

Konstrukcija i mjerenje aktivnosti rekombinantnog proteina Pir2bla_CJ izloženog na površini stanične stijenke

Matijević, Dominik

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:194395>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Dominik Matijević
0058215222**

**Konstrukcija i mjerenje aktivnosti rekombinantnog
proteina Pir2bla_CJ izloženog na površini stanične
stijenke**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija II

Mentor: doc. dr. sc. Bojan Žunar

Zagreb, 2022.

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

Konstrukcija i mjerenje aktivnosti rekombinantnog proteina Pir2bla_CJ izloženog na površini stanične stijenke

Dominik Matijević, 0058215222

Sažetak:

Jedna od alternativa klasičnim, unutarstaničnim, bioprocima su izvanstanični bioprocesi temeljeni na sojevima kvasca koji izlažu biotehnološki zanimljive enzime na svojoj staničnoj površini. Takvo vezivanje proteina može se, na primjer, postići fuzijom enzima od interesa s proteinom Pir2. Međutim, nije poznato gdje je unutar proteina Pir2 najbolje umetnuti enzim, a da se što bolje sačuva i sposobnost vezanja proteina Pir2 i aktivnost izloženog enzima. U ovom radu konstruiran je plazmid pRSII-pir2bla_CJ koji kodira za fuzijski protein Pir2bla_CJ, spoj proteina Pir2 i enzima β -laktamaze. Nadalje, izmjerena je aktivnost β -laktamaze izložene na staničnoj stijenci kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji eksprimira ovaj rekombinantni protein i uspoređena s aktivnosti četiri prethodno konstruirane inačice proteina Pir2bla. Iako protein Pir2bla_CJ kombinira odlike dvije prethodno razvijene vrlo efikasne inačice proteina Pir2bla, njegova ekspresija rezultira zanemarivom aktivnošću β -laktamaze, sugerirajući da pravila koja diktiraju efikasno vezanje proteina na staničnu stijenk, uz očuvanje biotehnološki zanimljive enzimске aktivnosti, nisu aditivna.

Ključne riječi: protein Pir2, β -laktamaza, izlaganje heterolognih proteina, stanična stijenka, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Rad sadrži: 31 stranicu, 13 slika, 7 tablica, 24 literaturna navoda, 0 priloga

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: doc. dr. sc. Bojan Žunar

Datum obrane: 29. lipnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate 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

Construction and activity determination of recombinant protein Pir2bla_CJ displayed on the yeast cell surface

Dominik Matijević, 0058215222

Abstract:

Some classical, intracellular bioprocesses could be replaced with extracellular ones, i.e. bioprocesses based on yeast strains displaying biotechnologically interesting enzymes on their cell surface. We can bind such enzymes to the cell wall, for example, by fusing them with Pir2 proteins. However, it remains unclear where in the Pir2 protein we should insert the enzyme to preserve both the enzymatic activity and the Pir2 binding ability. In this work, we constructed a plasmid encoding protein Pir2bla_CJ, a fusion of the protein Pir2 and the enzyme β -lactamase. Furthermore, we measured the β -lactamase activity of Pir2bla_CJ on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface and compared it to four previously constructed variations of Pir2bla protein. Although Pir2bla_CJ combined characteristics of two high-performing Pir2bla variations, its β -lactamase activity was negligible, suggesting that the rules allowing for the robust binding of proteins on the cell wall, and preservation of biotechnologically relevant enzymatic activity, are not additive.

Keywords: Pir2 protein, β -lactamase, yeast surface display, cell wall, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 31 pages, 13 figures, 7 tables, 24 references, 0 supplements

Original in: Croatian

The 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: Bojan Žunar, PhD, Assistant Professor

Thesis defended: June 29, 2022

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2	STANIČNA STIJENKA KVASCA <i>S. cerevisiae</i>	2
2.2.1	Polisaharidi stanične stijenke.....	2
2.2.2	Proteini stanične stijenke	4
2.3	PIR PROTEINI	5
2.4	UGRADNJA HETEROLOGNIH PROTEINA U STANIČNU STIJENKU KVASCA <i>S. cerevisiae</i>	6
2.5	β -LAKTAMAZA KAO PROTEIN IZVJESTITELJ	7
3	EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1	MATERIJALI	8
3.1.1	Kemikalije.....	8
3.1.2	Uređaji.....	9
3.1.3	Laboratorijski sojevi	9
3.1.4	Hranjive podloge.....	9
3.1.5	Plazmidi	12
3.2	METODE	15
3.2.1	Izolacija plazmida iz bakterijske kulture malog volumena.....	15
3.2.2	Lančana reakcija polimerazom (PCR)	15
3.2.3	Agarozna DNA gel elektroforeza	16
3.2.4	Izolacija DNA iz agaroznog gela	16
3.2.5	Ligacija PCR produkta.....	16
3.2.6	Transformacija bakterije <i>E. coli</i>	17
3.2.7	Restriksijska analiza izoliranih plazmida	17
3.2.8	Transformacija stanica kvasca <i>S. cerevisiae</i> pomoću litijevog acetata.....	17
3.2.9	Indukcija promotora <i>PHO5</i> u stanicama kvasca <i>S. cerevisiae</i>	18
3.2.10	Mjerenje aktivnosti β -laktamaze vezane na površinu kvašćeve stanične stijenke i izlučene u medij.....	18
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	19
4.1	Rezultati	19
4.1.1	Serijska plazmida pRSII423-pir2bla	19
4.1.2	Konstrukcija plazmida pRSII423-pir2bla_CJ.....	20
4.1.3	Konstrukcija sojeva kvasca <i>S. cerevisiae</i>	22

4.1.4	Mjerenje aktivnosti β -laktamaze vezane na površinu kvašćeve stanične stijenke i izlučene u medij.....	22
4.2	Rasprava	24
5	ZAKLJUČCI	28
6	POPIS LITERATURE.....	29

1 UVOD

U molekularnoj biologiji za proučavanje različitih biokemijskih puteva i procesa kao jedan od modelnih organizama koristi se kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Ovaj jednostanični eukariot odavno se koristi u proizvodnji prehrambenih namirnica kao što su kruh i vino, ali i finih kemikalija poput vitamina i hormona. Jedna od biotehnoški zanimljivih komponenta stanice kvasca jest njegova stanična stijenka. Iako je stanična stijenka kvasca još uvijek nedovoljno istražena, utvrđeno je da pokazuje visok potencijal za izlaganje rekombinantnih proteina na svoju površinu (engl. yeast surface display), čime se postiže njihova imobilizacija. Rekombinantni proteini nastaju fuzijom otvorenog okvira čitanja gena koji kodira za protein od interesa s otvorenim okvirom čitanja gena koji kodira za nativni protein stijenke, pri čemu je način fuzije izrazito važan jer definira ključne parametre kao što su efikasnost imobilizacije te aktivnost eksprimiranog heterolognog proteina.

U ovom radu, kao protein od interesa, korištena je β -laktamaza. Ovaj enzim fuzioniran je s proteinom Pir2, čime je konstruiran protein Pir2bla. Općenito, protein Pir2 pripada skupini Pir proteina koji se na staničnu stijenku vežu kovalentno, preko β -1,3-glukana. Prepoznatljivo svojstvo ovih proteina ponavljajuća je sekvenca dugačka 11 aminokiselina koja se pojavljuje u do 11 kopija (tzv. PIR ponavljanja), smještenih bliže N-terminalnom kraju proteina.

Ranijim je mjerenjima utvrđeno kako pojedine varijacije u smještaju β -laktamaze unutar proteina Pir2 pokazuju povećanu aktivnost u odnosu na ishodišnu inačicu proteina Pir2bla u kojoj je β -laktamaza smještena na C-terminalni kraj proteina Pir2. Cilj je ovog završnog rada konstruirati plazmid koji povezuje odlike dvaju Pir2bla konstrukata za koje je prethodno pokazano da se poboljšano izlažu na staničnu stijenku. Takav konstrukt eksprimiran je u kvascu *S. cerevisiae*, nakon čega je izmjerena aktivnost novokonstruiranog rekombinantnog proteina Pir2bla izloženog na površinu stanične stijenke.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 KVASAC *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jedan je od najvažnijih industrijskih mikroorganizama i danas ima širok spektar primjene u prehrambenoj i biotehnološkoj industriji. Radi se o jednostaničnom eukariotskom organizmu iz carstva *Fungi*, koji zbog svojih poželjnih svojstava služi kao modelni organizam u molekularnoj biologiji i genetičkom inženjerstvu. Neke od takvih karakteristika su mogućnost spolnog i nespolnog razmnožavanja, relativno kratko generacijsko vrijeme od oko 90 minuta pri 28-30 °C, nepatogenost te činjenica da se lako transformira stranom DNA. Također, jednostavan je za uzgoj i odlikuje ga rutinsko uvođenje genetičkih modifikacija. Važno je naglasiti da je upravo kvašćev genom prvi sekvencirani eukariotski genom (Goffeau i sur., 1996).

Primjena kvasca *S. cerevisiae* poznata je od davnina pa se kvasac isprva koristio samo u najosnovnijim fermentacijskim procesima za dobivanje alkoholnih pića kao što su pivo i vino te za dizanje tijesta u pekarstvu. Danas se kvasac *S. cerevisiae* koristi kao mikroorganizam producent za dobivanje različitih proteina, vitamina, hormona i određenih finih kemikalija (Parapouli i sur., 2020).

