

Optimizacija sustava za izlaganje heterolognih proteina na površini stanica kvasca putem proteina Pir2

Matičević, Ana

Master's thesis / Diplomski 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:159:551068>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2022.

Ana Matičević

**OPTIMIZACIJA SUSTAVA ZA
IZLAGANJE HETEROLOGNIH
PROTEINA NA POVRŠINI STANICA
KVASCA PUTEM PROTEINA Pir2**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Renate Teparić, te uz pomoć dr.sc. Mateje Lozančić.

Rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta „Biotehnološka primjena ugradnje heterolognih proteina u stanične stijenke kvasaca“. Broj projekta: IP-2019-04-2891, izvor financiranja: Hrvatska zaklada za znanost. Voditelj projekta: prof.dr.sc. Vladimir Mrša.

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Renati Teparić na ukazanom povjerenju, potpori te brojnim savjetima pruženim tijekom izrade ovoga rada kao i dr.sc. Mateji Lozančić na utrošenom vremenu, strpljenju te pomoći pri svladavanju eksperimentalnih metoda. Također, želim zahvaliti i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemiju na svakom savjetu, pomoći te riječima potpore tijekom eksperimentalnog rada.

Od srca zahvaljujem svojim roditeljima i prijateljima koji su mi pružali podršku i motivaciju tijekom svih godina studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

OPTIMIZACIJA SUSTAVA ZA IZLAGANJE HETEROLOGNIH PROTEINA NA POVRŠINI STANICA KVASCA PUTEM PROTEINA Pir2

Ana Matičević, univ. bacc.ing. biotechn., 0058211629

Sažetak: Metoda izlaganja heterolognih proteina na površini stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* alternativa je klasičnim metodama imobilizacije proteina, a temelji se na fuziji gena koji kodira za protein od interesa sa genom koji kodira za neki od proteina stanične stijenke. Optimizacija sustava za izlaganje proteina na površini stanice kvasca u ovome je radu provedena uvođenjem promjena u sekvencu proteina Pir2 te promjenom pozicije proteina od interesa unutar sekvence proteina Pir2. U promatranom sustavu mjerenjem aktivnosti "reporter" enzima β -laktamaze te metodom imunoblota proteina stanične stijenke procijenjena je količina rekombinantnog proteina Pir2bla u staničnoj stijenki. Navedenim metodama promatran je i utjecaj mutacija u endocitozi, korištenjem mutanata *end3* i *end6*, na efikasnost izlaganja rekombinantnog proteina na površini stanice u svrhu daljnje optimizacije sustava za imobilizaciju.

Ključne riječi: *Pir2, stanična stijenka kvasca, izlaganje proteina na površini stanice, rekombinantni proteini, endocitoza*

Rad sadrži: 45 stranica, 21 slika, 9 tablica, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Renata Teparić

Pomoć pri izradi: dr.sc. Mateja Lozančić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Vladimir Mrša (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Renata Teparić (mentor)
3. prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević (član)
4. doc. dr. sc. Bojan Žunar (zamjenski član)

Datum obrane: 11. srpanj, 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

OPTIMISATION OF YEAST SURFACE DISPLAY USING PROTEIN Pir2

Ana Matičević, univ. bacc.ing. biotechn., 0058211629

Abstract: Surface display of enzymes at the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* presents an alternative to chemical immobilization methods. Methods for yeast surface display are based on the fusion of a gene encoding a protein of interest with a gene encoding one of the cell wall proteins. Optimization of the protein surface display system in this paper was performed by introducing changes in the Pir2 protein sequence and changing the position of the reporter protein within the Pir2 protein sequence. In the observed system, the amount of recombinant Pir2bla protein in the cell wall was estimated by measuring the activity of the reporter enzyme β -lactamase and the immunoblot of yeast cell wall proteins. Before mentioned methods were also used to investigate the impact of mutations in endocytosis, by using mutants *end3* and *end6*, on efficiency of surface display system in order to optimize immobilization method.

