

Ekspresija rekombinantne ksiloza reduktaze na površini stanice kvasca *P. pastoris*

Spahija, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:198996>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Marta Spahija

7236/PT

**EKSPRESIJA REKOMBINANTNE KSILOZA REDUKTAZE NA
POVRŠINI STANICE KVASCA *P. pastoris***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija 2

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

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

Ekspresija rekombinantne ksiloza reduktaze na površini stanice kvasca *P. pastoris*

Marta Spahija, 0058208497

Sažetak: *Pichia pastoris* je metilotrofni kvasac koji se upotrebljava kao uspješni sistem za ekspresiju heterolognih proteina. U ovom radu, *P. pastoris* je upotrijebljena za ekspresiju heterolognog rekombinantnog proteina ksiloza reduktaze na površini stanične stijenke kvasca. Ksiloza reduktaza je enzim koji katalizira oksidoredukcijsku reakciju u kojoj se ksiloza reducira u ksilitol uz oksidacije NADPH u NADP⁺. Ksilitol je nisko kalorični šećerni alkohol koji se primjenjuje u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Biotehnološka proizvodnja ksilitola predstavlja ekonomičnije rješenje u odnosu na kemijsku proizvodnju u industriji. U ovom radu *P. pastoris* je transformirana plazmidom pBSY3ZCcw12XR koji nosi gen za rekombinantnu ksiloza reduktazu, ispitana je uspješnost ekspresije i ugradnje rekombinantnog enzima u staničnu stijenku kvasca, te aktivnost imobiliziranog enzima.

Ključne riječi: *Pichia pastoris*, ksiloza reduktaza, rekombinantni enzim

Rad sadrži: 33 stranice, 11 slika, 7 tablica, 37 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: 10. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Expression of the recombinant xylose reductase on the surface of the yeast cell
P. pastoris

Marta Spahija, 0058208497

Abstract: *Pichia pastoris* is a methylotrophic yeast that is used as a successful heterologous protein expression system. In this experiment, *P. pastoris* was used for the expression of the heterologous xylose reductase recombinant protein on the surface of the cell wall. Xylose reductase is an enzyme that catalyzes the oxidoreduction reaction in which xylose is reduced to xylitol along with the oxidation of NADPH to NADP⁺. Xylitol is a low calorie sugar alcohol that is used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Biotechnological production of xylitol represents a more economical solution compared to chemical production. In this experiment, *P. pastoris* was transformed with the plasmid pBSY3ZCcw12XR carrying the gene for recombinant xylose reductase. Along with examining the expression and immobilization of the recombinant enzyme, the activity of xylose reductase was also tested.

Keywords: *Pichia pastoris*, xylose reductase, recombinant enzyme

Thesis contains: 33 pages, 11 figures, 7 tables, 37 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph. D. Renata Teparić, Associate Professor

Defence date: September 10th 2018

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. <i>Pichia pastoris</i>	2
2.1.1. Ekspresija u <i>P. pastoris</i>	3
2.1.2. Strani proteini eksprimirani u <i>P. pastoris</i>	4
2.2. Ksiloza.....	5
2.3. Ksilitol	5
2.4. Metabolizam ksiloze.....	6
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Radni mikroorganizmi	8
3.1.2. Sastav hranjivih podloga za uzgoj mikroorganizama.....	8
3.1.3. Sastav otopina i pufera	8
3.1.4. Ostale kemikalije	10
3.1.5. Plazmid korišten u radu.....	11
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Uzgoj bakterije <i>E.coli</i>	12
3.2.2. Izolacija plazmida	12
3.2.3. Određivanje koncentracije DNA.....	13
3.2.4. DNA elektroforeza u agaroznom gelu.....	13
3.2.5. Restriksijska analiza plazmida	13
3.2.6. Protokol za pripremu kompetentnih stanica i transformaciju <i>P. pastoris</i>	14
3.2.7. PCR analiza transformanata <i>P. pastoris</i>	14
3.2.8. Uzgoj transformanata kvasca <i>P. pastoris</i>	17
3.2.9. Izolacija stanične stijenke kvasca uporabom BeadBug™ uređaja	18
3.2.10. Izolacija proteina stanične stijenke	18
3.2.11. Analiza proteina Western blot metodom.....	18

3.2.12. Mjerenje aktivnosti ksiloza reduktaze	19
4. REZULTATI	20
4.1 Restrikcijska analiza plazmida	20
4.2. Transformacija <i>P. pastoris</i>	21
4.3. PCR detekcija fragmenta unesenog transformacijom u genomsku DNA	22
4.4. Ekspresija i imobilizacija ksiloza reduktaze na staničnoj stijenci kvasca	23
4.5. Detekcija aktivnosti ksiloze reduktaze.....	24
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČCI.....	29
7. POPIS LITERATURE.....	30

1. UVOD

Pichia pastoris prvog je puta izolirana sa stabla kestena u Francuskoj. Alexandre Guilliermond je opisao ovaj kvasac kao *Zygosaccharomyces pastori*, koja spada u carstvo *Fungi*, koljeno *Ascomycetes* (Guilliermond, 1920). Herman Phaff je kasnije izolirao isti kvasac iz crnog hrasta i promijenio mu ime u *Pichia pastoris* (Phaff i sur., 1956), trenutno reklasificiran kao *Komagataella pastoris* (Naumov i sur., 2013). *P. pastoris* je metilotrofni kvasac te može koristiti metanol kao jedini izvor ugljika i energije (Phaff i sur., 1956) i koristi se diljem svijeta za produkciju proteina u svrhu istraživanja i primjene u medicini. Osnovni korak za razvitak učinkovitog sustava proizvodnje proteina i industrijskih enzima, koji se upotrebljavaju kao dodaci u hrani za životinje, bio je razvoj sistema indukcije ekspresije gena metanolom (Ciofalo i sur., 2006). Godine 1980. je za *P. pastoris* razvijen sistem za ekspresiju heterolognih proteina koristeći promotor *AOX1* (Cregg i sur., 1985). Godine 1990, započeto je s industrijskom proizvodnjom biljnog enzima pod nazivom hidroksinitril liaza (Hasslacher i sur., 1997). Ovaj ekspresijski sistem, koji je u početku patentiran od strane Phillips Petroleum, postao je dostupnim i za istraživačke svrhe (Kuberl i sur., 2011).

Cilj ovog rada bila je ekspresija i imobilizacija enzima ksiloze reduktaze u staničnoj stijenci kvasca *P. pastoris*. Kvasac je transformiran plazmidom, koji sadrži rekombinantni gen *GRE3CCW12*, koji kodira za enzim ksilozu reduktazu (*GRE3*) iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* fuzioniran sa dijelom gena koji kodira za Ccw12 protein stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*, a nosi signalnu sekvencu za upućivanje rekombinantnog proteina u sekretorni put i signal za dodavanje glikozilfosfatidilinozitol (GPI) sidra, preko kojeg se rekombinantni protein veže u staničnu stijenku. Ksiloza reduktaza katalizira reakciju redukcije ksiloze u ksilitol. Plazmid pBSY3ZCcw12XR umnožen je naprije u bakteriji *E. coli* te je zatim njime transformiran kvasac *P. pastoris*. Ugradnjom enzima na površinu stanične stijenke kvasca omogućila bi se *in vitro* proizvodnja ksilitola. S obzirom da je ksiloza šećer, koji je obilno prisutan u biomasi, postoji interes u unaprijeđenju njezinog metaboličkog iskorištenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Pichia pastoris*

Pichia pastoris upotrebljava se kao uspješni domaćin za ekspresiju heterolognih gena i koristi se kao domaćin za produkciju više od 600 vrsta rekombinantnih proteina (Lin Cereghino i Cregg, 2000; Macauley-Patrick i sur., 2005). Sustav ekspresije u *P. pastoris* je kombinacija između skupljih i kompliciranijih staničnih linija insekata ili sisavaca i jeftinijeg i fleksibilnijeg sustava *E. coli* (Koth C.M.M. i Payandeh J., 2009). Prednosti ovog sustava ekspresije su njegova jednostavnost, preferirani rast u uvjetima s kisikom, sposobnost provođenja eukariotskih post-translacijskih modifikacija, mogućnost postizanja velike gustoće stanica i prisutnost jakih i dobro reguliranih promotora koji upravljaju ekspresijom heterolognih gena (Cregg i sur., 2000; Lin Cereghino i Cregg, 2000). Prisutnost jakih promotora i visoka efikasnost produkcije proteina intracelularnim ili sekretornim putem omogućuju proizvodnju gramskih količina rekombinantnih proteina po litri kulture. Međutim, nije moguće sve proteine proizvesti u tako velikim količinama. Prinos proteina je češće niži, posebno ako se radi o kompleksnim proteinima kao što su hetero-oligomeri, proteini pričvršćeni uz membranu ili skloni proteolitičkoj degradaciji (Ahmad i sur., 2014). *P. pastoris* je jednostanični mikroorganizam s kojim je lako manipulirati, a s obzirom da je eukariot, ima i sposobnost provođenja većine posttranslacijskih modifikacija, kao što su proteolitičko procesiranje, formiranje disulfidnih veza i glikozilacija. Zbog toga se proteini koji prilikom proizvodnje u bakterijama završe u inkluzivnom tijelima u *P. pastoris* proizvode kao biološki aktivne molekule. Sistem za ekspresiju proteina započet je s promotorom, koji je izveden iz gena za alkohol oksidazu I (*AOX1*) (Cregg i sur., 2000; Hartner i sur., 2008). Dva su gena koja kodiraju za alkohol oksidazu u *P. pastoris*, to su *AOX1* i *AOX2*. *AOX1* je odgovoran za većinu aktivnosti alkohol oksidaze u stanici (Tschopp i sur., 1987; Ellis i sur., 1985; Cregg i sur., 1989). Glavni razlozi korištenja P_{AOX1} su njegova izvanredna jakost i dobra regulacija ugljikom što daje prednost u sprječavanju prekomjerne ekspresije proteina (Ahmad i sur., 2014). Glicerol, etanol i glukoza su izvori ugljika koje snažno potiskuju djelovanje P_{AOX1} , za razliku od metanola koji ga inducira (Hartner i sur., 2008). Međutim, rast na metanolu uzrokuje tehnološke poteškoće u industriji kao što su visoke potrebe za kisikom, velike količine otpuštene topline i korištenje sigurnosnih mjera zbog upotrebe zapaljivog supstrata (Mattanovich i sur., 2014). Zbog toga, razvijene su varijacije *AOX1* promotora koje se reguliraju nezavisno o metanolu (Shen i sur., 2016). Neki od alternativnih promotora su *GAP*, *FLD1*, *PEX8* i *YPT1* (Lin

Cereghino i Cregg, 2000). Također, kao alternativna metoda, metanol se može kombinirati s glicerolom ili sorbitolom te se na taj način smanjuje količina proizvedene topline i potreba za kisikom (Niu i sur., 2013; Berrios i sur. 2017).