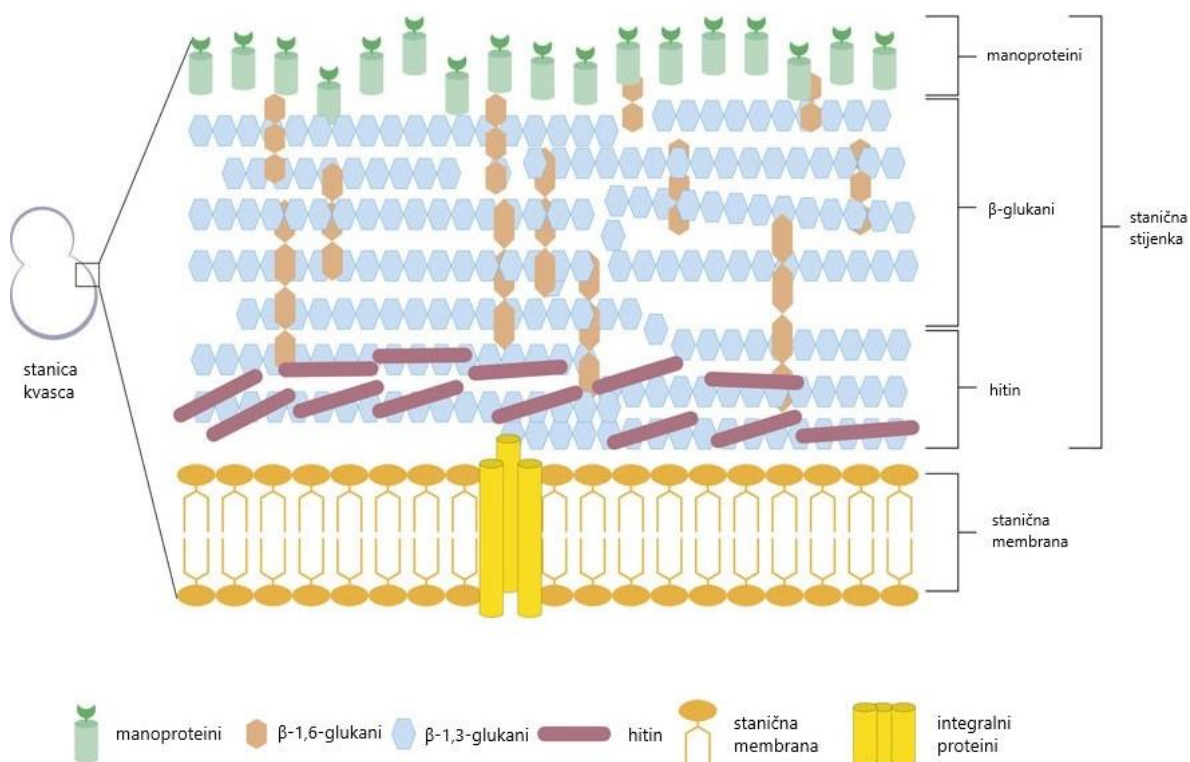
2.2 STANIČNA STIJENKA KVASCA *S. cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* ekstracelularna je struktura čija je glavna uloga da stanici osigura mehaničku čvrstoću i osmotsku stabilnost, odnosno da definira stalan oblik stanice. Stanična stijenka važna je i za međustaničnu komunikaciju, kao i za prepoznavanje okolnih molekula (Klis i sur., 2006). Unatoč tome što stanici daje čvrstoću, radi se o fleksibilnoj i elastičnoj strukturi koja je podložna fizikalnim i kemijskim promjenama (Teparić i Mrša, 2013).

2.2.1 Polisaharidi stanične stijenke

Stanična stijenka sastoji se od unutarnjeg i vanjskog sloja (Slika 1.). Unutarnji sloj stanične stijenke kvasca građen je od polisaharida odgovornih za mehaničku čvrstoću i osmotsku stabilnost stanice (Mrša i sur., 1997), uglavnom β -1,3-glukana i β -1,6-glukana, koji su građeni od glukoze, te hitina, koji je polimer N-acetilglukozamina. S druge strane, vanjski sloj stanične stijenke građen je od manoproteina, tj. proteina koji ograničavaju propusnost stijenke, i

omogućuje prethodno spomenutu međustaničnu komunikaciju. U ovom sloju prisutan je manan, polisaharid manoze koji izgrađuje ugljikohidratni dio manoproteina.



Slika 1. Shematski prikaz stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*. Preuzeto i prilagođeno iz Hyeast Biotech (2019).

Molekule β -1,3-glukana sastoje se od otprilike 1500 glukoznih jedinica međusobno povezanih u lance te se tijekom sinteze stanične stijenke sintetiziraju prve i služe kao glavna komponenta stanične stijenke. Nakon toga, na β -1,3-glukan vežu se β -1,6-glukan i hitin (Cabib i sur., 2001). Povezivanjem više lanaca β -1,3-glukana nastaje struktura uzvojnice koja omogućuje čvrstoću i stabilnost stanice. β -1,3-glukan se s β -1,6-glukanom i hitinom povezuje kovalentno, pri čemu je do 50 % hitina reducirajućim krajevima povezano β -1,4-glikozidnom vezom s nereducirajućim krajevima ovog glukana (Lesage i Bussey, 2006). Sintaza β -1,3-glukanskih lanaca odvija se u staničnoj membrani pomoću multienzimskog kompleksa β -1,3-glukan sintaze (Qadota i sur., 1996).

Molekule β -1,6-glukana izgrađene su od otprilike 130 glukoznih jedinica te stabiliziraju staničnu stijenku kvasca kovalentno se vežući na ostale komponente stijenke, čineći time staničnu stijenku cjelovitom i kohezivnom strukturom (Lipke i Ovalle, 1998). Iako je β -1,6-glukan nedovoljno istražen, topiv je u vodi te njegova količina u staničnoj stijenci ovisi o

ekspresiji proteina endoplazmatskog retikuluma, Golgijevog tijela i stanične membrane (Aimanianda i sur., 2009). Biosintetski put β -1,6-glukana još nije detaljno razjašnjen, ali je poznato da u njegovoj sintezi sudjeluje UDP-glukoza-ovisni enzim β -1,6-glukan sintaza (Orlean, 2012).

Hitin je polimer koji se sastoji od otprilike 190 jedinica N-acetilglukozamina međusobno povezanih β -1,4-glikozidnom vezom u reakciji koju katalizira enzim hitin sintaza. Od spomenutih polisaharida stanične stijenke, hitin je najmanje zastupljen te se sastoji od dva antiparalelna lanca povezana vodikovim vezama, pri čemu se njihovi nereducirajući krajevi vežu se za β -1,3-glukan i β -1,6-glukan. U jedinicama N-acetilglukozamina amidne grupe međusobno su povezane vodikovim vezama, što doprinosi stabilizaciji ovakve strukture, te u sinergiji s hidrofobnim jezgrama acetamidometilnih grupa onemogućavaju ulazak vode u stanicu (Lipke i Ovalle, 1998).

Manan je polimer manoze, a u staničnoj stijenci je prisutan u sklopu manoproteina, osnovne gradivne komponente vanjskog sloja stijenke kvasca. Manoproteini se međusobno razlikuju po vrsti glikozilacije pa tako glikozilirani mogu biti asparaginski pobočni ogranci (N-glikozilacija) ili serinski/treoninski pobočni ogranci (O-glikozilacija). Općenito, glikozilacija je neophodna za pravilan rast kvasca (Lesage i Bussey, 2006).

2.2.2 Proteini stanične stijenke

Vanjski sloj stanične stijenke kvasca uglavnom se sastoji od manoproteina koji se podvrgavaju N- ili O-glikozilaciji. Uloga ovih proteina još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, ali je utvrđeno da njihovim uklanjanjem ne dolazi do značajnijih odstupanja u stabilnosti i obliku stanice. Ovi proteini imaju ulogu u međustaničnoj komunikaciji te ograničavanju propusnosti stijenke, a neki imaju i katalitičku aktivnost (De Nobel i sur., 1990). Osim što se razlikuju po tipu glikozilacije kojoj su podvrgnuti, proteini stanične stijenke mogu se razlikovati i s obzirom na način vezanja na staničnu stijenkicu pa se tako na glukanske jedinice oni mogu vezati kovalentno i nekovalentno.

Proteini koji su sa staničnom stijenkicom povezani nekovalentno, odnosno Scw proteini (engl. *soluble cell wall proteins*), uglavnom su O-glikozilirani i čine većinu manoproteina u stijenci, čak do 80 % (Cappellaro i sur., 1998), te imaju ulogu u pregradnji β -glukana tijekom različitih životnih procesa kao što su pupanje, parenje i sporulacija (Teparić i sur., 2010). Ekstrakcija ovakvih proteina iz stijenke kvasca provodi se zagrijavanjem na 100 °C uz dodatak otopine SDS-a i β -merkaptetanola (Mrša i sur., 1997).

Proteini kovalentno povezani sa staničnom stijenkom, odnosno Ccw proteini (engl. covalently linked cell wall proteins), mogu se podijeliti u dvije podskupine. Prva podskupina odnosi se na GPI-proteine, tj. proteine koji se na β -1,6-glukan vežu preko glikozilfosfatidilinozitolnog sidra (GPI-sidra). Drugoj podskupini pripadaju Pir proteini koji se na β -1,3-glukan vežu preko glutaminskog pobočnog ogranka unutar njihovih karakterističnih ponavljajućih sekvenci (Ecker i sur., 2006). GPI-proteini iz stijenke se ekstrahiraju glukanzama, a Pir proteini tretiranjem stijenke s NaOH (Mrša i sur., 1997).

2.3 PIR PROTEINI

Skupina Pir proteina u stanicama kvasca broji pet predstavnika: Pir1p, Pir2p, Pir3p, Pir4p i Pir5p, koji su međusobno vrlo slični (Ecker i sur., 2006). Osnovna strukturna karakteristika ovih proteina ponavljajuća je sekvenca dugačka 11 aminokiselina koja se pojavljuje u do 11 kopija, bliže N-terminalnom dijelu proteina. Upravo po ovakvim PIR ponavljanjima, ovi su proteini i dobili ime (engl. protein with internal repeats, Mrša i sur., 1997). S druge strane, C-terminalni dio Pir proteina sadrži četiri cisteinska ostatka koji međusobno mogu tvoriti disulfidne mostove (Slika 2., Moukadiri i sur., 1999). Mehanizam nastajanja veze između Pir proteina i β -1,3-glukana još nije u potpunosti jasan, međutim pretpostavlja se da nastaje esterska veza između karboksilne grupe deaminiranog glutaminskog pobočnog ogranka Pir proteina i hidroksilne grupe glukanskih jedinica (Ecker i sur., 2006). Osim što se Pir proteini kovalentno vežu na staničnu stijenku, oni se često i izlučuju u okolni medij, odnosno u hranjivu podlogu u kojoj je kvasac uzgajan.

Fiziološka uloga Pir proteina do danas je nerazjašnjena. Uklanjanje pojedinačnih gena koji kodiraju za Pir proteine ne utječe na fenotip različitih mutanata kvasca *S. cerevisiae*, dok uklanjanje četiri Pir proteina (Pir1, Pir2, Pir3, Pir4) uzrokuje osmotsku nestabilnost i povećanu osjetljivost na inhibitore sinteze stanične stijenke (Mrša i sur., 1997).