Keywords: *Pir2, yeast cell wall, yeast surface display, recombinant proteins, endocytosis*

Thesis contains: 45 pages, 21 figures, 9 tables, 49 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Renata Teparić, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Mateja Lozančić, PhD

Reviewers:

1. Vladimir, Mrša, PhD, Full professor (president)
2. Renata, Teparić, PhD, Full professor (mentor)
3. Irena, Landeka Jurčević, PhD, Full professor (member)
4. Bojan, Žunar, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended:. June 11th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. GRAĐA STANIČNE STIJENKE	2
2.2.1. Polisaharidi stanične stijenke	3
2.2.2. Proteini stanične stijenke	3
2.2.2.1. Nekovalentno vezani proteini	4
2.2.2.2. Kovalentno vezani proteini	5
2.4. SUSTAV ZA IZLAGANJE HETEROLOGNIH PROTEINA NA POVRŠINI STANICE KVASCA	8
2.5. ENDOCITOZA	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.2. HRANJIVE PODLOGE, LABORATORIJSKI SOJEVI, PLAZMIDI	13
3.2.1. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i>	13
3.2.2. Hranjiva podloga za indukciju <i>PHO5</i> promotora	14
3.2.3. Laboratorijski sojevi kvasca <i>S.s cerevisiae</i>	15
3.2.4. Plazmidi	16
3.2.4.1. Plazmid pRSII423 PIR2	16
3.2.4.2. Plazmid pRSII423 PIR2bla	16
3.2.4.3. Plazmid pRSII423 PIR2bla A	16
3.2.4.4. Plazmid pRSII423 PIR2bla B	17
3.2.4.5. Plazmid pRSII423 PIR2bla C	18
3.2.4.6. Plazmid pRSII423 PIR2bla D	18
3.2.4.7. Plazmid pRSII423 PIR2bla E	19
3.2.4.8. Plazmid pRSII423 PIR2bla F	19
3.2.4.9. Plazmid pRSII423 PIR2bla G	20
3.2.4.10. Plazmid pRSII423 PIR2bla H	20
3.2.4.11. Plazmid pRSII423 PIR2bla I	21
3.2.4.12. Plazmid pRSII423 PIR2bla J	21
3.3. METODE	22
3.3.1. Transformacija kvasca	22
3.3.2. Uzgoj kvasca uz indukciju <i>PHO5</i> promotora	22
3.3.3. Određivanje aktivnosti β -laktamaze na površini stanica kvasca	22
3.3.4. Određivanje aktivnosti β -laktamaze u hranjivoj podlozi	23
3.3.5. Izolacija proteina stanične stijenke	23
3.3.6. Izolacija proteina iz podloge	24
3.3.7. SDS elektroforeza u poliakrilamidnom gelu	24
3.3.8. Imunoblot	25

4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. VEZANJE KONSTRUKATA A-F U STANIČNU STIJENKU	28
4.2. ISPITIVANJE JAČINE VEZANJA KONSTRUKTA D U STIJENKU	30
4.3. PROVJERA VEZANJA KONSTRUKATA G-J U STANIČNU STIJENKU	32
4.4. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI β -LAKTAMAZE	33
4.5. ISPITIVANJE UTJECAJA MUTACIJA U ENDOCITOZI NA VEZANJE REKOMBINANTNOG PROTEINA Pir2bla U STIJENKU	36
4.6. ISPITIVANJE UTJECAJA MUTACIJE U END6 NA VEZANJE MODIFICIRANIH OBLIKA REKOMBINANTNOG PROTEINA Pir2bla U STIJENKU	39
4.7. IZOLACIJA PROTEINA IZ HRANJIVE PODLOGE	41
5. ZAKLJUČAK	43
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* već se dugi niz godina primjenjuje kao modelni organizam u istraživanju eukariotskih organizama. Kao jednostanični organizam sekvencioniranog genoma, pogodan je za genetičku manipulaciju, a kvaščeva stanična stijenka ima veliki biotehnološki potencijal za razvoj metoda imobilizacije heterolognih proteina na površini stanice. Imobilizacija proteina na površini stanice kvasca (engl. *Yeast Surface Display*) alternativa je klasičnim metodama imobilizacije. Sustav imobilizacije proteina na površini stanice temelji se na fuziji gena koji kodira za protein od interesa i gena koji kodira za neki od proteina stanične stijenke kvasca. Protein od interesa tako se može fuzionirati sa nativnim proteinima stanične stijenke iz porodice GPI-proteina (engl. glycosphosphatidylinositol) ili proteina Pir (engl. **P**roteins with **I**nternal **R**epeats) obitelji, a fuzija se može provesti na N- ili C-terminalnom kraju proteina ili insercijom proteina od interesa unutar sekvence proteina stanične stijenke. Prethodno razvijen sustav imobilizacije temelji se na fuziji gena koji kodira za protein od interesa sa cjelovitim genom koji kodira za Pir2 protein što rezultira velikim rekombinantnim proteinom u kojem je protein od interesa vezan svojim N-terminalnim dijelom na C-terminalni dio Pir2 proteina. Veličina ovakvog rekombinantnog proteina može uzrokovati probleme u smatanju, sekreciji i vezanju proteina u stijenku.