2.1.1. Ekspresija u *P. pastoris*

Ekspresija stranog gena u *P. pastoris* zahtijeva tri glavna koraka: insercija gena u ekspresijski vektor, uvođenje tog vektora u genom kvasca i selekcija potencijalnih ekspresijskih sojeva za produkciju rekombinantnog proteina. Opći dijagram sastava ekspresijskog vektora za *P. pastoris* prikazan je na slici 1. (Lin Cereghino i Cregg, 2000). Svi ekspresijski vektori su dizajnirani kao *Escherichia coli* / *P. pastoris* "shuttle" vektori, koji sadrže ishodište replikacije za umnažanje plazmida u *E. coli* i markere koji omogućuju funkcionalnost u jednom ili oba organizama (Koutz i sur., 1989).



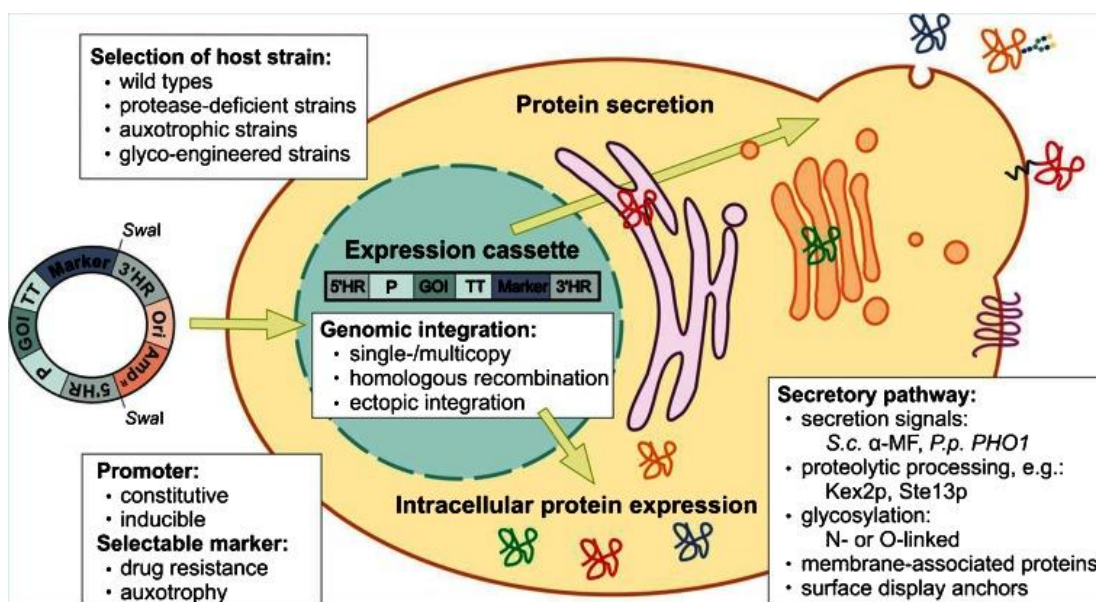
Slika 1. Opći dijagram sastava ekspresijskog vektora za *P. pastoris*

(<https://academic.oup.com/femsre/article/24/1/45/525926>, pristupljeno 21. srpnja 2018.)

Za ekspresiju heterolognih proteina u *P. pastoris* potrebno je odabrati prikladnu kombinaciju promotora i terminatora, markere za selekciju i vektorski sistem za intracelularnu ili sekretornu ekspresiju, uključujući ispravne sekrecijske signale. Ekspresija u *P. pastoris* upravljana je metanol inducirajućem promotorom *AOX1* ili konstitutivnim *GAP* promotorom. Pozitivni klonovi mogu se selekcionirati ovisno o njihovoj antibiotskoj rezistenciji, kao što je rezistencija na zeocin

ili genetikin sulfat. Isto tako, može se izvršiti selekcija ovisno o prototrofnosti za His ili Arg (Ahmad i sur., 2014).

Na slici 2. prikazan je ekspresijski plazmid koji sadrži željeni gen (GOI; gene of interest). Ovaj plazmid se linearizira prije transformacije. Marker za selekciju (npr. rezistencija na zeocin; Zeo^R) i ishodište replikacije (*Ori*) potrebni su za umnažanje plazmida u *E.coli*. Razina ekspresije proteina u kvascu ovisi o mjestu integracije u kromosomu, koji je ciljan preko homolognih regija na 5' i 3' strani, te o broju integriranih kopija gena. *P* i *TT* predstavljaju promotorski i terminatorski par. Prikladne signalne sekvence upravljaju intracelularnu ili sekretornu ekspresiju rekombinantnog proteina.



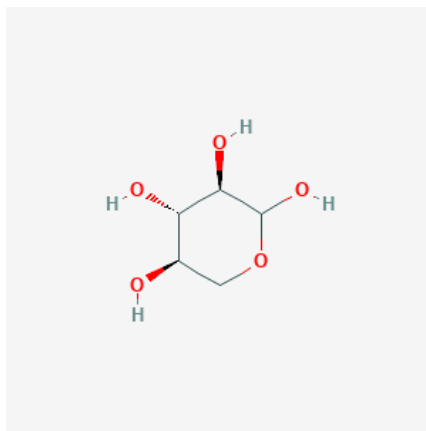
Slika 2. Osnovni sistem ekspresije u *P. pastoris* (preuzeto iz Ahmad i sur., 2014).

2.1.2. Strani proteini eksprimirani u *P. pastoris*

Proizvodi dobiveni ekspresijskim sistemom u *P. pastoris* pronašli su mjesto na tržištu. Neki od primjera su fitaza (dodaje se kao aditiv u hrani za životinje, odvaja fitat iz biljaka, čime se dobiva fosfat), tripsin (proteaza koja se koristi za dobivanje uzoraka peptida za različite analize) i nitrat reduktaza (koristi se za testiranje i tretman vode) (Ahmad i sur., 2014). Poznati biofarmaceutik koji je proizveden u *P. pastoris* je Kalbitor®, to je kalikrein inhibitor koji se koristi u tretmanu nasljednog angioedema. Ovaj proizvod je prvi biofarmaceutik odobren sa strane FDA za izlazak na tržište 2009. godine (Walsh, 2010). Drugi važni proizvodi proizvedeni pomoću *P. pastoris* su rekombinantni humani inzulin i njegovi analozi (Ahmad i sur., 2014)

2.2. Ksilozza

Ksilozza je aldopentoza, monosaharid koji se sastoji od pet ugljikovih atoma i aldehidne skupine (slika 3). Kemijska formula ksiloze je $C_5H_{10}O_5$. D-ksilozza je građevna jedinica polisaharida ksilana. Prisutna je npr. u kukuruzu, pamuku, ljuskama oraha i u slami. Ksilozza je jedna od osam šećera koji su esencijalni u ljudskoj prehrani (<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000098>, Pristupljeno 7. srpnja 2018.)



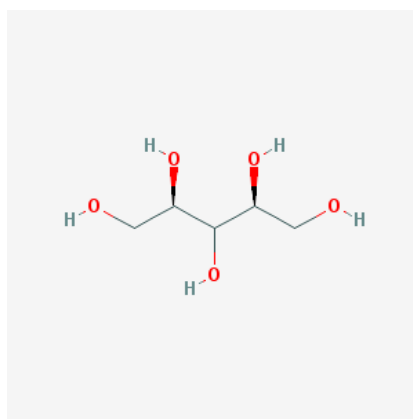
Slika 3. Prikaz strukture ksiloze

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-xylopyranose#section=Top>, pristupljeno 9. srpnja 2018.)

2.3. Ksilitol

Ksilitol je šećerni alkohol građen od pet ugljikovih atoma koji se dobiva prehranom (slika 4). Prirodno se nalazi u voću (šljive, jagode, maline) i povrću (npr. karfiol), te se koristi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao zaslađivač za dijabetičare jer je niskokaloričan. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/xylitol#section=Top>, pristupljeno 16. kolovoza 2018.). U industriji se proizvodi kemijskim procesom koji zahtijeva veliku potrošnju energije i opsežne korake pročišćavanja pa je cijena gotovog proizvoda visoka (Rafiqul i Mimi Sakinah, 2012). Biotehnološka metoda proizvodnje upotrebljava poljoprivredni i šumski otpad, stoga pruža mogućnost ekonomičnije proizvodnje ksilitola reducirajući količinu za proizvodnju potrebne energije. Prekursor ksiloze proizvodi se iz poljoprivredne biomase putem kemijske i enzimatske hidrolize te se može prevesti u ksilitol pomoću kvasca. Kemijska hidroliza se obično provodi u kiselim uvjetima pri čemu se proizvode i razni inhibitori fermentacije, koji smanjuju produkciju ksilitola, stoga je nakon hidrolize potrebno provesti uklanjanje tih inhibitora (Ur-Rehman i sur., 2015).

Ksilitol smanjuje negativne promjene u hrani koje nastaju tijekom skladištenja, zbog svojstva stabilnosti u Maillardovim reakcijama (Kumar i sur., 2018), poboljšava boju i okus hrane te produljuje trajnost tako što inhibira rast saprofita kao što su *Clostridium butyricum* i *Salmonella typhi* (Emodi, 1978). On daje specifičnu teksturu, boju i okus i produljuje trajnost skladištenja raznim džemovima, smrznutim desertima i jogurtima (Kumar i sur., 2018). Ksilitol je prisutan u zubnim pastama zbog svoje sposobnosti zadržavanja vlage (Chi i sur., 2014), ima slatkoću sličnu saharozi, ali ne uzrokuje karijes jer inhibira rast bakterije *Streptococcus mutans* u slini tako što reducira razinu mliječne kiseline koju ova bakterija proizvodi (Makinen, 1992). Ksilitol se također pojavljuje i u kozmetičkoj industriji kao ovlaživač, stoga je prisutan u kremama i losionima za zadržavanje vlage (Kumar i sur., 2018).