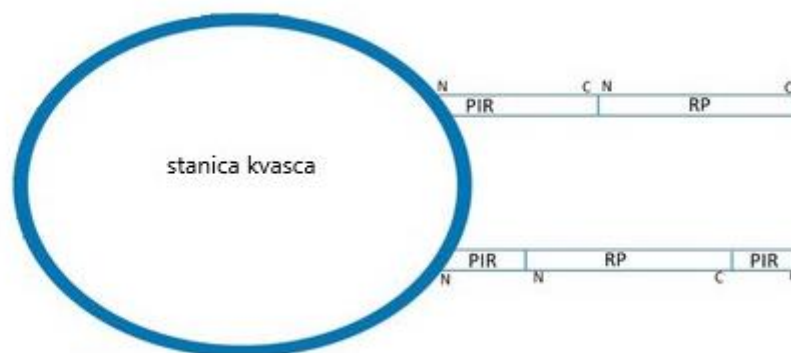
Slika 2. Shematski prikaz primarne strukture proteina Pir2. Oznake: SP – signalna sekvenca, SUB I – podjedinica I, IR – unutarnje ponavljanje Pir proteina, C – cisteinski aminokiselinski ostatak. Izvor: doc. dr. sc. Bojan Žunar

Geni koji kodiraju za Pir proteine korisni su za izlaganje željenih proteina na površinu stanične stijenke kvasca (engl. yeast surface display), metodom koja podrazumijeva fuziju otvorenog okvira čitanja gena koji kodira za ispitivani enzim (npr. β -laktamazu) s otvorenim okvirom čitanja gena koji kodira za nativni protein stijenke (npr. Pir protein). Pritom nastaje rekombinantni protein čija se aktivnost može razlikovati ovisno o primijenjenoj strategiji fuzije (Yang i sur., 2014). Kao i nativni proteini, rekombinantni proteini često se izlučuju u okolni medij (Moukadiri i Zueco, 2001).

2.4 UGRADNJA HETEROLOGNIH PROTEINA U STANIČNU STIJENKU KVASCA *S. cerevisiae*

Kvasac ima visok potencijal za izlaganje heterolognih proteina na svoju staničnu stijenku, čime se oni kovalentno imobiliziraju na površinu stanice. Protein od interesa može se imobilizirati na staničnu stijenku fuzijom preko samo N- ili C-terminalnog dijela nativnog proteina stijenke, ili pak umetanjem proteina od interesa usred nativnog proteina stijenke. Kako nativni protein stijenke sadrži signalnu sekvencu, ona novonastali fuzionirani protein upućuje u sekretorni put, na čijem kraju se on čvrsto veže na površinu stanice. Način fuzije proteina od interesa važan je jer diktira efikasnost imobilizacije te stabilnost i aktivnost heterolognih proteina (Teparić i sur., 2010).

Jedan od spomenutih načina imobilizacije je fuzija proteina od interesa s dijelovima Pir proteina. Kako se Pir proteini na stijenku vežu kovalentno preko N-terminalno smještenih karakterističnih ponavljajućih sekvenci, na Pir proteine ili njihove N-terminalne segmente vežemo proteine koje želimo imobilizirati bliže njihovom N-terminalnom kraju (Slika 3.). Zabilježeno je i da se Pir proteini na stijenku mogu kovalentno vezati i preko svojih očuvanih cisteinskih aminokiselinskih ostataka na C-terminalnom dijelu proteina (Castillo i sur., 2003). Konačno, protein od interesa može se umetnuti i usred proteina Pir2, ali ova metoda koristi se najrjeđe.



Slika 3. Shematski prikaz izlaganja rekombinantnog proteina na površinu stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* preko fuzije s Pir proteinom. Prikazana je imobilizacija rekombinantnog proteina na površinu stijenke fuzijom s C-terminalnim dijelom Pir proteina, odnosno umetanjem rekombinantnog proteina unutar Pir proteina. Oznake: RP – protein od interesa koji se ugrađuje u stijenku, N – N-terminalni kraj proteina, C – C-terminalni kraj proteina, PIR – Pir protein. Slika je preuzeta i prilagođena iz Lozančić i sur. (2019).

Neki od primjera uspješno imobiliziranih proteina preko Pir sekvenci su α -1,2-manoziltransfaza (Kre2) i α -1,3-manoziltransferaza (Mnn1), pomoću fuzije s C-terminalnim dijelom proteina Pir1 i Pir2 (Abe i sur, 2003), te ksilanaza A iz bakterije *Bacillus* sp. BP-7, koja je umetnuta usred proteina Pir4 (Andrés i sur., 2005).

2.5 β -LAKTAMAZA KAO PROTEIN IZVJESTITELJ

Ekspresija gena može se pratiti pomoću gena izvjestitelja, koji kodiraju za proteine čija se ekspresija u stanici može lako uočiti i kvantificirati. Jedan takav gen je gen *bla* iz bakterije *Escherichia coli*, čija ekspresija čini bakterijske stanice otpornima na antibiotik ampicilin. Ovaj gen kodira za β -laktamazu, enzim koji može opstati i zadržati aktivnost u različitim vrstama stanica. Drugim riječima, iako je evoluirao u bakterijskim stanicama, kao protein izvjestitelj može se koristiti i u kvašćevim stanicama. Enzim β -laktamaza cijepa β -laktamski prsten penicilina i strukturno sličnih molekula, npr. nitrocefina, kromogenog supstrata žute boje cijepanjem čijeg β -laktamskog prstena nastaje jasno uočljiv produkt crvene boje čija se koncentracija može kvantificirati mjerenjem apsorbancije na 482 nm. U odnosu na ostale gene izvjestitelje, β -laktamaza izrazito je jednostavna za uporabu, robusna, te se može koristiti za praćenje ekspresije gena u živim eukariotskim stanicama (Qureshi, 2007). Kao takva, β -laktamaza najčešće je aktivna i kada je fuzionirana s N- ili C-terminalnim krajem nekog heterolognog proteina.

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Kemikalije

- agaroz – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- agar – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- tripton, kvašćev ekstrakt, pepton – Biolife (Milano, Italija)
- ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- D(+) glukoza bezvodna – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- uracil, leucin, triptofan, asparagin – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- soli: natrijev klorid, kalijev hidrogenfosfat, kalijev dihidrogenfosfat, kalijev klorid, magnezijev sulfat heptahidrat, kalcijev klorid dihidrat, natrijev citrat – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- vitamini: riboflavin i biotin – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- restriksijski enzimi: NheI, SacI, BamHI – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- standard za DNA elektroforezu (1 kb DNA ladder) – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- etidijev bromid, polietilenglikol (PEG), litijev acetat – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- komplet kemikalija za izolaciju plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*: NucleoSpin Plasmid – Macherey Nagel (Düren, Njemačka)
- komplet kemikalija za uvođenje ciljanih mutacija u plazmidnu okosnicu: Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- kompetentne stanice bakterije *E. coli*, soj NEB-5 α – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)

3.1.2 Uređaji

- spektrofotometar NanoDrop One – ThermoFischer Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- uređaj za PCR MultiGene Mini (Labnet, New Jersey, SAD)
- transiluminator s plavim svjetlom Skylight Super-Blue (Vilber, Collégien, Francuska)
- spektrofotometar BioSpectrometer Basic – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- spektrofotometar Helios γ – ThermoElectric Corporation (West Chester, Philadelphia, SAD)

3.1.3 Laboratorijski sojevi

Za umnažanje i kloniranje plazmida korišten je soj NEB-5 α bakterije *E. coli*, genotipa *F⁻ ϕ 80lacZAM15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1*.

U eksperimentima mjerenja aktivnosti β -laktamaze korišteni su transformanti soja BY 4741 kvasca *S. cerevisiae*, genotipa *MATa leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*.

3.1.4 Hranjive podloge

Hranjive podloge pripremane su otapanjem sastojaka u deioniziranoj vodi, nakon čega su podvrgnute autoklaviranju u trajanju od 15 min, pri temperaturi od 121°C i nadtlaku od 1 bara.

Hranjive podloge za uzgoj bakterije *E. coli*

- Kruta LB podloga

Sastojci: tripton (10 g/L), kvašćev ekstrakt (5 g/L), NaCl (5 g/L) i agar (15 g/L). Prije nego što se podloga ohladila na sobnu temperaturu, u nju je dodana otopina ampicilina tako da je konačna koncentracija ampicilina u podlozi iznosila 100 μ g/mL.

- Tekuća 2xYT podloga

Sastojci: tripton (16 g/L), kvašćev ekstrakt (10 g/L) i NaCl (5 g/L). Netom prije naciepljivanja, u podlogu je dodana otopina ampicilina tako da je konačna koncentracija ampicilina u podlozi iznosila 100 μ g/mL.

Hranjive podloge za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*

- YPD podloga

Sastojci: kvašćev ekstrakt (10 g/L), pepton (20 g/L) i glukoza (20 g/L).

- YNB His⁻ podloga

Sastojci: dušična suspenzija za kvasce s dodanim amonijevim sulfatom (6,7 g/L), glukoza (20 g/L), smjesa „drop-out“ (1,6 g/L), uracil (0,08 g/L), triptofan (0,08 g/L) i leucin (0,08 g/L). Sastav smjese „drop-out“ prikazan je u Tablici 1. Kruta podloga sadržavala je i agar (20 g/L).

Tablica 1. Sastav smjese „drop-out“.

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 kis.	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

- YNBP⁺ His⁻ podloga

Sastojci: dušična suspenzija za kvasce s dodanim amonijevim sulfatom (6,67 g/L), smjesa „drop-out“ (1,6 g/L), kalijev dihidrogenfosfat (1 g/L), uracil (0,08 g/L), leucin (0,016 g/L) i triptofan (0,08 g/L). Netom prije naciepljivanja, u podlogu je dodana 50 %-tna otopina glukoze tako da je konačna koncentracija glukoze u podlozi iznosila 2 %.

- YNBP⁻ His⁻ (hranjiva podloga za indukciju promotora *PHO5*)

Sastojci navedeni u Tablici 2. otopljeni su u deioniziranoj vodi te je pH podloge podešen na vrijednost 5,5 dokapavanjem koncentrirane otopine klorovodične kiseline. Netom prije naciepljivanja, u podlogu su dodani: 250 puta koncentrirana otopina riboflavina (Tablica 3) i 1000 puta koncentrirana otopina biotina (Tablica 4.) te 50 %-tna otopina glukoze tako da je konačna koncentracija glukoze iznosila 2 %.