Cilj ovoga rada bio je optimizirati sustav za imobilizaciju proteina na površini stanice delecijom pojedinih dijelova proteina Pir2 te promjenom pozicije proteina od interesa unutar sekvence proteina Pir2. Uz β -laktamazu kao "reporter" enzim, ispitana je efikasnost vezanja tako modificiranih oblika rekombinantnih proteina Pir2bla u staničnu stijenku kvasca kao i njihovo izlučivanje u hranjivu podlogu tijekom uzgoja. Navedeno je ispitano i za mutante u endocitozi, *end3* i *end6*, za koje je u literaturi objavljeno da pokazuju povećanu sekreciju rekombinantnih proteina u hranjivu podlogu tijekom uzgoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* je nepatogeni jednostanični eukariotski organizam koji pripada carstvu Fungi. Uzgaja se pri optimalnoj temperaturi rasta od 28°C do 30°C, a pri uzgoju tolerira visoke koncentracije etanola i nisku razinu kisika. Razmnožava se nespolno, pupanjem, ili spolno, mejozom, a kvašćev genom prvi je sekvencionirani genom eukariotskog organizma. Genom kvasca sadrži oko 5500 gena, a posjeduje nuklearnu genomsku DNA organiziranu u 16 kromosoma. Također, karakteriziraju ga i kratko generacijsko vrijeme, relativno laka genetička manipulacija i jeftin uzgoj. Navedena svojstva čine ga idealnim modelnim organizmom za istraživanja staničnih procesa u eukariotskim organizmima. Velika prednost kvasca kao modelnog organizma je i provođenje posttranslacijskih modifikacija poput glikozilacije što predstavlja veliki potencijal za primjenu kvasca za biotehnošku proizvodnju heterolognih eukariotskih proteina.

2.2. GRAĐA STANIČNE STIJENKE

Stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* je dinamična struktura koja osigurava oblik, stabilnost i zaštitu stanice kvasca od nepovoljnih okolišnih uvjeta poput nagle promjene temperature, pH ili osmotskog tlaka. Budući da predstavlja granicu između stanice i okoline, ima važnu ulogu u komunikaciji stanice s okolinom. Sudjeluje u brojnim signalnim putevima, a narušavanje njezinog integriteta dovodi do pokretanja različitih signalnih puteva koji rezultiraju apoptozom i lizom stanice (Levin, 2005). Primarna uloga stanične stijenke je zaštitna, no unatoč tomu stanična stijenka je dinamična i fleksibilna struktura koja se mijenja u ovisnosti o odvijanju staničnih procesa. Najznačajnije promjene stanične stijenke događaju se prilikom diobe stanice pri čemu je nužno da stanična stijenka osigura preraspodjelu postojećih i sintezu novih građevnih jedinica. Takvi procesi biogeneze i remodeliranja stanične stijenke vrlo su složeni te su pod kontrolom produkata stotina gena pri čemu se troši značajna količina energije (Teparić i sur., 2010). Transmisijskom elektronskom mikroskopijom utvrđeno je kako se stanična stijenka kvasca sastoji od unutrašnjeg i vanjskog sloja. Unutrašnji sloj sastoji se od oko 50% β -1,3-glukana, 5% β -1,6-glukana te 1-2% hitina, a odgovoran je za mehaničku i osmotsku stabilnost dok se vanjski sloj stanične stijenke sastoji od manoproteina koji određuju površinska svojstva (Teparić i Mrša, 2013).