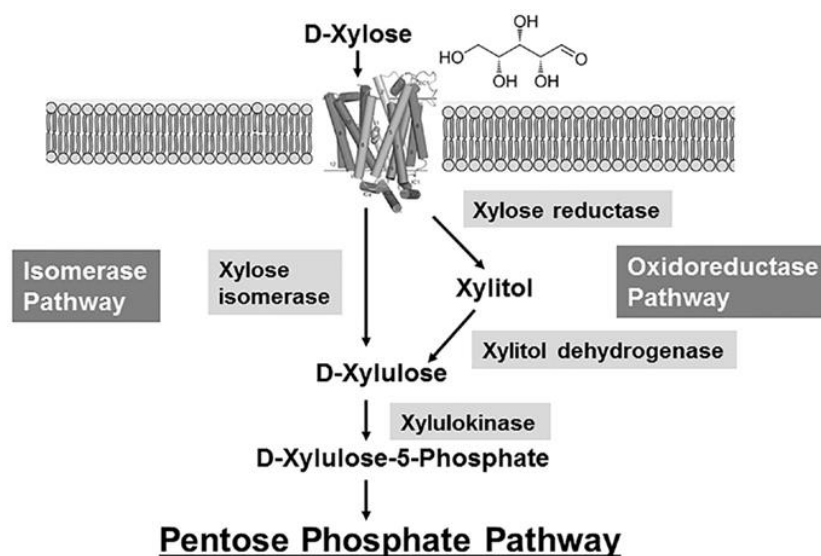


Slika 4. Prikaz strukture ksilitola

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/xylitol#section=Top>, pristupljeno 7. srpnja 2018.)

2.4. Metabolizam ksiloze

Dva su moguća metabolička puta kojima se u stanicama mikroorganizama metabolizira ksiloza, koja se transportira u stanice gdje može ući u oksidoreduktazni ili izomerazni put (slika 5). U bakterijama ksiloza izomeraza izomerizira ksilozu u ksilulozu (izomerazni put). U gljivama je češći dvostupnjeviti oksidoreduktazni put u kojem ksiloza reduktaza reducira ksilozu u ksilitol uz prisutnost koenzima NADPH ili NADH. U većini kvasaca ksiloza reduktaza preferira korištenje NADPH kao koenzim za redukciju ksiloze. Nakon redukcije ksiloze u ksilitol, ksilitol dehidrogenaza oksidira ksilitol u D-ksilulozu uz prisutnost koenzima NAD^+ . Ksilulokinaza fosforilira ksilulozu u ksilulozu-5-fosfat koja se onda dalje degradira u pentoza fosfatnom putu (Nieves i sur., 2015).



Slika 5. Dva metabolička puta D-ksiloze

(https://www.researchgate.net/publication/273148741_Engineering_Sugar_Utilization_and_Microbial_Tolerance_toward_Lignocellulose_Conversion?_sg=2S_p2b0pzeV9ybrk3K3nM32GLN_2c_Ji0Ro4AMwsSZlp291nKVCgXVih7Sw9fL8kUXhdLIzCQ, pristupljeno 10. srpnja 2018.)

Ksiloza reduktaza pripada grupi enzima pod nazivom aldoketoreduktaze 2 (AKR2) koje predstavljaju veliku grupu enzima koja se sastoji od 15 podgrupa sa 120 identificiranih članova (Jez i Penning, 2001). AKR2 kataliziraju reverzibilnu redukciju aldehida i ketona u alkohole, pritom upotrebljavajući najčešće NADPH kao koenzim (Di Luccio i sur., 2006). Većina enzima u ovoj skupini jest monomerna, ali neki, kao što je ksiloza reduktaza, imaju kvarternu strukturu. Ksiloza reduktaza ima veliku ulogu u fermentaciji biljne biomase u etanol i u proizvodnji ksilitola (Woodyer i sur., 2005). Ksiloza reduktaza proizvedena je u raznim organizmima kao što su bakterije, gljive i alge, ali uglavnom se proizvodi u gljivičnim kulturama. Vrste kvasaca koje su poznate po produkciji ksiloza reduktaze spadaju u rod *Candida*, kao što su *C. mogii*, *C. peltata*, *C. pelliculosa*, *C. intermedia* i *C. tropicalis* (Kumar i sur., 2018). Prisutna je u citoplazmi mnogih ksiloza-fermentirajućih kvasaca u kojima katalizira prvi korak metabolizma ksiloze. Esencijalan je enzim za kvašćev rast i iskorištenje ksiloze (Lee, 1998).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Korišteni radni mikroorganizmi su kvasac *Pichia pastoris*, soj BG11 (*aox1Δ*, *Mut^s*) i bakterija *Escherichia coli* (*F⁻ φ80dlacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk, mk⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ*).

3.1.2. Sastav hranjivih podloga za uzgoj mikroorganizama

Sastavi hranjive LB podloge sa Zeocinom korištene za uzgoj bakterije *E.coli* i YPD podloge sa Zeocinom korištene za uzgoj kvasca navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav hranjivih podloga za uzgoj *E. coli* i *P. pastoris*

Komponente hranjive podloge	
LB podloga sa Zeocinom	YPD podloga sa Zeocinom
25 µg/ml Zeocin	100 µg/ml Zeocin
10 g/l baktotripton	20 g/l pepton
5 g/l kvašćev ekstrakt	10 g/l kvašćev ekstrakt
5 g/l NaCl	1% sorbitol

3.1.3. Sastav otopina i pufera

1 M ditiontreitol (DTT)

0,155 g/ml DTT (steriliziran filtracijom)

1 M Sorbitol

0,182 g/ml

BEDS pufer

10mM TRIS-Cl pufer pH=8,3

5% (v/v) dimetil sulfoksid (DMSO)

1M sorbitol

TAE pufer (50x koncentriran)

2 M Tris

1 M octena kiselina

50 mM EDT

0,2% Na-dodecil sulfat (SDS)

0,002 g/ml SDS

PCR pufer (10x koncentriran)

0,13 M Tris-HCl pH 8,5

0,56 M KCl

50 mM MgCl₂

10 mM dNTP

50 mM K-fosfatni pufer pH 8

16,51 g/l K₂HPO₄

0,707 g/l KH₂PO₄

Pufer za elektroforezu (10 x konc.)

30 g/l TRIS

144 g/l glicin

10 g/l SDS

Laemmli pufer za uzorke (5 x konc.)

0,75 g TRIS (podesiti pH na 6,8 HCl-om)

0,095 g EDTA III

2,5 g SDS

10 mL glicerol

6,25 mL β-merkaptetoetanol

H₂O do 25 mL

0,005% brom-fenol plavo

Ponceau S

0,1 g / 100 mL 5% HAc

Pufer za blokiranje

6 g/L TRIS (pH podesiti s HCl na 7,5)

8,8 g/L NaCl

0,1% TRITON X-100

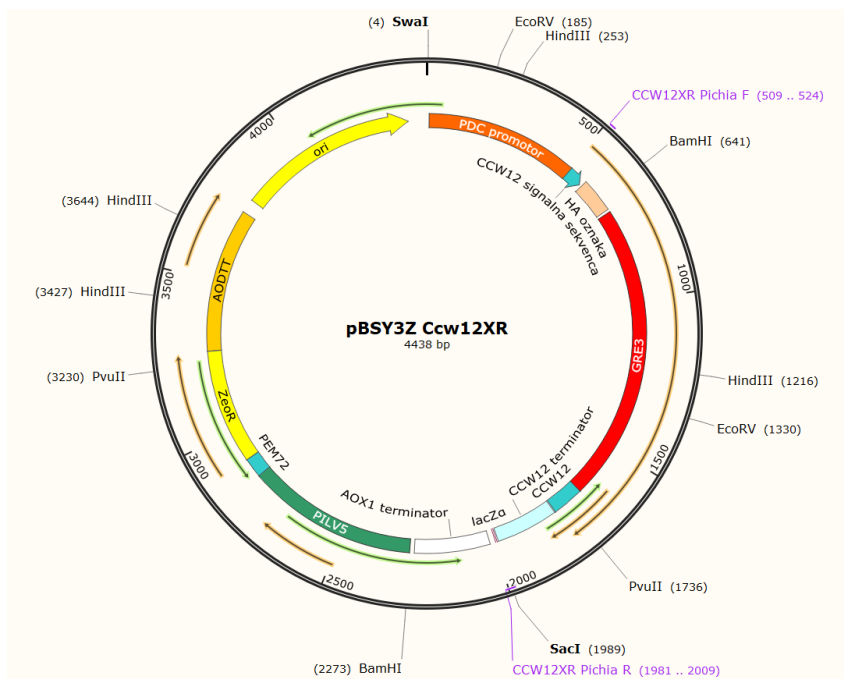
3.1.4. Ostale kemikalije

- NADPH - Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany)
- ksiloza - Arcos Organics (New Jersey, USA)
- anti-HA antitijela - Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Germany)
- kit za izolaciju plazmida iz stanica *E.coli* NucleoSpin® Plasmid (No Lid) -(Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- λ DNA standard za elektroforezu - Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Taq polimeraza, dNTP, restrikcijski enzimi: EcoRV, BamHI, PvuII, SacI, SwaI; - New England Biolabs (Ipswich, USA)
- amonijev persulfat (APS), N,N-metilenbisakrilamid, Triton X-100, β -merkaptotanol - Fluka (Buchs, Switzerland)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), Ponceau S - Serva (Heidelberg, Germany)
- low molecular weight (LMW) proteinski standardi za elektroforezu - Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)
- agaroz - Sigma-Aldrich Life Science, (St. Louis, Missouri, SAD)
- kvaščev ekstrakt, baktotripton – Biolife (Milano, Italija)
- Zeocin – InvivoGen (Toulouse, Francuska)
- Qubit™ 4 Quantitation Starter Kit (ThermoFischer, Waltham ,MA, SAD)

Ostale kemikalije su analitičke čistoće i nabavljene od uobičajenih dobavljača.