Tablica 2. Sastav YNBP⁻ His⁻ podloge.

KCl	1,0 g/L
Asparagin	2,0 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g/L
NaCl	0,1 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,1 g/L
Na-citrat	5,9 g/L
Smjesa „drop-out“	2,0 g/L
Uracil	0,080 g/L
Leucin	0,016 g/L
Triptofan	0,080 g/L
Elementi u tragovima (500 puta koncentrirani)*	1,00 mL

*Sastav 500 puta koncentrirane otopine „elementi u tragovima“ prikazan je u Tablici 5.

Tablica 3. Sastav 250 puta koncentrirane otopine riboflavina.

Riboflavin	0,05 g/L
p-aminobenzojeva kiselina	0,05 g/L
Inozitol	0,50 g/L

Tablica 4. Sastav 1000 puta koncentrirane otopine biotina.

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

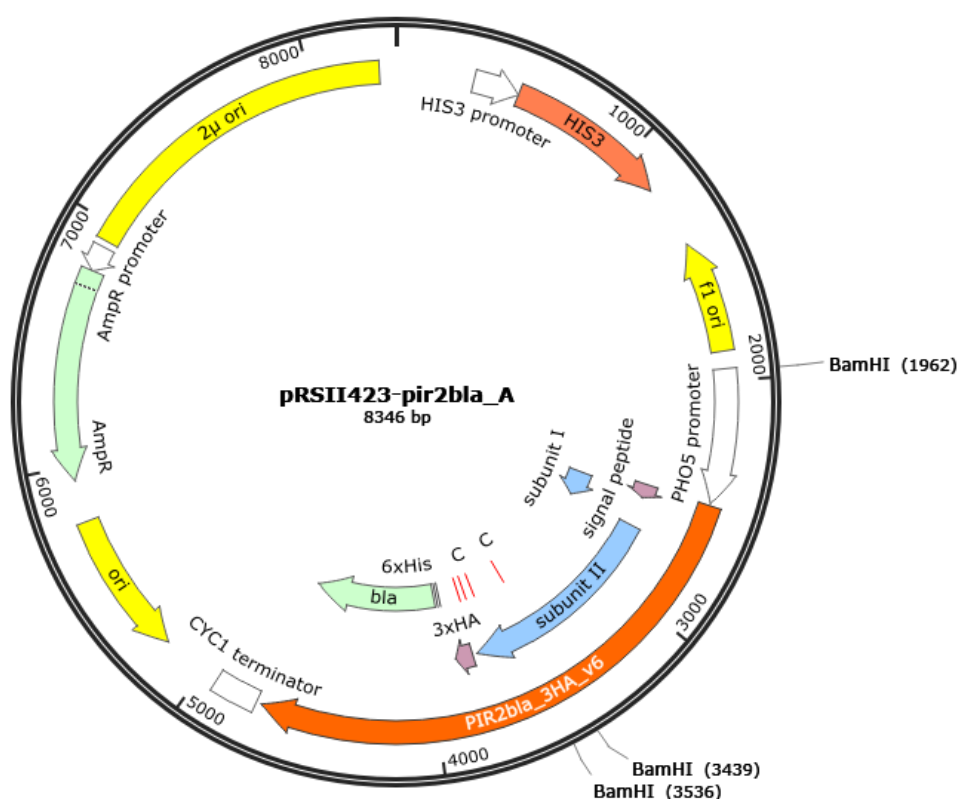
Tablica 5. Sastav 500 puta koncentrirane otopine „elementi u tragovima“.

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

3.1.5 Plazmidi

Plazmid pRSII423-pir2bla_A

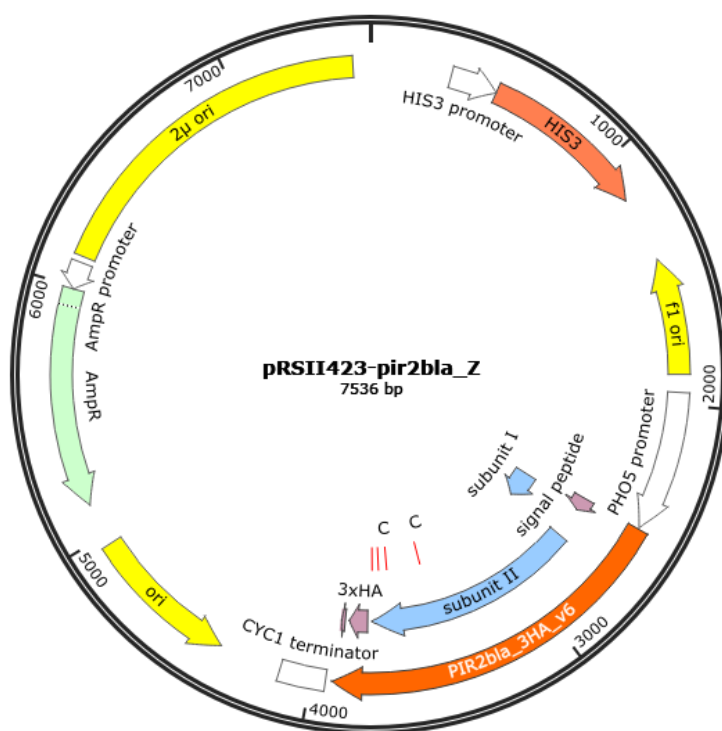
Plazmid pRSII423-pir2bla_A (Slika 4.) sadrži gen *pir2bla* konstruiran fuzijom otvorenog okvira čitanja gena *PIR2*, koji kodira za protein Pir2 kvasca *S. cerevisiae*, s otvorenim okvirom čitanja gena *bla*, koji kodira za β -laktamazu bakterije *E. coli*. Ekspresijom gena *pir2bla* nastaje rekombinantni protein koji se može kovalentno vezati na staničnu stijenku kvasca preko svojeg N-terminalnog dijela. Plazmid pRSII423-pir2bla_A služio je kao ishodišni plazmid za konstrukciju ostalih plazmida korištenih u ovom eksperimentalnom radu.



Slika 4. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla_A. Oznake: *HIS3* – selektivni biljeg za kvasac koji auksotrofima za histidin omogućava rast na podlozi bez histidina, *f1 ori* – ishodište replikacije filamentnog bakteriofaga M13, *PHO5* promotor – inducibilni kvašćev promotor, signal peptide – signalna sekvenca gena *PIR2*, subunit I – podjedinica I gena *PIR2*, subunit II – podjedinica II gena *PIR2*, *3xHA* – tri puta uzastopce ponovljena hemaglutininska proteinska oznaka, *6xHis* – polihistidinska proteinska oznaka, *bla* – otvoreni okvir čitanja koji kodira za β -laktamazu bakterije *E. coli*, *CYC1* – kvašćev terminator, *ori* – plazmidno ishodište replikacije bakterije *E. coli*, *AmpR* – selektivni biljeg za bakteriju *E. coli* koji omogućava rast na podlozi s ampicilinom, *2μ ori* – ishodište replikacije kvašćevog plazmida *2μ*.

Plazmid pRSII423-pir2bla_Z

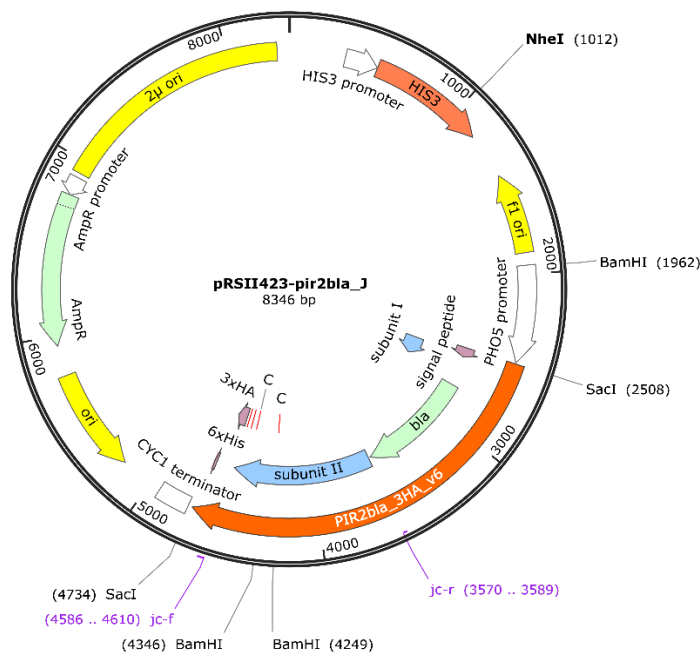
Za razliku od plazmida pRSII423-pir2bla_A, plazmid pRSII423-pir2bla_Z (Slika 5.) nosi inačicu gena *pir2bla* koja ne kodira za protein β -laktamazu. Kvašćeve stanice transformirane ovim plazmidom služile su kao negativna kontrola tijekom provođenja ovog eksperimentalnog rada.



Slika 5. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla_Z. Oznake su identične onima na Slici 4.

Plazmid pRSII423-pir2bla_J

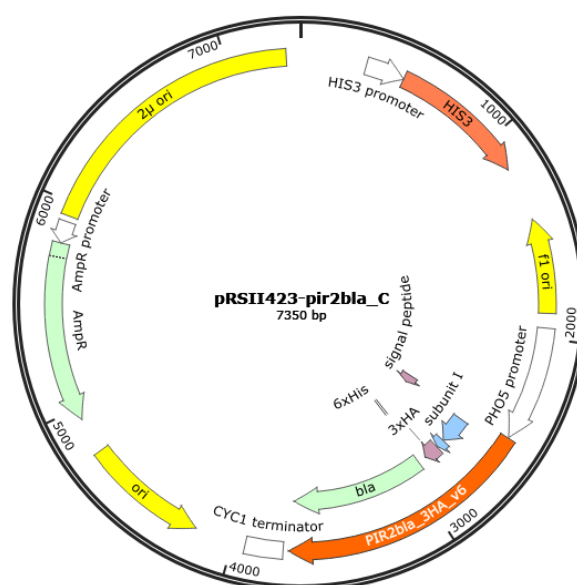
Plazmid pRSII423-pir2bla_J (Slika 6.) kodira za inačicu gena *pir2bla* u kojemu je sekvenca otvorenog okvira čitanja β -laktamaze umetnuta nakon početnih 270 pb otvorenog okvira čitanja gena *PIR2*, između prvog i drugog PIR ponavljanja. Prethodna mjerenja pokazala su da sojevi kvasca koji eksprimiraju ovu inačicu proteina imaju veću aktivnost β -laktamaze na svojoj staničnoj stijenci, tj. nose više aktivne β -laktamaze, u odnosu na sojeve koji nose plazmid pRSII423-pir2bla_A.



