat mjerenja dobiven je i prilikom mjerenja s mutantima u N-glikozilaciji. Na osnovu toga se može zaključiti da se konstrukt Ccw12bla čvrsto veže za površinu stanice divljeg tipa. Aktivnost izmjerena na stanicama mutanata *end3* i *end6* je veća od aktivnosti divljeg tipa, za razliku od mutanta *vam4*, koji pokazuje približno 40% manju aktivnost (slika 11.). Iz slike 12. vidljivo je da je aktivnost u hranjivim podlogama *end* mutanata detektirana, no *end3* mutant pokazuje približno 3 puta veću aktivnost u podlozi od mutanta *end6*. U hranjivoj podlozi nakon uzgoja mutanta *vam4*, kao ni kod divljeg tipa kvasca, nije detektirana aktivnost. Na osnovu toga se može zaključiti da je kod mutanata *end3* i *end6* povećana sekrecija proteina, pri čemu se više proteina izluči u medij, nego što je to slučaj u stanicama divljeg tipa.

Na osnovu ovih rezultata ne mogu se izvući jednoznačni zaključci o utjecaju mutacija u N-glikozilaciji i endocitozi na efikasnost ugradnje rekombinantnih proteina u stijenkicu, s obzirom da su dobiveni različiti rezultati za Pir2bla i Ccw12bla konstrukt. Općenito, mutacije u N-glikozilaciji dovele su do povećanja aktivnosti izmjerene na površini stanica mutanata u oba slučaja, ali su efekti u pojedinim mutantima različite jakosti za Pir2bla i Ccw12bla konstrukt.

Mogući je uzrok povećanja aktivnosti smanjenje debljine i gustoće mananskog sloja u ovim mutantima, što omogućuje bolji pristup supstrata aktivnim mjestima imobiliziranog enzima. Rezultati dobiveni sa mutantima u endocitozi jako se razlikuju za Pir2bla i Ccw12bla konstrukt, pri čemu su ove mutacije negativno djelovale na ugradnju rekombinantnog konstrukta Pir2bla, dok je za Ccw12bla pokazan pozitivan efekt u stanicama *end3* i *end6* mutantima. Općenito, može se zaključiti da je za ovaj rekombinantni enzim bolja imobilizacija preko C-terminalnog dijela, s obzirom da je takav protein čvršće vezan na površinu stanica (stanice divljeg tipa ga uopće ne izlučuju u podlogu), a izmjerene aktivnosti veće su nego aktivnost dobivene sa Pir2bla konstruktom.

U daljnjem radu potrebno je provjeriti količinu rekombinantnog proteina ugrađenu u staničnu stijenku te količinu proteina izlučenu u podloge Western-blot analizom.

6.ZAKLJUČCI

Iz rezultata eksperimentalnog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Aktivnost rekombinantnog enzima Pir2bla detektirana je na stanicama i u podlogama divljeg tipa kvasca i svih mutanata korištenih u ovom radu, osim na stanicama mutanta *end3* i u podlogama mutanata *end3* i *vam4*.
2. Aktivnost rekombinantnog enzima Ccw12bla detektirana je na stanicama divljeg tipa kvasca te svih ispitivanih *mnn* mutanata i mutanata u endocitozi te u podlogama *end3* i *end6* mutanata.
3. Rekombinantni enzim Pir2bla pokazuje veću aktivnost u svim *mnn* mutantima nego u divljem tipu, najviše u mutantu *mnn10* (oko 80% veća aktivnost). U svim mutantima endocitoze pokazuje manju aktivnost u odnosu na divlji tip, dok u mutantu *end3* uopće ne pokazuje aktivnost.
4. Rekombinantni enzim Ccw12bla pokazuje veću aktivnost (20 do 40%) kod svih *mnn* i *end* mutanata, a manju aktivnost kod *vam4* mutanta, u odnosu na divlji tip kvasca.
5. Mutacije u N-glikozilaciji dovele su do povećanja aktivnosti izmjerene na površini stanica mutanata u oba slučaja, dok su mutacije u endocitozi negativno djelovale na ugradnju rekombinantnog konstrukta Pir2bla te je za Ccw12bla pokazan pozitivan efekt u stanicama *end3* i *end6* mutanata.
6. Za "surface display" sustav β -laktamaze bolja je imobilizacija preko C-terminalnog kraja rekombinantnog proteina.

7.LITERATURA

Abe H., Ohba M., Shimma Y., Jigami Y. (2004) Yeast cells harboring human β -1,3-fucosyltransferase at the cell surface engineered using Pir, a cell wall-anchored protein. *FEMS Yeast Res* **4**: 417–425.

Aimanada V., Clavaud C., Simenel C., Fontaine T., Delepierre M., Latgé J. (2009) Cell Wall β -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 13401 – 13412.

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

De Nobel J.G., Klis F.M., Priem J., Munnik T. (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 491 – 499.

Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrša V., Tanner W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3- glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* **281**: 11523–11529

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 β 1,3Gal α 1-. *Glycobiology* **8**: 1087–1095

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

Guillen E., Abeijon C., Hirschberg C. B. (1999) The genes for the Golgi apparatus N-acetylglucosaminyl-transferase and the UDP-N-acetylglucosamine transporter are contiguous in *Kluyveromyces lactis*. *J. Biol. Chem.* **274**: 6641–664

Harris, S. L., Waters, M. G. (1996) Localization of a yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport. *J. Cell Biol.* **132**: 985–998

Herscovics, A. (1999) Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 275–285

Jigami Y., Odani T. (1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 335–34533

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

Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **26**: 239 – 256.

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

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

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

Lesage G., Bussey H. (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 317 – 43.

Lozančić M., Hossain A.S., Mrša V., Teparić R. (2019) Surface Display-An Alternative to Classic Enzyme Immobilization. *Catalysts* **9**, 728

Lussier M., Sdicu A. M., Bussey H. (1999) The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 323–334

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

Mrša V., Seidl T., Gentsch M., Tanner W. (1997) Specific Labelling of Cell Wall Proteins by Biotinylation. Identification of Four Covalently Linked O-mannosylated Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1145 – 1154.

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.

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

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

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

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

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.

- 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
- Strahl-Bolsinger S., Gentzsch M., Tanner W. (1999) Protein O-mannosylation. Biochim. Biophys. Acta **1426**: 297–307
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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 mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Nikolina Orešković
Nikolina Orešković