3.1.5. Plazmid korišten u radu

U radu je korišten plazmid pBSY3ZCcw12XR (slika 6.). Plazmid sadrži *ori* ishodište replikacije (*engl. origin of replication*) koje mu omogućava samostalnu replikaciju unutar *E. coli*. *PDC* promotor kontrolira ekspresiju gena *CCW12XR*, a završetak transkripcije osiguran je prisustvom *AOX1* terminatora. U plazmidu je prisutan i gen za rezistenciju na zeocin, antibiotik iz skupine bleomicina, koji se koristi kod selekcije transformiranih bakterijskih i kvašćevih stanica na hranjivim podlogama sa zeocinom.



Slika 6. Genetička mapa plazmida pBSY3Z Ccw12XR

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj bakterije *E.coli*

Bakterije su uzgojene u LB Zeocin tekućoj podlozi preko noći na tresilici pri 37 °C.

3.2.2. Izolacija plazmida

Izolacija plazmida provedena je iz 4 mL suspenzije stanica *E. coli* uzgojenih preko noći na 37 °C u tekućoj LB podlozi sa Zeocinom pomoću kita NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema sljedećim uputama proizvođača.

1. Izdvajanje bakterijskih stanica

Stanice *E.coli* se od podloge odvoje centrifugiranjem se u standardnoj mikrocentrifugi tijekom 30 sekundi na 11.000 x g. Supernatant je odbačen.

2. Liza stanica

Stanice se resuspendiraju u 500 µL pufera A1, nakon čega se u suspenziju stanica dodaje 500 µl pufera A2, miješa se lagano invertirajući tubicu 6-8 puta, dok se nepostigne ravnomjerno plavo obojenje suspenzije. Suspenzija se inkubira na sobnoj temperaturi do 5 minuta ili dok lizat ne postane bistar. Dodaje se 600 µl pufera A3 i pomiješa invertirajući tubicu 6-8 puta, dok se suspenzija potpuno ne obezboji. Suspenzija se centrifugira 10 minuta na 11.000 x g na sobnoj temperaturi i odvoji se supernatant koji sadrži DNA.

3. Vezanje DNA

Na kolonicu za vezanje DNA (NucleoSpin® plasmid kit) se nanese maksimalno 750 µl supernatanta i centrifugira 1 minutu na 11.000 x g. Odbacuje se filtrat koji je prošao kroz NucleoSpin® plasmid kolonicu.

4. Ispiranje

Na kolonicu se dodaje 500 µl pufera AW i centrifugira se 1 minutu na 11.000 x g. Filtrat se odbaci, a kolonica se još jednom centrifugira 2 minute na 11.000 x g.

5. Eluacija DNA

NucleoSpin® plasmid kolonica se umetne u 1,5 ml eppendorf tubicu i dodaje se 25 µl Pufera AE zagrijanog na 70°C. Inkubira se 3 minute i zatim centrifugira 1 minutu na 11.000 x g. Postupak se ponovi još jednom, a eluati se skupljaju.

3.2.3. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija DNA u otopini plazmida određena je pomoću fluorometra Qubit 4 (ThermoFischer). pomoću kita Qubit™ 4 Quantitation Starter Kit (ThermoFischer, Waltham, SAD) prema uputama proizvođača. Potrebno je izmjeriti koncentraciju plazmida kako bi se mogao odrediti potreban volumen otopine plazmida za transformaciju kvasca.

3.2.4. DNA elektroforeza u agaroznom gelu

DNA elektroforeza provedena je u 1% agaroznom gelu dobivenim otapanjem agaroze u TAE puferu (40 mmol/L TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol/L EDTA). Elektroforeza je provedena pri naponu od 80 V u trajanju od 45 minuta. Po završetku, agarozni gel je uronjen u otopinu etidij-bromida (1 mg/mL) na 15 minuta, nakon čega su vrpce DNA fragmenata vizualizirane pomoću transiluminatora (Hoefer, Macrovue UVis-20).

3.2.5. Restriksijska analiza plazmida

Nakon umnažanja i izolacije plazmida iz *E.coli* provedena je restriksijska analiza dobivenih plazmida. Pripremljene restriksijske smjese (tablica 2) inkubiraju se na 37°C u trajanju od 1,5h. Zatim, provodi se gel elektroforeza u 1% agaroznom gelu. Elektroforezom se molekule razdvajaju ovisno o brzini kojom putuju u električnom polju. Agarozni gel postavlja se u TAE pufer u kadu za elektroforezu. Uzorci DNA se pipetiraju u jažice gela i uključi se električno polje (80 mA). Nukleinske kiseline su negativno nabijene, stoga se kreću prema pozitivnoj elektrodi. Gel djeluje kao sito i usporava gibanje većih molekula, stoga se manje molekule brže kreću kroz gel te se nukleinske kiseline razdvajaju ovisno o njihovoj veličini (Cooper, 2000).

Tablica 2. Sastav restriksijske smjese

Restriksijska smjesa	Sastav
1	1μl plazmida, 0,5μl enzima BamHI, 1μl pufera, 7,5μl H ₂ O
2	1μl plazmida, 0,5μl enzima EcoRV, 1μl pufera, 7,5μl H ₂ O
3	1μl plazmida, 0,5μl enzima PvuII, 1μl pufera, 7,5μl H ₂ O
4	1μl plazmida, 0,5μl enzima SacI, 1μl pufera, 7,5μl H ₂ O

Nakon restrikcijske analize, 41 μ l plazmida je pomiješan s 5 μ l pufera i 4 μ l enzima SwaI u eppendorfici i inkubiran tijekom noći na 25 °C kako bi se linearizirao plazmid.

3.2.6. Protokol za pripremu kompetentnih stanica i transformaciju *P. pastoris*

Kolonija *P. pastoris* se uzgoji u 5 mL YPD podloge bez Zeocina na 30°C u tresilici. Sljedeći dan, prekonoćna kultura razrijedi se na A_{600} od 0,15-0,20 u volumenu od 50 mL YPD podloge bez Zeocina. Kvasac se uzgaja do A_{600} od 0,8-1,0 u tresilici na 30°C. Stanice se zatim odvoje od podloge centrifugiranjem 5 minuta na 500 x g i odlije se supernatant. Nakon toga, stanice se resuspendiraju u 1,8 mL hladne BEDS otopine uz dodatak 1 mL 1 M ditiontreitola (DTT). Zatim, suspenzija stanica inkubira se na tresilici 5 minuta na 100 rpm i 30°C. Nakon toga se suspenzija stanica ponovno centrifugira 5 minuta na 500 x g i resuspendira u 0,2 mL otopine BEDS-a bez DTT-a. Kompetentne stanice su onda spremne za transformaciju. U tri zasebne elektroporacijske kivete je uzeto po 10, 20 i 1 μ L plazmidne DNA linearizirane SwaI enzimom, te je u svaku dodano po 40 μ L kompetentnih stanica. Suspenzija se inkubira 2 minute na ledu nakon čega se stanice tretiraju električnim impulsom u elektroporatoru (2,0 kV). Odmah nakon elektroporacije, uzorcima se doda 1 mL 1.0 M sorbitola i 0,5 mL YPD-a prethodno ohlađenih u ledu. Suspenzija stanica se pažljivo prenese u sterilnu eppendorficu i inkubira 1h na 30°C bez trešenja. Stanice se odvoje od podloge centrifugiranjem (8000 rpm/1 min) i nacijepe na YPD/sorbitol ploče sa Zeocinom.

3.2.7. PCR analiza transformanata *P. pastoris*

Pomoću pipetmana, vrhom tipsa, prenese se mali alikvot porasle kolonije kvasca u eppendorf epruvetu u koju je prethodno dodano 30 μ L 0,2% SDS-a. Suspenzija se vorteksira 15 sekundi nakon čega se zagrijava 4 minute na 90°C pri čemu doazi do lize stanica. Suspenzija se zatim centrifugira u mikrofugi 1 minutu i supernatant koji sadrži intracelularni sadržaj i genomsku DNA se prenese u nove eppendorfice i koristi za PCR analizu. Za PCR analizu je potrebno pripremiti reakcijsku smjesu čiji je sastav prikazan u tablici 3.