Slika 6. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla_J. Oznake su identične onima na Slici 4.

Plazmid pRSII423-pir2bla_C

Plazmid pRSII423-pir2bla_C (Slika 7.) kodira za inačicu gena *pir2bla* koja sadrži samo 270 pb N-terminalnog dijela otvorenog okvira čitanja gena *PIR2*, nakon koje slijedi sekvenca koja kodira za 3xHA proteinsku oznaku i β -laktamazu. Kao i za plazmid pRSII423-pir2bla_J, ranija mjerenja sugerirala su da stanice s ovim plazmidom sadrže više aktivne β -laktamaze na svojoj staničnoj stijenci u odnosu na stanice s plazmidom pRSII423-pir2bla_A.



Slika 7. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla_C. Oznake su identične onima na Slici 4.

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija plazmida iz bakterijske kulture malog volumena

Stanice bakterije *E. coli* koje sadrže željeni plazmid nacijepljene su iz trajne kulture pohranjene na temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na krutu LB hranjivu podlogu sa $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ampicilina. Nakon prekonoćne inkubacije na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, jedna porasla kolonija precijepljena je u 4 ml tekuće 2xYT hranjive podloge sa $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ampicilina. Tekuća kultura uzgajana je preko noći na $37\text{ }^{\circ}\text{C}/180$ okretaja u minuti (rpm) u mikroaerofilnim uvjetima. Iz porasle prekonoćne kulture izoliran je plazmid pomoću NucleoSpin Plasmid kompleta kemikalija prema uputama proizvođača (Macherey Nagel, Düren, Njemačka). Koncentracija izoliranog plazmida određena je pomoću uređaja NanoDrop One prema uputama proizvođača (ThermoFisher Scientific, Waltham, SAD).

3.2.2 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom provedena je visokotočnom termostabilnom polimerazom Q5 (New England Biolabs, Ipswich, SAD), prema uputama proizvođača. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je $50\text{ }\mu\text{L}$, a smjesa je sačinjena tako da je u $32,5\text{ }\mu\text{L}$ vode redom dodavano: $10\text{ }\mu\text{L}$ 5x koncentriranog pufera, $2,5\text{ }\mu\text{L}$ otopine početnice jc-f (cctagatacccatcacgatgttcccg, $10\text{ }\mu\text{M}$), $2,5\text{ }\mu\text{L}$ otopine početnice jc-r (gggcgcggccgcccagtggtt, $10\text{ }\mu\text{M}$) te $1\text{ }\mu\text{L}$ otopine dNTP-a (10 mM). Smjesa je dobro promiješana te je u nju naposljetku dodano $0,5\text{ }\mu\text{L}$ polimeraze Q5 i $1\text{ }\mu\text{L}$ DNA kalupa, tj. izolirane plazmidne DNA. U smjesu za kontrolnu reakciju umjesto $1\text{ }\mu\text{L}$ kalupa dodan je $1\text{ }\mu\text{L}$ vode. Sinteza se odvijala kroz 30 ciklusa u MultiGene Mini uređaju (Labnet, New Jersey, SAD) prema uvjetima navedenim u Tablici 6. Nakon završene reakcije, otopina je do daljnje analize čuvana na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tablica 6. Uvjeti odvijanja lančane reakcije polimerazom.

	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	Vrijeme trajanja
Početna denaturacija	98	30 s
Denaturacija	98	10 s
Sparivanje početnica	69	20 s
Sinteza	72	6 min
Završna sinteza	72	10 min

3.2.3 Agarozna DNA gel elektroforeza

Agarozna DNA gel elektroforeza provedena je u 0,7 % agaroznom gelu pripremljenom s 1x koncentriranim TAE puferom. Gel je pripremljen u nekoliko koraka. Najprije je 175 mg agaroze otopljeno u 25 mL 1x TAE pufera, zagrijavanjem pufera do vrenja. Dobivena smjesa ohlađena je do 50 °C te izlivena u odgovarajuće kadice za pripremu agaroznog gela. Nakon što se izliveni gel ohladio na sobnu temperaturu, zajedno je s kalupom prenesen u kadicu za elektroforezu i uronjen u 0,5x TAE pufer. Uzorci plazmida i standard pomiješani su sa 6x koncentriranim puferom za nanošenje uzoraka Gel Loading Dye. Elektroforeza je provedena na 140 V/45 min, nakon čega je gel inkubiran 20 min u otopini etidijeva bromida (1 µg/ml). Vrpce DNA vizualizirane su uređajem UviDoc HD6 (Uvitech, Cambridge, Velika Britanija).

3.2.4 Izolacija DNA iz agaroznog gela

U svrhu izolacije DNA iz agaroznog gela, uzorci DNA razdvojeni su na 0,7 %-tnom agaroznom gelu (1x TAE pufer, 60 ml). Nakon inkubacije u etidijevom bromidu, DNA je vizualizirana pomoću plavog svjetla (480 nm) na Skylight Super-Blue transiluminatoru (Vilber, Collégien, Francuska) te su željeni fragmenti iz gela izrezani špatulom. DNA je izolirana iz gela kompletom kemikalija NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača. Ukratko, najprije je otapanjem agaroznog gela u NTI-puferu omogućeno vezanje molekula DNA na kolonu dobivenu u navedenom kompletu kemikalija, nakon čega je kolona isprana NT3 puferom i osušena centrifugiranjem, a molekule DNA eluirane puferom za eluaciju. Po završetku protokola, izolirana DNA je kvantificirana spektrofotometrijski, uređajem NanoDrop One (ThermoFisher Scientific, Waltham, SAD).

3.2.5 Ligacija PCR produkta

Linearan PCR produkt cirkulariziran je pomoću kompleta kemikalija Q5 Site Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, SAD), prema uputama proizvođača. Reakcijska smjesa sastojala se od 1 µL PCR produkta izoliranog iz gela, 5 µL 1x KLD pufera, 1 µL KLD enzimske smjese i 3 µL sterilne deionizirane vode. Enzimska smjesa sadržavala je tri enzima: kinazu koja fosforilira 5'-kraj PCR produkta, ligazu koja uvodi fosfodietersku vezu odgovornu za cirkularizaciju PCR produkta te restrikcijski enzim DpnI koji cijepa samo *dam*⁺ metiliranu DNA, odnosno kalup korišten u reakciji PCR. Reakcijska smjesa dobro je promiješana i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi.

3.2.6 Transformacija bakterije *E. coli*

Soj NEB-5 α (New England Biolabs, Ipswich, SAD) transformiran je prema uputama proizvođača. Ukratko, 2 μ L KLD reakcijske smjese pomiješano je s 50 μ L kompetentnih stanica preokretanjem kivete za mikrocentrifugiranje. Smjesa je inkubirana na ledu 30 min, potom 30 s na 42 °C te ponovno na ledu 5 min. Zatim je u smjesu dodano 950 μ L otopine SOC zagrijane na sobnu temperaturu, te je transformacijska smjesa inkubirana na tresilici 37 °C/60 min. Nakon inkubacije, transformacijska smjesa nacijepljena je na LB ploče sa 100 μ g/ml ampicilina, prethodno zagrijane na 37 °C. Konačno, kako bi na njima porasle kolonije transformanata, nacijepljene ploče su preko noći inkubirane na 37 °C.

3.2.7 Restriksijska analiza izoliranih plazmida

Ukupni volumen restriksijske smjese iznosio je 10 μ L, a osim otopine enzima volumena 0,5 μ L, smjesa je sadržavala i 6,5 μ L sterilne deionizirane vode, 2 μ L otopine plazmidne DNA te 1 μ L odgovarajućeg deset puta koncentriranog pufera. Restriksijske smjese inkubirane su preko noći u termostatu na 37 °C.

3.2.8 Transformacija stanica kvasca *S. cerevisiae* pomoću litijevog acetata

Stanice kvasca uzgojene su u 15 mL tekuće YPD hranjive podloge do gustoće od približno 2 OD₆₀₀/mL. Suspenzija stanica centrifugirana je 4 min/3000 rpm, supernatant odbačen, a talog stanica resuspendiran u 20 mL sterilne deionizirane vode. Suspenzija je ponovno centrifugirana 4 min/3000 rpm te je talog resuspendiran u 500 μ L sterilne deionizirane vode (sdH₂O) i prebačen u kivete za mikrocentrifugiranje. Talog stanica zatim je dva puta ispran s po 1 mL sdH₂O i centrifugiran 30 s/13 000 rpm. Konačno, talog je resuspendiran u 700 μ L sdH₂O te je po 100 μ L takve suspenzije prebačeno u nove kivete za mikrocentrifugiranje. Kivete su centrifugirane 30 s/13000 rpm, iz njih je odbačen supernatant, a na zaostali talog redom je dodano: 60 μ L PEG-a (50 % w/v), 9 μ L LiAc (1 M) te 12,5 μ L nespecifičnog jednolančanog DNA-nosača. Naposljetku, u kivete za mikrocentrifugiranje dodano je 4 μ L odgovarajućeg plazmida i 4,5 μ L sterilne deionizirane vode. Nakon što su transformacijske smjese pripravljene na taj način, svaka je smjesa vorteksirana 40 s i potom je inkubirana na 42 °C/40 min u termobloku. Transformacijske smjese zatim su centrifugirane 30 s/13000 rpm, supernatant odbačen, a talog resuspendiran u 50 μ L sdH₂O. Dobivene suspenzije nacijepljene su na krute YNB His⁻ podloge koje su inkubirane na 30 °C do porasta kolonija kvasca.