Tablica 3. Reakcijska smjesa za provođenje PCR analize

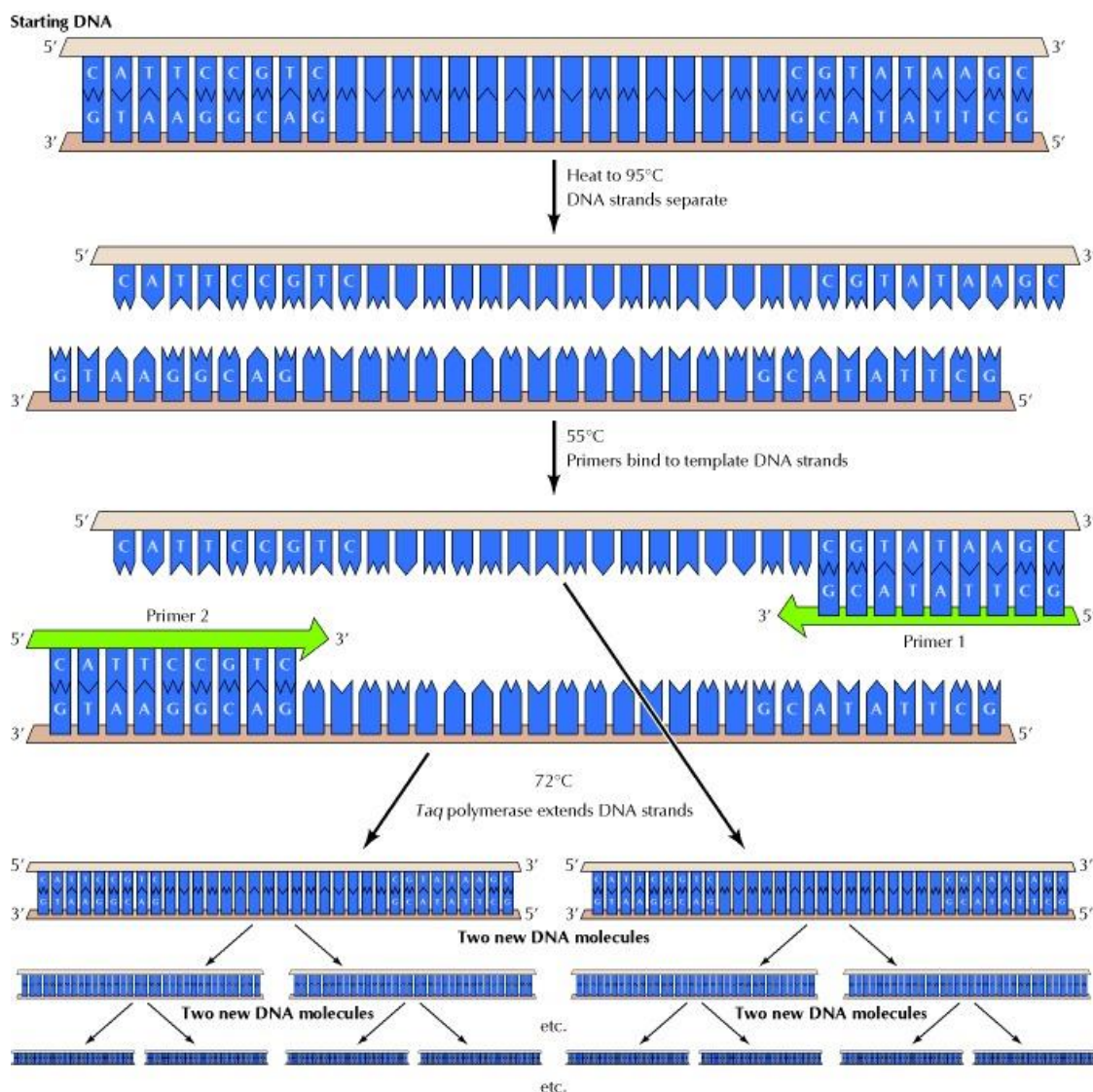
otopina plazmida ili genomska DNA	1 μ L
Primer F	2 μ L
Primer R	2 μ L
Pufer za DNA polimerazu	5 μ L
dNTP	1 μ L
Taq polimeraza	1 μ L
sterilna voda	36 μ L
25% Triton X-100	2 μ L

PCR se provodi u uređaju *Thermocycler*. Tijek PCR ciklusa opisan je u tablici 4. Nakon PCR-a umnoženi fragmenti se analiziraju elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu.

Tablica 4. Tijek PCR ciklusa

Ciklus	Broj ponavljanja ciklusa	Vrijeme provođenja	T (°C)
1	1	5 min.	95
		1 min. 30 sek.	46
		1 min. 31 sek.	72
2	4	45 sek.	95
		1 min. 30 sek.	46
		1 min. 31 sek.	72
3	30	45 sek.	95
		1 min. 30 sek.	46
		1 min. 31 sek.	72

Tijekom provedbe PCR metode DNA polimeraza ponavlja replikaciju određenog segmenta DNA. Broj molekula DNA povećava se eksponencijalno sa svakim krugom replikacije, stoga se znatna količina DNA može dobiti iz malog početnog broja kopija DNA (slika 7). Potrebno je poznavati sekvence nukleotida koje okružuju regiju DNA koja se želi amplificirati, jer je potrebno sintetizirati odgovarajuće početnice (primere) koji iniciraju sintezu DNA u željenoj regiji. Koriste se dvije početnice od kojih započinje sinteza DNA u suprotnim smjerovima. Reakcija započinje zagrijavanjem DNA na visoku temperaturu (95 °C) kako bi se razdvojila dvostruka uzvojnica DNA na pojedinačne lance. Temperatura se onda smanjuje kako bi se omogućilo komplementarno sparivanje početnica s komplementarnim sekvencama na lancima DNA kalupa. DNA polimeraza zatim koristi početnice kao klice kako bi sintetizirala novi lanac komplementaran svakom lancu kalupu. Stoga su u jednom krugu ciklusa dva nova lanca DNA sintetizirana iz jedne molekule kalupa (Cooper, 2000).



Slika 7. Amplifikacija DNA pomoću PCR (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9950/> , pristupljeno 21. srpnja 2018.)

3.2.8. Uzgoj transformanata kvasca *P. pastoris*

Transformanti *P. pastoris* se uzgajaju u YPD podlozi sa Zeocinom na tresilici pri 30 °C tijekom 12-16h. Nakon toga se alikvot suspenzije stanica precijepi u istu podlogu na početni OD₆₀₀ 0,5 i uzgaja još dvije generacije. Suspenzija stanica se zatim prenese u podlogu u koju se doda 0,5% metanola kao induktora i uzgaja preko noći na tresilici pri 30 °C.

3.2.9. Izolacija stanične stijenke kvasca uporabom BeadBug™ uređaja

Stanice kvasca se odvoje od podloge centrifugiranjem 5 minuta na 3000 rpm. Ispiru se dva puta s destiliranom vodom i jedan put s 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8. Zatim se resuspendiraju u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 8 u omjeru 100 μ L pufera na 75 OD₆₀₀ jedinica stanica kvasca te se dodaju staklene kuglice u volumenu ~75-100% volumena suspenzije stanica. Nakon toga slijedi razbijanje stanica u BeadBug™ uređaju pri brzini od 4000 rpm tijekom 3 minute. Stijenke se odvoje od kuglica i intracelularnog sadržaja centrifugiranjem suspenzije 1 minutu na 8000 rpm. Dobivene stanične stijenke ispiru se četiri puta s 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8.

3.2.10. Izolacija proteina stanične stijenke

Talog izoliranih stijenki se resuspendira u 1 mL Laemmli pufera (bez glicerola) nakon čega se suspenzija kuha 10 minuta u vrijućoj vodenoj kupelji, te centrifugira 1 minutu na 8000 rpm, kako bi se odvojile stijenke od ekstrakta. SDS ekstrakti su spremljeni u zamrzivač, a prethodna tri koraka su ponovljena dva puta. Talog stijenki se onda ispirao četiri puta s 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8 i dva puta s 50 mM K-fosfatnim puferom pH 6. Stijenke se zatim resuspendira u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 6 u omjeru 100 μ L pufera na 100 OD₆₀₀ jedinica. Zatim se u suspenziju stijenki doda β -glukanaza u omjeru 9 IU na 100 OD₆₀₀ jedinica. Uzorci su inkubirani 2h na 55°C, te se nakon toga centrifugiranjem 10 minuta na 13000 rpm, odvoji ekstrakt proteina stijenke od taloga staničnih stijenki.

3.2.11. Analiza proteina Western blot metodom

Western blot metodom mogu se identificirati specifični proteini u kompleksnoj smjesi sastavljenoj od više različitih proteina. U uzorke SDS-ekstrakta i β -glukanaznog ekstrakta proteina stanične stijenke dodaje se Laemmli pufer za uzorke (5 x konc.) kako bi se protein denaturirali prije provedbe elektroforeze. Gel za elektroforezu sastoji se od 10% donjeg gela i gornjeg gela. Donji gel priprema se miješanjem 4,25 mL H₂O; 4,25 mL otopine akrilamida; 4,25 mL pufera za donji gel; 8,5 μ L TEMED-a i 64,6 μ L APS-a. Gornji gel pripremljen je miješanjem 4,26 mL pufera za gornji gel; 0,6 mL otopine akrilamida, 10 μ L TEMED-a i 45 μ L APS-a. Najprije se ulije donji gel između dva stakalca te se nadsloji izopropanolom koji sprječava kontakt kisika s gelom zato što kisik inhibira polimerizaciju gela. Nakon što donji gel polimerizira, ulije se gornji gel. U pripremljenom gelu provodi se SDS-elektroforeza tijekom koje se proteini razdvajaju ovisno o njihovoj molekulskoj masi. Nakon završetka elektroforeze, gel se prenese u "sendvič" za blot tako da se u posudu s puferom za blot (TRIS 3,03 g; glicin 14,4 g; metanol

200 mL i destilirana voda 800 mL) namoče filter papiri i nitroceluloza, te se slože redom jedno na drugo: filter papiri, nitroceluloza, gel, filter papiri pa sve zajedno u kazetu uređaja za elektrotransfer proteina iz gela na nitrocelulozu (BIO-RAD, Trans-Blot® Turbo™ Transfer System). Prikluče se elektrode i struja se namjesti na jakost 1 A i transfer traje 25 minuta. Nakon transfera, nitroceluloza se boja Ponceau S bojom do pojave proteinskih vrpca (standarda). Nitroceluloza se djelomično odboja ispiranjem destiliranom vodom, standardi se označe tupom grafitnom olovkom i nitroceluloza odboja do kraja. Nitroceluloza se zatim inkubira preko noći u puferu za blokiranje s 1% obranog mlijeka pri 4 °C. Nakon toga se nitroceluloza prenese u novih 5 mL pufera za blokiranje, doda se 5 µL anti-HA antitijela i inkubira na tresilici pri sobnoj temperaturi 1,5h. Antitijela s kojima se membrana inkubira se specifično vežu na -HA oznaku koja je dio rekombinantnog proteina. Nitroceluloza se zatim ispiru 3 puta 5-10 minuta puferom za blokiranje. Ispiranjem membrane s puferom, ispiru se nevezana antitijela te ostaju samo antitijela koja su vezana na traženi protein. Zatim se membrana natopi s 800 µL otopine Clarity Western ECL supstrata (BIO-RAD, Hercules, California, USA) koji ulazi u interakciju s enzimom koji je vezan na antitijela. Dolazi do emitiranja kemiluminiscentnog signala s membrane koji detektira C-digit uređajem (Li-Cor, Lincoln, Nebraska USA).

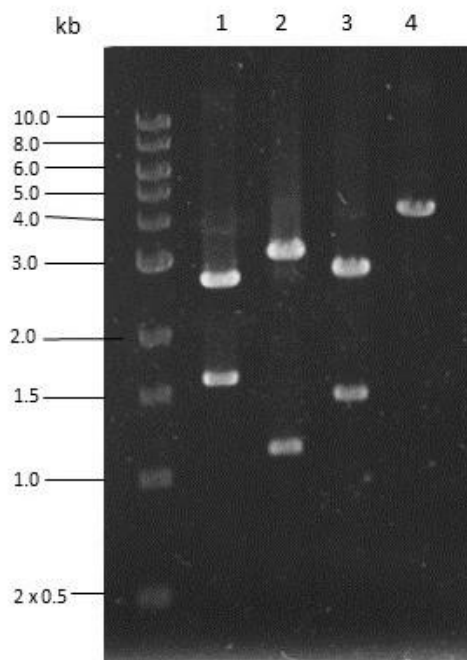
3.2.12. Mjerenje aktivnosti ksiloza reduktaze

Transformanti *P. pastoris* uzgojeni su prema metodi u poglavlju 3.2.6., nakon čega im je određena optička gustoća mjerenjem apsorbancije na spektrofotometru pri 600 nm. Stanice se odvoje od podloge centrifugiranjem 5 minuta na 3000 rpm i ispiru dva puta s destiliranom vodom i jedan put s 50 mM K-fosfatnim puferom pH 6. Talog stanica se zatim resuspendira u istom puferu u omjeru 1 mL pufera na 350 OD₆₀₀ jedinica kvasca. U slijepu probu dodaje se 160 µL istog pufera, 20 µL 1M ksiloze i 20 µL 2 mM NADPH. Ksiloza i NADPH su otopljeni u istom puferu. U uzorke za mjerenje aktivnosti se dodaje 150 µL pufera, 10 µL suspenzije stanica kvasca, 20 µL 1 M ksiloze i 20 µL 2 mM NADPH. Reakcijske smjese se inkubiraju 15 minuta na 30°C. Nakon toga, stanice se odvoje centrifugiranjem 5 minuta na 3000 rpm i mjeri A₃₄₀ u supernatantu. Ksiloza reduktaza reducira ksilozu u ksilitol uz prisutnost koenzima NADPH koji se pri tome oksidira. Koncentracija preostalog NADPH se određuje mjerenjem apsorbancija na spektrofotometru pri 340 nm.

4. REZULTATI

4.1 Restriksijska analiza plazmida

Prije transformacije kvasca plazmidom potrebno je provesti restriksijsku analizu plazmida kako bi provjerili je li iz stanica *E. coli* izolirani ispravan plazmid koji sadrži gen koji kodira za ksilozu reduktazu. Restriksijski enzimi cijepaju molekulu DNA unutar određenih sekvenci u smjesu fragmenata koji se analiziraju elektroforezom, te je unaprijed poznata točna veličina fragmenata koji se dobiju nakon restrikcije poznate sekvence DNA s određenim enzimom (Cooper, 2000). Na gel elektroforezi, fragmenti DNA putuju različitim brzinama ovisno o njihovoj veličini. Manje molekule brže se gibaju kroz gel koji djeluje kao sito. Dobiveni bendovi nakon elektroforeze uspoređuju se s bendovima standarda. Duljina fragmenata na slici 8. odgovaraju očekivanim vrijednostima, čime je potvrđeno da izolirani plazmid sadrži odgovarajuće sekvence za cijepanje restriksijskim enzimima pa se stoga može zaključiti da je iz stanica *E. coli* izoliran ispravan plazmid pBSY3Z Ccw12XR.



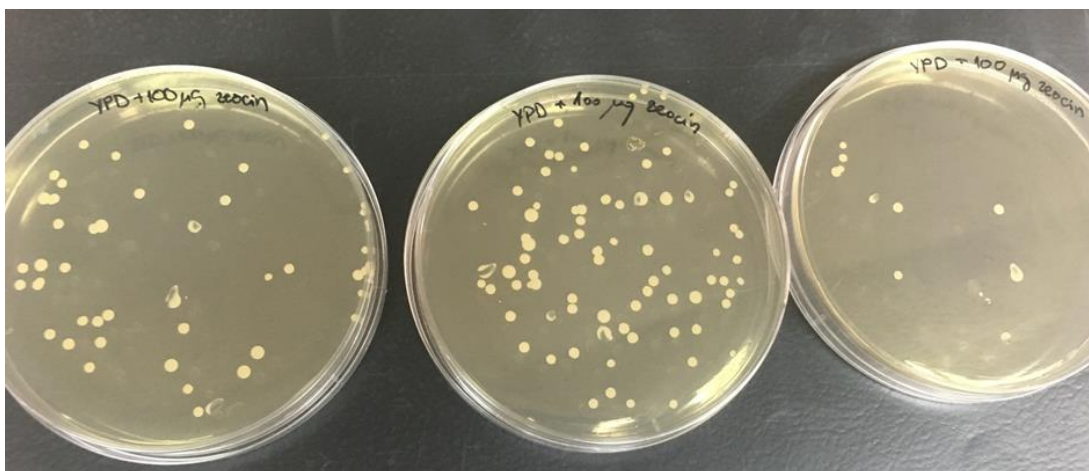
Slika 8. Restriksijska analiza plazmida pBSY3Z Ccw12XR. Fragmenti DNA - Uzorci: 1. pBSY3Z Ccw12XR cijepan s BamHI (gornja vrpca 2596 pb; donja vrpca 1632 pb); 2. pBSY3Z Ccw12XR cijepan s EcoRV (gornja vrpca 3293 pb, donja vrpca 1145 pb); 3. pBSY3Z Ccw12XR cijepan s PvuII (gornja vrpca 2944 pb, donja vrpca 1494 pb); 4. pBSY3Z Ccw12XR cijepan sa SacI (4438 pb).

4.2. Transformacija *P. pastoris*

Nakon transformacije kvasca lineariziranim plazmidom pBSY3Z CcW12XR elektroporacijom, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode, suspenzija kvasca je nacijepljena na YPD/sorbitol ploče sa Zeocinom. Na tri odvojene ploče nanese su suspenzije kvasca koje su transformirane s različitim koncentracijama DNA (slika 9). Broj poraslih kolonija na pojedinoj ploči dan je u tablici 5. Suspenzija kvasca, koja je transformirana s 5 µg DNA, rezultirala je porastom najvećeg broja transformanata, dok je suspenzija kvasca koja je transformirana s najvećom koncentracijom DNA rezultirala porastom najmanjeg broja kolonija na podlozi. Dobiveni rezultati su donekle različiti od očekivanih, odnosno što je veća koncentracija DNA korištena za transformaciju trebala bi biti veća i uspješnost transformacije kvasca. Kolonije, koje su porasle, bi trebale biti transformirane unesenim plazmidom, zato što ekspresijski vektor s kojim je *P. pastoris* transformirana sadrži gen koji daje rezistenciju na antibiotik Zeocin. Na taj način osigurana je selekcija transformiranih od netransformiranih stanica *P. pastoris*.

Tablica 5. Rezultati transformacije

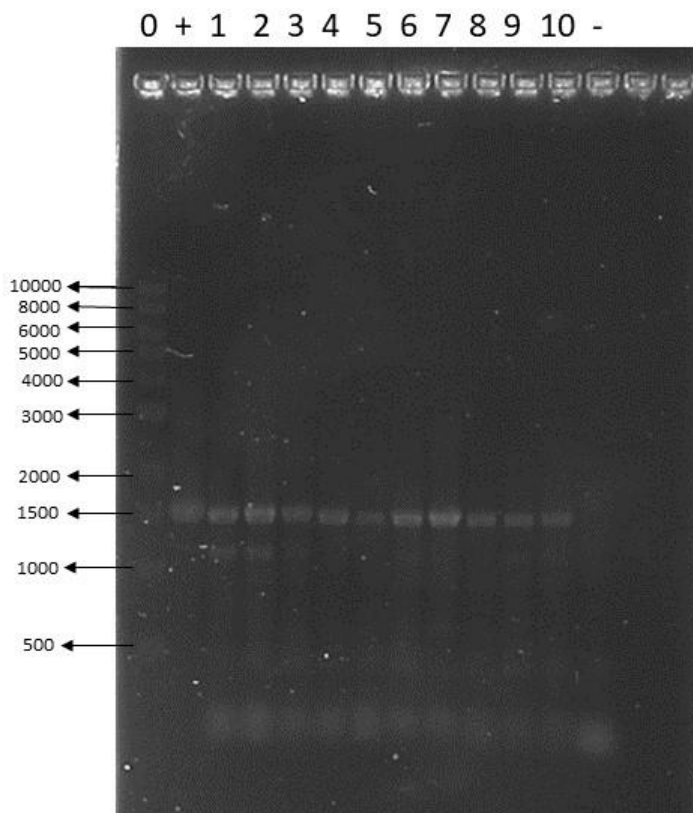
Količina linearizirane plazmidne DNA	Broj poraslih kolonija transformanata
10 µg	11
5 µg	78
0,5 µg	48



Slika 9. Kolonije transformanata porasle na YPD podlozi sa Zeocinom. Lijeva ploča – kvasac transformiran sa 0,5 µg plazmida; srednja ploča - kvasac transformiran sa 5 µg plazmida; desna ploča - kvasac transformiran sa 10 µg plazmida.

4.3. PCR detekcija fragmenta unesenog transformacijom u genomsku DNA

PCR metodom se može utvrditi prisutnost određenog fragmenta DNA u nekom uzorku. Stoga je provedena PCR analiza DNA, izolirane iz stanica transformanata, kako bi se potvrdio unos željenog fragmenta u genom transformiranih stanica. Provedbom PCR metode, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode, umnožen je Ccw12XR fragment iz plazmida BSY3ZCcw12XR i iz DNA izolirane iz transformiranih stanica. Duljina dobivenih fragmenta je provjerena elektroforezom (slika 10), čime je pokazano da duljina umnoženih fragmenta odgovara očekivanoj vrijednosti od 1500 pb. Rezultat potvrđuje prisutnost fragmenta Ccw12XR u DNA izoliranoj iz stanica transformanata. Netransformirana *P. pastoris* upotrijebljena je kao negativna kontrola, odnosno pojavljivanje benda u ovom uzorku bi ukazivalo na pogrešku. Također, u svrhu pozitivne kontrole, korišten je plazmid kojim su stanice transformirane, te je očekivano pojavljivanje benda na istoj visini kao i kod uzoraka iz transformirane *P. pastoris*. Dobiveni rezultati poklapaju se s očekivanjima.