3.2.9 Indukcija promotora *PHO5* u stanicama kvasca *S. cerevisiae*

Stanice kvasca uzgajane su u 5 mL tekuće kemijski definirane hranjive podloge bez histidina, koja sadrži fosfat (YNBP⁺ His⁻) do rane stacionarne faze na 30 °C/180 rpm. Iduće jutro, stanice su precijepljene u 15 mL iste YNBP⁺ His⁻ podloge i inkubirane 30 °C/180 rpm/5 h, da bi ušle u eksponencijalnu fazu rasta. Ove stanice isprane su s 15 mL sdH₂O (5 min/3000 rpm) i iskorištene za naciepljivanje 15 mL podloge bez histidina i fosfata (YNBP⁻ His⁻), pri čemu je u novonaciepljenoj podlozi postignuta konačna gustoća stanica od 0,3 OD₆₀₀/mL. Naciepljene kulture inkubirane su preko noći na 30 °C/180 rpm.

3.2.10 Mjerenje aktivnosti β-laktamaze vezane na površinu kvašćeve stanične stijenke i izlučene u medij

Aktivnost β-laktamaze mjerena je nitrocefinom (0,1 mM), žuto-obojenim spojem kojeg β-laktamaza cijepa u crveno-obojevu cefalosporinsku kiselinu. Svaki uzorak mjeran je u tri biološka replikata, a aktivnost svakog replikata mjerena je u po tri tehničke paralele. Stanice kvasca uzgojene su u podlozi YNBP⁻ His⁻ (poglavlje 3.2.9) i centrifugirane 5 min/3000 rpm. Supernatant je sačuvan i pohranjen u hladnjak za kasnije potrebe mjerenja aktivnosti β-laktamaze izlučene u hranjivu podlogu, dok je talog stanica prvo ispran u 15 mL sdH₂O, a zatim u 15 mL kalij-fosfatnog (K-fosfatnog) pufera, pH 7.

Isprani talog resuspendiran je u K-fosfatnom puferu do 100 OD₆₀₀/mL. Mjerenje je provedeno korištenjem 7,5 μL prvog decimalnog razrjeđenja stanica kvasca, pripremljenog u K-fosfatnom puferu, na koje je dodano 467,5 μL K-fosfatnog pufera. Slijepa proba sastojala se od 475 μL pufera. Zatim je suspenzija inkubirana na termobloku 30 °C/2 min/1200 rpm, nakon čega je u nju dodano 25 μL 0,1 mM nitrocefina. Enzimska reakcija odvijala se u termobloku na 30 °C/5 min/1200 rpm, nakon čega je reakcijska smjesa centrifugirana 30 s/8000 rpm. Zatim je 300 μL supernatanta prebačeno u kivete za mjerenje apsorbancije te je određena apsorbancija na 482 nm. Rezultati mjerenja obrađeni su u računalnom programu Microsoft Excel 2020.

Aktivnost β-laktamaze izlučene u medij mjerena je u reakcijskim smjesama u kojima je 255 μL K-fosfatnog pufera pomiješano s 220 μL podloge. Slijepa proba sadržavala je 255 μL pufera i 220 μL svježe hranjive podloge u kojoj nije uzgajan kvasac.

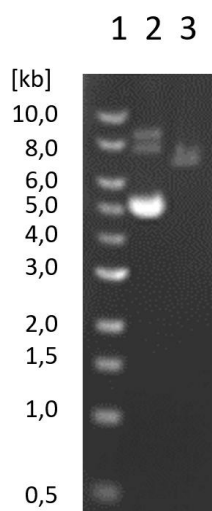
4.1.2 Konstrukcija plazmida pRSII423-pir2bla_CJ

U svrhu konstrukcije plazmida pRSII423-pir2bla_CJ, bakterija *E. coli* koja nosi plazmid pRSII423-pir2bla_J preuzeta je iz trajne kulture na -80 °C te uzgojena do stacionarne faze rasta u 3 ml 2xYT podloge s ampicilinom. Zatim je, pomoću kompleta kemikalija NucleoSpin Plasmid, iz poraslih bakterijskih stanica izoliran plazmid pRSII423-pir2bla_J (Slika 9., jažica 2). Okosnica ovog plazmida korištena je kao kalup tijekom lančane reakcije polimerazom (PCR) provedenom pomoću visokotočne polimeraze Q5 i početnica jc-f i jc-r. Ovom reakcijom umnožena je cijela plazmidna okosnica, osim dijela gena *pir2bla* koji kodira za 332 C-terminalna aminokiselinska ostatka proteina Pir2. Uspješnost reakcije provjerena je agaroznom DNA elektroforezom tako što je duljina umnoženog fragmenta DNA uspoređena s fragmentima sadržanima u standardu za DNA elektroforezu, nakon čega je umnoženi DNA fragment izoliran iz agaroznog gela kompletom kemikalija NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Slika 9., jažica 3) i cirkulariziran kompletom kemikalija Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit. Cirkulariziranim PCR produktom transformiran je soj NEB-5α bakterije *E. coli* te je transformacijska smjesa nacijepljena na LB ploče s ampicilinom, koje su zatim preko noći inkubirane na 37 °C.

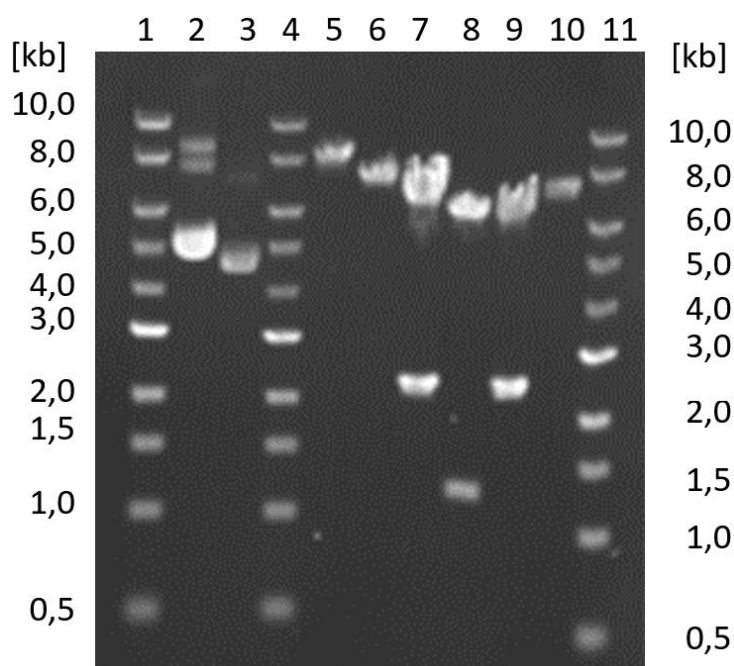
Kako bi se utvrdilo sadrži li koji od dobivenih transformanata plazmid pRSII423-pir2bla_CJ, pet transformanata uzgojeno je u 3 ml 2xYT podloge s ampicilinom te je kompletom kemikalija NucleoSpin Plasmid izolirana njihova plazmidna DNA, koja je potom analizirana restrikcijskom analizom te pocijepana s restrikcijskim enzimima NheI, SacI i BamHI. Rezultati agarozne DNA elektroforeze restrikcijskih smjesa vizualizirani su na agaroznom gelu i prikazani na Slici 10. Veličine dobivenih DNA fragmenata uspoređene su s očekivanima (Tablica 7, Slika 11.) te s fragmentima nastalim cijepanjem ishodnog plazmida pRSII423-pir2bla_J (Slika 6.).

Tablica 7. Duljine fragmenata pojedinih plazmida nakon cijepanja restrikcijskim enzimima.

Restrikcijski enzim	Duljine fragmenata	
	pRSII423-pir2bla_J	pRSII423-pir2bla_CJ
NheI	8466 pb	7350 pb
SacI	6120 pb + 2226 pb	1230 pb + 6120 pb
BamHI	5962 pb + 2287 pb + 97 pb	7350 pb

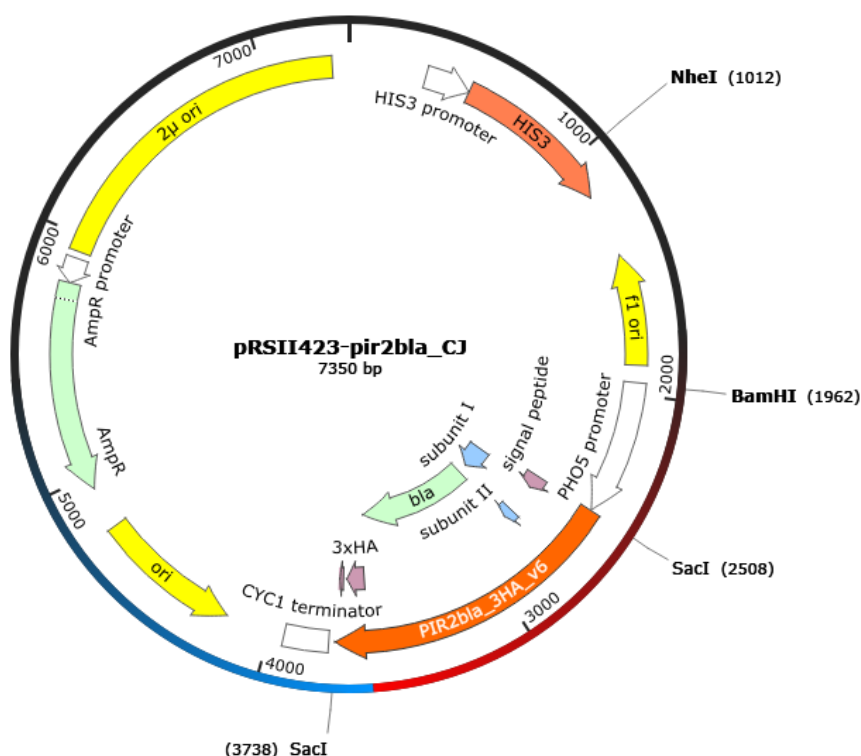


Slika 9. Agarozna DNA elektroforeza kalupa za reakciju PCR i PCR produkta izoliranog iz agaroznog gela. Uzorci: 1) standard za DNA elektroforezu NEB 1 kb Ladder, 2) nepocijepani plazmid pRSII423-pir2bla_J, 3) PCR produkt pročišćen iz gela.