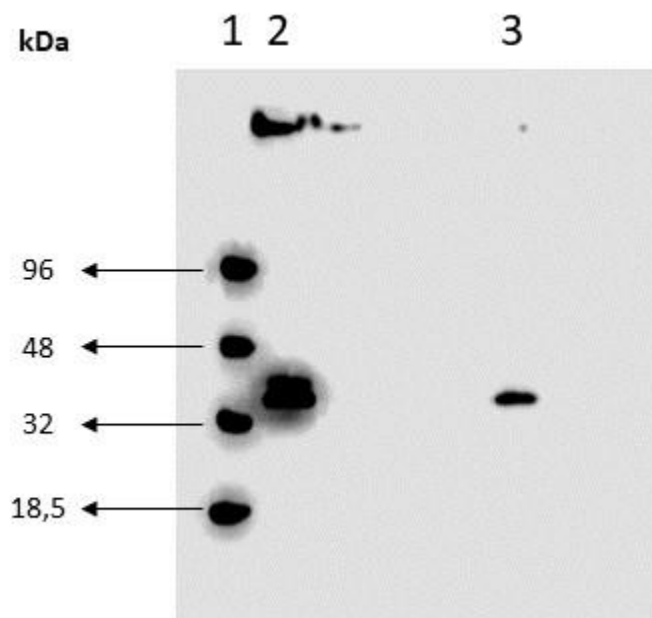
Slika 10. Duljine fragmenata dobivenih PCR metodom. Uzorci: 0. standard-DNA ladder; (+) fragment iz originalnog plazmida (1500 pb); 1.-10. fragmenti umnoženi iz DNA izolirane iz kolonija 10 različitih kolonija transformanata (1500 pb); (-) fragment umnožen iz DNA izolirane iz netransformirane *P. pastoris*

4.4. Ekspresija i imobilizacija ksiloza reduktaze na staničnoj stijenci kvasca

Transformanti *P. pastoris* se uzgajaju u YPD podlozi sa Zeocinom u koju se dodaje 0,5% metanol koji inducira ekspresiju ciljanog gena, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Potrebno je bilo izolirati stanične stijenske transformanata kvasca kako bi se utvrdila imobilizacija i ekspresija ksiloza reduktaze na površini stijenke. U protivnom, ne bi se mogla razlikovati ksiloza reduktaza koja je prisutna unutar stanice i enzim koji je na površini stijenke. Zatim, proteini stanične stijenke odvojeni su od stanične stijenke te su analizirani Western blot metodom, čime je ispitana uspješnost ekspresije i imobilizacije rekombinantnog proteina na površini stanice.

Na slici 11. vidljivo je da su se pojavili bendovi rekombinantnog proteina u SDS-ekstraktu i glukanoznom ekstraktu stijenke. Pojava proteinskih vrpca odgovarajuće molekulske mase od 37

kDa na nitroceluloznoj membrani potvrđuje uspješnost ekspresije i imobilizacije proteina ksiloze reduktaze na staničnoj stijenci *P. pastoris*.



Slika 11. Western blot analiza proteina stijenci. Uzorci: 1. LMW standardi; 2. SDS-ekstrakt stijenci; 3. glukanazni ekstrakt stijenci.

4.5. Detekcija aktivnosti ksiloze reduktaze

Nakon što je utvrđena uspješna ekspresija i imobilizacija ksiloza reduktaze u staničnoj stijenci, mjerila se aktivnost enzima. Sama ekspresija ksiloze reduktaze ne ukazuje na funkcionalnost enzima, stoga se aktivnost ispituje provođenjem enzimske reakcije uz supstrat i koenzim za koji je enzim specifičan. Prije provođenja reakcije, mjerena je apsorbancija suspenzija uzgojenih kvasca na 600 nm kako bi se utvrdilo kolika je količina stanica u suspenziji i izjednačila količina stanica u različitim uzorcima. Količina stanica kvasca u suspenziji izražava se brojem OD₆₀₀ jedinica, što se dobije množenjem izmjerene vrijednosti A₆₀₀/ml s ukupnim volumenom podloge u kojoj su kvasci uzgojeni. Vrijednosti apsorbancije i izračunate OD₆₀₀ jedinice dane su u tablici 6.

Tablica 6. Vrijednosti očitane apsorbancije suspenzije kvasca na 600 nm i ukupni broj OD₆₀₀ jedinica uzgojenog kvasca

Uzorak	A ₆₀₀	OD ₆₀₀
1	1,81	90
2	1,35	67

Stanice su zatim resuspendirane u puferu u omjeru 1 mL pufera na 350 OD₆₀₀ jedinica kvasca. Ksiloza reduktaza reducira ksilozu u ksilitol uz koenzim NADPH. NADPH apsorbira svjetlost valne duljine 340 nm, dok njegov oksidirani oblik NADP⁺ ne apsorbira svjetlost ove valne duljine. Mjerenjem A₃₄₀ reakcijske smjese nakon provođenja reakcije dobivene su vrijednosti prikazane u Tablici 7. Uzorci 1 i 2 imaju manju vrijednost apsorbancije u odnosu na slijepu probu, što potvrđuje da je u njima prisutna ksiloza reduktaza, koja katalizira reakciju u kojoj se NADPH oksidira i prelazi u NADP⁺, odnosno smanjuje se koncentracija NADPH u uzorku. Stoga može se zaključiti da je ksiloza reduktaza u ovim uzorcima aktivna. Razlika u apsorbanciji između Uzorka 1 i slijepa probe iznosi 0,729, dok razlika između Uzorka 2 i slijepa probe iznosi 1,006. Što je veća razlika u apsorbanciji slijepa probe i uzorka, veća je razlika i u koncentraciji NADPH, odnosno koncentraciji enzima. U slijepoj probi ne dolazi do promjene koncentracije NADPH zbog nedostatka enzima koji katalizira reakciju u kojoj se NADPH oksidira. Apsorbancija Uzorka 2 više odstupa od slijepa probe u odnosu na Uzorak 1, stoga može se zaključiti da Uzorak 2 sadrži veću koncentraciju enzima od Uzorka 1 zbog većeg utroška NADPH.

Tablica 7. Izmjerene srednje vrijednosti apsorbancije NADPH

Uzorak	A ₃₄₀
Slijepa proba	1,595±0,022
1	0,866±0,0035
2	0,589±0,004

5. RASPRAVA

Kvasac *Pichia pastoris* je metilotrofni kvasac i pripadnik carstva *Fungi*. Upotrebljava se kao domaćin za ekspresiju heterolognih proteina. *P. pastoris* je jednostanični organizam s kojim je lako manipulirati te predstavlja jednostavni sistem za proizvodnju velike količine rekombinantnih proteina pod utjecajem reguliranih promotora. Ekspresija u *P. pastoris* najčešće je upravljana metanol inducirajućem promotorom *AOX1* ili konstitutivnim *GAP* promotorom (Ahmad i sur., 2014). Razni proteini dobiveni ekspresijom u *P. pastoris* pronalaze mjesto na tržištu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Ksilitol je šećerni alkohol građen od pet ugljikovih atoma koji nastaje redukcijom ksiloze, a koristi se kao zaslađivač za dijabetičare te je slične slatkoće kao i saharoza ali s 33% manje kalorija (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/xylitol#section=Top>, pristupljeno 16. kolovoza 2018.). Upotrebljava se u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Ksiloza reduktaza pripada grupi enzima pod nazivom Aldoketoreduktaze 2 (AKR2). AKR2 kataliziraju reverzibilnu redukciju aldehida i ketona u alkohole pritom upotrebljavajući najčešće NADPH kao koenzim. Ksiloza se transportira u stanice gdje može ući u oksidoreduktazni ili izomerazni put, ovisno o vrsti stanica. U bakterijama enzim ksiloza izomeraza izomerizira ksilozu u ksilulozu (izomerazni put). U gljivama je češći dvostupnjeviti oksidoreduktazni put u kojem ksiloza reduktaza reducira ksilozu u ksilitol uz prisutnost koenzima NADPH ili NADH.

Cilj ovog rada bila je ekspresija i imobilizacija heterologne rekombinantne ksiloza reduktaze iz *S. cerevisiae* u staničnoj stijenci kvasaca *P. pastoris*. Gen koji kodira za ovaj enzim prisutan je u konstruiranom vektorskom plazmidu pBSY3ZCcw12XR koji je dobiven ligacijom Ccw12XR rekombinantnog fragmenta s plazmidom pBSY3Z. Plazmid sadrži gen koji je odgovoran za rezistenciju na zeocin i može se replicirati u *E. coli* te ugraditi u genom *P. pastoris*. Bakterije *E. coli* koje sadrže traženi plazmid su uzgojene u LB tekućoj podlozi sa Zeocinom, nakon čega je slijedila izolacija plazmida iz stanica bakterije. Nakon izolacije, plazmidi su podvrgnuti digestiji restrikcijskim enzimima koji cijepaju DNA u određenim sekvencama i duljine dobivenih fragmenata su određene elektroforetski usporedbom sa DNA standardima. Na ovaj način je provjereno je li iz stanica izolirani traženi plazmid. Fragmenti dobiveni restrikcijskom analizom izoliranog plazmida su potvrdili da je izoliran ispravan plazmid koji sadrži željeni fragment Ccw12XR. Nakon toga je plazmid pocijepan enzimom SwaI kako bi se linearizirao i na taj način pripremio za transformaciju *P. pastoris*. Ubacivanje egzogene DNA u stanicu zahtijeva dva

koraka: (1) pripremu kompetentnih stanica koje mogu primiti DNA i (2) transformaciju stanica s DNA. Protokol za pripremu kompetentnih stanica i transformacija *P. pastoris* je kombinacija "heat-shock" metode za pripremu kompetentnih stanica i transformacije elektroporacijom. Priprema kompetentnih stanica obuhvaćala je tretiranje stanica u otopini BEDS-a i DTT-a kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Transformacija je provedena tretiranjem smjese stanica kvasca i plazmida električnim impulsom u elektroporatoru (Lin-Cereghino i sur., 2005). Nakon elektroporacije, selekcija transformiranih stanica *P. pastoris* postignuta je naciepljivanjem na krute hranjive podloge sa zeocinom. Na taj način samo transformirane stanice *P. pastoris*, koje sadrže plazmid s genom za rezistenciju na zeocin, mogu narasti na podlozi. Stanice (3 alikvota) su tretirane sa 3 različite koncentracije plazmida (0,5 µg; 5 µg i 10 µg) kako bi se dobio optimalan broj transformanata. Suspenzija kvasca koja je transformirana s 5 µg DNA rezultirala je porastom najvećeg broja transformanata, dok je suspenzija kvasca koja je transformirana s najvećom koncentracijom DNA rezultirala porastom najmanjeg broja kolonija na podlozi iako se u pravilu veća uspješnost transformacije očekuje kod veće koncentracije DNA. Međutim, kako uspješnost transformacije ovisi o različitim faktorima, pogotovo kod transformacije elektroporacijom, ovakav rezultat ne odstupa značajnije od očekivanog. PCR metodom, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode, je zatim provedena provjera prisutnosti fragmenta Ccw12XR u genomu transformanata kvasca, pri čemu je kao pozitivna kontrola korišten plazmid pBSY3ZCcw12XR kojim su stanice transformirane, a kao negativna kontrola su korištene ne transformirane stanice *P. pastoris*. Rezultati su potvrdili prisutnost fragmenta Ccw12XR kod svih ispitanih kolonija transformanata, koji je po veličini bio identičan onome iz originalnog plazmida, dok kod negative kontrole nije umnožen fragment. Dvije od poraslih kolonija transformanata uzgojene su zatim u tekućim hranjivim podlogama sa zeocinom, 0,5% metanolom i 1% sorbitolom kako bi se inducirala ekspresija gena koja kodira za ksiloza reduktazu. Nakon toga, stanice kvasca su razbijene staklenim kuglicama uporabom BeadBug™ uređaja kako bi se odvojila stanična stijenka, na koju je vezana rekombinantna ksiloza reduktaza, od intracelularnog sadržaja. Rekombinantni protein je zatim iz stijenke ekstrahirano pomoću SDS-a i glukanoznom ekstrakcijom. Ekstrakt proteina je zatim analiziran pomoću Western blot metode pri čemu je potvrđena uspješna ekspresija i imobilizacija ksiloza reduktaze na površini stanične stijenke transformanata. Aktivnost ksiloza reduktaze detektirana je provođenjem enzimske reakcije u prisustvu supstrata ksiloze i kofaktora NADPH kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Reducirani NADPH

apsorbira svjetlost pri valnoj duljini od 340 nm. Oksidacija NADPH, do koje dolazi tijekom reakcije, se očituje padom A_{340} budući da oksidirani NADP^+ ne apsorbira svjetlost ove valne duljine. Mjerenjem A_{340} uzoraka koji su sadržavali suspenziju stanica iz dviju različitih kolonija transformanata sa na površini imobiliziranim enzimom (uzorak 1 i 2), te A_{340} slijepe probe, koja nije sadržavala stanice sa imobiliziranim enzimom, uočen je pad apsorbancije kod Uzorka 1 i 2 u odnosu na slijepu probu. Ovaj rezultat ukazuje da reakcijske smjese u uzorcima 1 i 2 sadrže manju koncentraciju NADPH što je posljedica enzimski aktivne ksiloze reduktaze, koja katalizira reakciju redukcije ksiloze u ksilitol i oksidacije NADPH u NADP^+ . Stoga se može zaključiti da je u ispitivanim kolonijama transformanata prisutan aktivni enzim ksiloza reduktaza na staničnoj stijenci *P. pastoris*.

6. ZAKLJUČCI

1. Stanice kvasca *P. pastoris* uspješno su transformirane plazmidom pBSY3ZCcw12XR koji sadrži gen koji kodira za heterolognu rekombinantnu ksiloza reduktazu.
2. Rekombinantni protein ksiloza reduktaza uspješno je eksprimiran i imobiliziran na površini stanične stijenke kvasca *P. pastoris*.
3. Rekombinantna ksiloza reduktaza izložena na površini stanica *P. pastoris* je enzimski aktivna te može katalizirati reakciju redukcije ksiloze u ksilitol uz NADPH kao koenzim.

7. POPIS LITERATURE

Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **98(12)**: 5301-5317.

Berrios J., Flores M.O., Diaz-Barrera A., Martinez I., Cabrera Z. (2017) A comparative study of glycerol and sorbitol as co-substrates in methanol-induced cultures of *Pichia pastoris*: temperature effect and scale-up simulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **44(3)**: 407–11.

Chi D.L., Tut O.K., Milgrom P. (2014) Cluster-randomized xylitol toothpaste trial for early childhood caries prevention. *J. Dent. Child. (Chic)*, **81(1)**: 27-32.

Ciofalo V., Barton N., Kreps J., Coats I., Shanahan D. (2006) Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **45**: 1–8.

Cooper G.M. (2000) Recombinant DNA. The Cell: A Molecular Approach, 2. izdanje. NCBI, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9950/>> Pristupljeno 19. srpnja 2018.

Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y. Madden K.R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, **5**: 3376–85.

Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, **16(1)**: 23-52.

Cregg J.M., Madden K.R., Barringer K.J., Thill G.P., Stillman C.A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, **9**: 1316–1323.

Di Luccio E., Elling R.A., Wilson D.K. (2006) Identification of a novel NADH-specific aldo-keto reductase using sequence and structural homologies. *Biochem. J.*, **400**: 105-114.

- Ellis S.B. Brust P.F. Koutz P.J. Waters A.F. Harpold M.M. Gingeras T.R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, **5**: 1111–1121.
- Emodi A. (1978) Xylitol: its properties and food applications. *Food Technology*, **32**:20-32.
- Guillermond A. (1920) *Zygosaccharomyces pastori*, nouvelle espèce de levures copulation hétérogamique. *Bull. Soc. Mycol. France*, **36**: 203-11.
- Hartner F.S., Ruth C., Langenegger D., Johnson S.N., Hyka P., Lin-Cereghino G.P., Lin-Cereghino J., Kovar K., Cregg J.M., Glieder A. (2008) Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, **36(12)**: 76.
- Hasslacher M., Schall M., Hayn M., Bona R., Rumbold K., Lückl J., Griengl H., Kohlwein S.D., Schwab H. (1997) High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expression Purification*, **11**: 61-71.
- Jez J.M. i Penning T.M. (2001) The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem. Biol. Interact*, **130**: 499-525.
- Koth C.M.M., Payandeh J. (2009) Expression in Yeast. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, **76**: 43-86.
- Koutz P., Davis G.R., Stillman C., Barringer K., Cregg J., Thill G. (1989) Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*, **5(3)**: 167–177.
- Küberl A., Schneider J., Thallinger G.G., Anderl I., Wibberg D., Hajek T., Jaenicke S., Brinkrolf K., Goesmann A., Szczepanowski R., Pühler A., Schwab H., Glieder A., Pichler H. (2011) High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *J. Biotechnology*, **154**: 312-320.

Kumar S., Dheeran P., Taherzadeh M., Khanal S. (2018) Fungal Biorefineries, Springer. str. 124-136.

Lee H. (1998) The Structure and function of yeast xylose (aldose) reductases. *Yeast*, **14(11)**: 977-984.

Lin-Cereghino J., Cregg J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, **24(1)**: 45-66.

Lin-Cereghino J., Wong W.W., Xiong S., Giang W., Luong L.T., Vu J., Johnson S.D., Lin-Cereghino G.P. (2005) Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques*, **38(1)**: 44-48.

Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., Harvey L.M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, **22(4)**: 249–270.

Makinen K.K. (1992) Dietary prevention of dental caries by xylitol-clinical effectiveness and safety. *J. Appl. Nutr.*, **44**: 16-28.

Mattanovich D., Jungo C., Wenger J., Dabros M., Maurer M. (2014) Yeast Suspension Culture. *Industrial Biotechnology, Wiley Online Library*, 678-714.

Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. (2013) *Komagataella kurtzmanii* sp. nov. a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris* based on multigene sequence analysis. *Antonie Leeuwenhoek*, **104(3)**: 339-347.

Nieves L.M., Panyon L.A., Wang X. (2015) Engineering sugar utilization and microbial tolerance toward lignocellulose conversion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **3**: 2-3.

Niu H., Jost L., Pirlot N., Sassi H., Daukandt M., Rodriguez C., Fickers P. (2013) A quantitative study of methanol/sorbitol co-feeding process of a *Pichia pastoris* Mut+/pAOX1-lacZ strain. *Microbial Cell Factories*, **2**: 33.

Phaff H., Miller M., Shifrine M. (1956) The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. *Antonie Leeuwenhoek, Journal of Microbiology*, **22(1)**: 145-161.

Rafiqul I.S.M., Mimi Sakinah A.M. (2012) Processes for the Production of Xylitol – A Review. *Food Reviews International*, 127-156.

Shen W., Xue Y., Liu Y., Kong C., Wang X., Huang M., Cai M., Zhou X., Zahng Y., Zhou M. (2016) A novel methanol-free *Pichia pastoris* system for recombinant protein expression. *Microbial Cell Factories*, **15**: 178.

Tschopp J.F., Brust P.F., Cregg J.M., Stillman C.A., Gingeras T.R. (1987) Expression of the LacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, **15(9)**: 3859–3876.

Ur-Rehman S., Mushtaq Z., Zahoor T., Jamil A., Murtaza M.A. (2015) Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **55(11)**: 1514-1528.

Walsh G. (2010) Biopharmaceutical benchmarks. *Nat. Biotechnol.*, **28**: 917–924.

Woodyer R., Simurdiak M., van der Donk W.A., Zhao H. (2005) Heterologous Expression, Purification, and Characterization of a Highly Active Xylose Reductase from *Neurospora crassa*. *Applied and Environmental Microbiology*. **71(3)**: 1642-1647.

HMDB (2016.) HMDB – Human Metabolome Database,
<<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000098>>, Pristupljeno 7. srpnja 2018.

National Center for Biotechnology Information.
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/xylitol#section=Top>>, pristupljeno 16. kolovoza 2018.

Izjava o izvornosti

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

Marta Spahija

ime i prezime studenta