Slika 10. Rezultati restrikcijske analize. Uzorci: 1) standard za DNA elektroforezu NEB 1 kb Ladder, 2) nepocijepani plazmid pRSII423-pir2bla_J, 3) nepocijepani plazmid pRSII423-pir2bla_CJ, 4) standard za DNA elektroforezu NEB 1 kb Ladder, 5) plazmid pRSII423-pir2bla_J pocijepan enzimom NheI, 6) plazmid pRSII423-pir2bla_CJ pocijepan enzimom NheI, 7) plazmid pRSII423-pir2bla_J pocijepan enzimom SacI, 8) plazmid pRSII423-pir2bla_CJ pocijepan enzimom SacI, 9) plazmid pRSII423-pir2bla_J pocijepan enzimom BamHI, 10) plazmid pRSII423-pir2bla_CJ pocijepan enzimom BamHI, 11) standard za DNA elektroforezu NEB 1 kb Ladder.

Novokonstruirani plazmid pRSII423-pir2bla-CJ prikazan je na Slici 11.



Slika 11. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla-CJ. Oznake su identične onima na Slici 4.

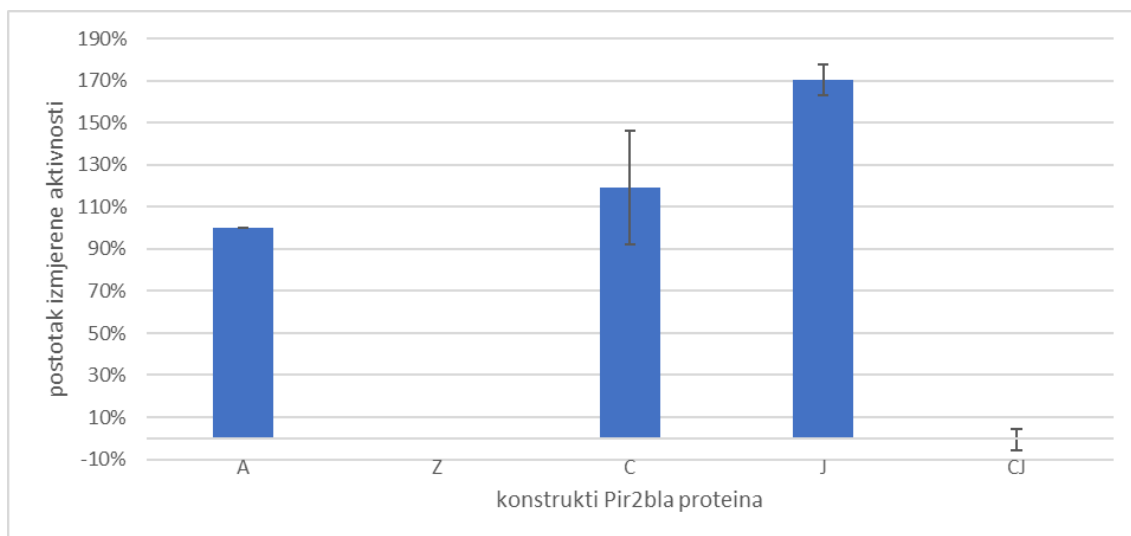
4.1.3 Konstrukcija sojeva kvasca *S. cerevisiae*

Kako bismo provjerili učinkovitost konstrukta pir2bla_CJ u izlaganju β -laktamaze na staničnu stijenku kvasca, konstruiranim plazmidom pRSII423-pir2bla_CJ transformirali smo soj BY 4741 kvasca *S. cerevisiae*. Transformanti kvasca selekcionirani su na krutim –his podlogama te zatim precijepljeni u tekuću podlogu hranjivu podlogu bez histidina, ali bogatu fosfatom (YNBP⁺ His⁻), nakon čega je inducirana ekspresija proteina Pir2bla_CJ (poglavlje 3.2.9).

4.1.4 Mjerenje aktivnosti β -laktamaze vezane na površinu kvašćeve stanične stijenke i izlučene u medij

Kako bismo izmjerili aktivnost proteina Pir2bla_CJ (poglavlje 3.2.10) i usporedili je s aktivnostima srodnih konstrukata, najprije smo inducirali njihovu ekspresiju uzgojem stanica kvasca u podlozi bez fosfata (poglavlje 3.2.9). Nakon indukcije i mjerenja aktivnosti, dobiveni rezultati normalizirani su u odnosu na izvorni protein Pir2bla_A, koji sadrži cjelokupnu sekvencu proteina Pir2, i kojemu je stoga dodijeljena aktivnost od 100 %. Kao negativna kontrola, korištena je inačica proteina Pir2bla_Z kojoj nedostaje β -laktamaza, i kojoj je stoga dodijeljena aktivnost od 0 %. Također su mjerene i aktivnosti sojeva koji eksprimiraju protein Pir2bla_C i Pir2bla_J, koji su u prethodnim eksperimentima pokazali aktivnost veću od soja

koji eksprimira proteina Pir2bla_A. Mjerene su aktivnosti na površini stanične stijenke (Slika 12.) te u mediju u kojemu su sojevi kvasaca uzgajani i u kojem zaostaju proteini koji se nisu uspjeli vezati na površinu stanične stijenke (Slika 13.).



Slika 12. Rezultati mjerenja aktivnosti različitih konstrukata Pir2bla proteina izloženih na površinu stijenke kvasca. Prikazane su srednje vrijednosti tri biološke paralele s pripadajućim standardnim devijacijama. A – Pir2bla_A, Z – Pir2bla_Z, C – Pir2bla_C, J – Pir2bla_J, CJ – Pir2bla_CJ.



Slika 13. Rezultati mjerenja aktivnosti različitih konstrukata Pir2bla proteina izlučenih u okolni medij. Prikazane su srednje vrijednosti tri biološke paralele s pripadajućim standardnim devijacijama. A – Pir2bla_A, Z – Pir2bla_Z, C – Pir2bla_C, J – Pir2bla_J, CJ – Pir2bla_CJ.

U usporedbi s izvornom inačicom Pir2bla_A, protein Pir2bla_C na površini stanice pokazuje aktivnost od oko 120 % (Slika 12.). S druge strane, aktivnost proteina Pir2bla_J iznosi oko 170

%, što je najveća od svih izmjerenih aktivnosti. Neočekivano, aktivnost novokonstruiranog proteina Pir2bla_CJ bila je zanemariva, oko 0 %. Također je primjetno da se aktivnosti proteina Pir2bla_C odlikuju velikom standardnom devijacijom. S druge strane, standardne devijacije aktivnosti proteina Pir2bla_J i Pir2bla_CJ su manje.

U usporedbi s izvornom inačicom Pir2bla_A, mjerenja aktivnosti inačica proteina Pir2bla u mediju (Slika 13.) pokazuju kako je soj koji eksprimira inačicu Pir2bla_C izlučio najviše Pir2bla proteina u medij, oko 1.8 puta više negoli soj koji eksprimira inačicu Pir2bla_A. S druge strane, soj koji eksprimira protein Pir2bla_J izlučuje manje Pir2bla proteina u medij, tek oko 13 % naspram soja Pir2bla_A. Zanimljivo, aktivnost proteina Pir2bla_CJ nije detektirana ni u mediju, što sugerira da odsustvo aktivnosti na staničnoj stijenci nije uzrokovano otežanim vezanjem proteina na stijenku. I u ovom slučaju, standardna devijacija je najveća za protein Pir2bla_C, dok su standardne devijacije za proteine Pir2bla_J i Pir2bla_CJ manje.

4.2 Rasprava

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, poznat kao pekarski odnosno prehrambeni kvasac, jednostanični je eukariotski organizam iz carstva *Fungi*. Odlikuju ga kratko generacijsko vrijeme, visoka učinkovitost fermentacije, jednostavan uzgoj i razna druga poželjna svojstva upravo zbog kojih služi kao modelni organizam za proučavanje različitih metaboličkih puteva eukariota. Iako se od davnina koristio u pekarstvu, vinarstvu i pivarstvu, spektar njegove primjene danas se naglo širi pa osim što se koristi za dobivanje visokovrijednih proizvoda poput vitamina i hormona, biotehnološki zanimljiv aspekt njegove primjene je i u proizvodnji heterolognih proteina. U posljednje vrijeme, posebna se pažnja posvećuje izlaganju takvih rekombinativnih proteina na površinu stanične stijenke (engl. yeast surface display), čime oni postaju imobilizirani na stanici. Metoda podrazumijeva fuziju otvorenog okvira čitanja gena koji kodira za protein od interesa s otvorenim okvirom čitanja gena koji kodira za nativni protein stijenke. Protein od interesa može se imobilizirati na staničnu stijenku fuzijom samo s N- ili C-terminalnim krajem nativnog proteina stijenke, kao i umetanjem proteina od interesa usred nativnog proteina stijenke. U ovom eksperimentalnom radu, kao protein od interesa korištena je β -laktamaza fuzionirana s proteinom Pir2. Protein Pir2 pripada skupini Pir proteina, proteina koji su s β -1,3-glukanskim jedinicama stanične stijenke povezani kovalentno, a čije je osnovno svojstvo ponavljajuća sekvenca dugačka 11 aminokiselina koja se pojavljuje u do 11 kopija i to bliže N-terminalnom dijelu proteina. Upravo iz ovog razloga je protein Pir2 i korišten u ovom radu, kako bi se na površinu stijenke imobilizirala β -

laktamaza, bliže svojem N-terminalnom kraju. Kao što su pokazala i ranija istraživanja, tako imobilizirana β -laktamaza i dalje je enzimski aktivna.

Kao osnovni plazmid, u ovom je radu korišten plazmid pRSII423-pir2bla_A u kojem je gen *pir2bla* konstruiran fuzijom, redom, otvorenog okvira čitanja gena *PIR2* s otvorenim okvirom čitanja gena *bla*. Ekspresijom novokonstruiranog gena nastaje rekombinantni protein Pir2bla_A koji se na staničnu stijenkku veže preko svojeg N-terminalnog dijela. Aktivnost tog proteina mjerena je nitrocefinom kojeg β -laktamaza cijepa u crveno-obojevu cefalosporinsku kiselinu.

S druge strane, kako postoje različite strategije fuzije proteina od interesa s nativnim proteinom stijenske, dakle β -laktamaze s proteinom Pir2, biotehnološki je bilo zanimljivo ispitati i aktivnost drugih inačica Pir2bla proteina, konstruiranih umetanjem β -laktamaze na različita mjesta unutar proteina Pir2. U tu svrhu prethodno su u Laboratoriju konstruirana dva plazmida: pRSII423-pir2bla_J i pRSII423-pir2bla_C. Plazmid pRSII423-pir2bla_J kodira za inačicu gena *pir2bla* u kojemu je otvoreni okvir čitanja gena *bla* umetnut nakon početnih 270 pb otvorenog okvira čitanja gena *PIR2*, između prvog i drugog PIR ponavljanja. Plazmid pRSII423-pir2bla_C kodira za inačicu gena *pir2bla* koja sadrži samo 270 pb N-terminalnog dijela otvorenog okvira čitanja gena *PIR2*, nakon koje slijedi sekvenca koja kodira za tri puta uzastopce ponovljenu hemaglutininsku proteinsku oznaku, polihistidinsku proteinsku oznaku i β -laktamazu. Prethodna ispitivanja provedena u Laboratoriju pokazala su da sojevi koji nose ove konstrukte izlažu na površinu stanice više funkcionalne β -laktamaze naspram sojeva s konstruktom Pir2bla_A (prof. dr. sc. Renata Teparić, usmeno priopćenje), što je u ovom radu i potvrđeno. U usporedbi s izvornim inačicom proteina Pir2bla_A, inačica Pir2bla_J u ovom je radu pokazala aktivnost od oko 170 %, dok je aktivnost inačice Pir2bla_C iznosila oko 120 %.

Pir proteini osim vezanja na površinu stijenske mogu se izlučiti i u okolni medij. Stoga je u ovom radu mjerena i aktivnost Pir2bla proteina izlučenih u hranjivu podlogu u kojoj su sojevi kvasca uzgajani. U usporedbi s izvornom inačicom proteina Pir2bla_A, kojoj je dodijeljena aktivnost od 100 %, aktivnost inačice Pir2bla_J u mediju je iznosila 13 %, a aktivnost inačice Pir2bla_C oko 180 %.

U ovom radu konstruiran je i plazmid pRSII423-pir2bla_CJ, koji kombinira odlike prethodna dva konstrukta, kako bi se ispitalo hoće li on omogućiti učinkovitiju imobilizaciju β -laktamaze na staničnu stijenkku. Takav konstrukt trebao bi sadržavati samo jedno PIR ponavljanje, kao

konstrukt Pir2bla_C, te otvoreni okvir čitanja gena *bla* odmah nakon tog PIR ponavljanja, kao konstrukt Pir2bla_J.

Plazmid pRSII423-pir2bla_CJ konstruiran je umnažanjem okosnice plazmida pRSII423-pir2bla_J metodom lančane reakcije polimerazom (PCR), čime je umnožena cijela plazmidna okosnica osim dijela gena *pir2bla* koji kodira za 332 C-terminalna aminokiselinska ostatka proteina Pir2. Nakon što je agaroznom DNA elektroforezom potvrđena uspješnost reakcije, umnoženi fragment DNA izoliran je iz gela i cirkulariziran te je njime transformirana bakterija *E. coli*, koja je potom uzgojena na LB podlozi s ampicilinom. Između poraslih transformanata izabran je jedan koji je nosio plazmid pRSII423-pir2bla_CJ, što je provjereno restriksijskom analizom, te je izoliranim plazmidom transformiran kvasac *S. cerevisiae*. Ponovnom usporedbom s ishodišnim proteinom Pir2bla_A, iz rezultata je vidljivo kako je aktivnost proteina Pir2bla_CJ na površini stanične stijenke bila zanemariva, kao što je i aktivnost tog proteina izlučenog u medij. Razlozi takvih rezultata mogu biti višestruki. Moguće je da se protein Pir2bla_CJ tijekom sekrecije nepravilno smota i razgradi prije negoli se izloži na površinu stijenke. Isto tako, moguće je da je Pir2bla_CJ izložen na površinu stijenke, ali da se tijekom sekrecije β -laktamaza inaktivirala. Kako aktivnost nije izmjerena niti u okolnom mediju, Pir2bla_CJ se ili uopće ne izlučuje van stanice zbog prethodno spomenute unutarstanične razgradnje ili se uspijeva izlučivati u okolni medij, ali je pritom β -laktamaza inaktivirana. U svakom slučaju, pristup koji kombinira odlike aktivnih inačica Pir2bla_J i Pir2bla_C nije se pokazao učinkovitim kao metoda za izlaganje β -laktamaze na površinu stijenke kvasca.

Na temelju svih dobivenih rezultata možemo zaključiti kako je za imobilizaciju β -laktamaze preko proteina Pir2 na površinu stijenke zasad najbolje koristiti protein Pir2bla_J. Kako je u takvom proteinu β -laktamaza umetnuta nakon prvog PIR ponavljanja, od njih ukupno 11 u otvorenom okviru čitanja gena *PIR2*, vjerojatno su na taj način smanjene steričke smetnje, te se on kao takav najbolje ugrađuje na površinu stanične stijenke.

Svrha ovog rada bila je dodatno poboljšati i omogućiti daljnji razvitak metode izlaganja proteina na površinu stanične stijenke (engl. yeast surface display) fuzijom β -laktamaze s proteinom Pir2. Iako primijenjenom metodom možemo potvrditi i kvantificirati β -laktamazu na površini stijenke, važno je primijetiti i ograničenja metode. Primjerice, na ovaj se način ne može kvantificirati inaktivirana β -laktamaza. Isto tako, ne možemo tvrditi da se protein zaista kovalentno vezao na staničnu stijenkku jer bi β -laktamaza pokazivala aktivnost i u slučaju

nekovalentnog vezanja. Interpretaciju sakupljenih rezultata mogli bismo proširiti imunoblotom, kojim bismo mogli odrediti ukupnu količinu proteina Pir2bla korištenjem anti-HA antitijela, kao i količinu proteina Pir2bla kovalentno vezanog na staničnu stijenku.

Konačno, u ovom je radu kao protein izvjestitelj korištena β -laktamaza. Kako bismo se uvjerali u širu primjenjivost dobivenih rezultata, u daljnjem je radu potrebno ispitati fuzije proteina Pir2 s drugim proteinima izvjestiteljima.

5 ZAKLJUČCI

Nakon provedbe ovog eksperimentalnog rada možemo zaključiti:

1. Plazmid pRSII423-pir2bla_CJ uspješno je konstruiran.
2. Kada su izlučeni na površinu stanične stijenke, rekombinantni proteini Pir2bla_J i Pir2bla_C pokazuju veću β -laktamsku aktivnost nego ishodišna inačica proteina Pir2bla_A, dok je aktivnost izlučenog novokonstruiranog proteina Pir2bla_CJ zanemariva.
3. Aktivnost proteina Pir2bla_CJ zanemariva je i u okolnom mediju, dok rekombinantni protein Pir2bla_C u usporedbi s izvornom inačicom Pir2bla_A pokazuje veću β -laktamsku aktivnost i u mediju.
4. Potencijalna unutarstanična razgradnja proteina Pir2bla_CJ, kao i kvantifikacija na površin ugrađene ali neaktivne β -laktamaze, mogla bi se provjeriti imunoblotom.

6 POPIS LITERATURE

- Abe H., Shimma Y., Jigami Y. (2003) In vitro oligosaccharide synthesis using intact yeast cells that display glycosyltransferases at the cell surface through cell wall–anchored protein Pir. *Glycobiology* **13**: 87-95. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg014>
- Aimanada V., Clavaud C., Simenel C., Fontaine T., Delepierre M., Latgé J. (2009) Cell Wall β - (1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bio Chem* **284**: 13401-13412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807667200>
- Andrés I., Gallardo O., Parascandola P., Javier Pastor F. I., Zueco J. (2005) Use of the cell wall protein Pir4 as a fusion partner for the expression of *Bacillus* sp. BP-7 xylanase A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **89**: 690-697. <https://doi.org/10.1002/bit.20375>
- Cabib E., Roh D.H., Schmidt M., Crotti L.B., Varma A. (2001) The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Bio Chem* **276**: 19 679-19 682. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000031200>
- Cappellaro C., Mrša V., Tanner W. (1998) New Potential Cell Wall Glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Involvement in Mating. *J Bacteriol* **180**: 5030-5037. <https://doi.org/10.1128/JB.180.19.5030-5037.1998>
- Castillo L., Martinez A. I., Garcerá A., Victoria Elorza M., Valentín E., Sentandreu R. (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1, 3-glucan. *Yeast* **20**: 973-983. <https://doi.org/10.1002/yea.1016>
- 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. <https://doi.org/10.1002/yea.320060606>
- Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrša V., Tanner W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to b-1,3- glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* **281**: 11523-11529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600314200>
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., i sur. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546-567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

- Hyeast Biotech (2019). Hiyeast - Your most reliable yeast extract supplier.
<https://www.hiyeast.com/> . Pristupljeno 15. svibnja 2022.
- Klis F.M., Boorsma A., De Groot P.W. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185-202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>
- Lesage G., Bussey H. (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 317-343. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00038-05>
- Lipke P.N., Ovalle R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**: 3735-3740. <https://doi.org/10.1128/JB.180.15.3735-3740.1998>
- Lozančić M., Hossain A.S., Mrša V., Teparić R. (2019) Surface Display-An Alternative to Classic Enzyme Immobilization. *Catalysts* **9**, 728. <https://doi.org/10.3390/catal9090728>
- Moukadiri I., Jaafar L., Zueco J. (1999) Identification of Two Mannoproteins Released from Cell Walls of a *Saccharomyces cerevisiae* mnn1 mnn9 Double Mutant by Reducing Agents. *J Bacteriol* **181**: 4741-4745. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4741-4745.1999>
- Moukadiri I., Zueco J. (2001) Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Res* **1**: 241-245.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2001.tb00040.x>
- Mrša V., Seidl T., Gentzsch 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. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19970930\)13:12<1145::AID-YEA163>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19970930)13:12<1145::AID-YEA163>3.0.CO;2-Y)
- Orlean, P. (2012) Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**: 775-818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A.S., Hatziloukas E (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol* **6**: 131. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Qadota H., Python C.P., Inoue S.B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., i sur. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**: 279 – 281. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.279>

Qureshi SA (2007) β -Lactamase: an ideal reporter system for monitoring gene expression in live eukaryotic cells. *BioTechniques* **42**: 91-96. <https://doi.org/10.2144/000112292>

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. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:680976>

Teparić R., Mrša V. (2013) Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. *Curr Genet* **59**: 171-185. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0403-0>

Yang N., Yu Z., Jia D., Xie Z., Zhang K., Xia Z., i sur. (2014) The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 2897-2905. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5538-5>

Izjava o izvornosti

Ja Dominik Matijević 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.

Dominik Matijević
Vlastoručni potpis