2.2.1. Polisaharidi stanične stijenke

Staničnu stijenku kvasca izgrađuju polisaharidni polimeri β -1,3-glukan i β -1,6-glukan, izgrađeni od glukoze, hitin izgrađen od N-acetilglukozamina i manan izgrađen od manoze. β -1,3-glukan, β -1,6-glukan i hitin izgrađuju unutarnji sloj stanične stijenke, osiguravaju mehaničku i osmotsku stabilnost te definiraju oblik stanice. S druge strane, manan čini polisaharidni dio vanjskog sloja stanične stijenke te ograničava njenu propusnost.

β -1,3-glukan je ravnolančani polimer glukoze nastao povezivanjem približno 1500 glukoznih jedinica u lance. Lanci β -1,3-glukana formiraju strukturu uzvojnice koja osigurava čvrstoću i osmotsku stabilnost stanične stijenke (Lesage i Bussey, 2006). Sintezu β -1,3-glukana katalizira multienzimski kompleks β -1,3-glukan sintaza smješten u staničnoj membrani (Qadota i sur., 1996). β -1,3-glukan je osnovna jedinica na koju se povezuju sve ostale komponente, uključujući β -1,6-glukan. U staničnoj stijenci β -1,3-glukan se kovalentno povezuje sa β -1,6-glukanom i hitinom pri čemu je 40-50% hitina povezano β -1,4 glikozidnom vezom na nereducirajući kraj β -1,3-glukana (Lesage i Bussey, 2006).

β -1,6-glukan je visokorazgranati polimer izgrađen od prosječno 130 glukoznih jedinica uz mjesta grananja na prosječno svakoj petoj glukoznoj jedinici. β -1,6-glukan ima ulogu u povezivanju ostalih komponenata stijenke te stoga stabilizira staničnu stijenku. Na količinu β -1,6-glukana u staničnoj stijenci utječu različiti proteini lokalizirani u Golgijevom tijelu, endoplazmatskom retikulumu i staničnoj membrani (Aimanianda i sur., 2009). Hitin je linearni polimer izgrađen od približno 190 monomernih jedinica N-acetilglukozamina, a u sintezi hitina sudjeluju tri enzima hitin sintaze. Dva antiparalelna hitinska lanca povezuju se međusobno vodikovim vezama te se nereducirajućim krajevima vežu za β -1,3-glukan ili β -1,6-glukan. Međusobnim povezivanjem sintetiziranih lanaca hitina vodikovim vezama nastaju hitinske fibrile vrlo visoke čvrstoće koja dodatno učvršćuju strukturu stanične stijenke (Bowman i Free, 2006). Manan je razgranati polisaharid manoze koji čini ugljikohidratni dio manoproteina u vanjskom sloju stanične stijenke.

2.2.2. Proteini stanične stijenke

Vanjski sloj stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* sastavljen je uglavnom od manoproteina koji zauzimaju i do 50% suhe tvari stanične stijenke kvasca (Brown i Catley, 1992; Bowman i Free, 2006). Proteini stanične stijenke ubrajaju se u sekretorne proteine koji prolaze glikozilaciju. Obzirom na tip glikozilacije, proteini se dijele na proteine s N-

glikozilacijom ostataka asparagina te proteine s *O*-glikozilacijom ostataka serina ili treonina. Obje glikozilacije esencijalne su za rast stanica kvasca, a značajni poremećaji glikozilacije na stanicu djeluju letalno (Lesage i Bussey, 2006). Većina proteina stanične stijenke kvasca je i *N*-*i O*-glikozilirana, a dugački lanci *N*-glikoziliranih manoproteina prekrivaju površinu stanice te su prva točka interakcije većine molekula ili stanica koje dolaze u neposrednu blizinu stanice kvasca. Za razliku od bakterija kod kojih je osnovna funkcija proteina interakcija stanica s okolinom, proteini stijenke kvasca često imaju enzimsku aktivnost prema supstratima u staničnoj stijenci (Teparić i Mrša, 2013). Proteini se tako u velikom broju slučajeva pojavljuju kao obitelji proteina koje imaju vrlo slične sekvence te se smatra da imaju iste funkcije (De Groot i sur., 2005). No, pripadnici iste obitelji proteina različito su regulirani što sugerira kako obavljaju jednake funkcije, ali pri različitim uvjetima.

Proteini stanične stijenke razlikuju se i prema načinu vezanja u stijenku. Glavna komponenta stijenke na koju se proteini povezuju različitim mehanizmima je β -1,3-glukan. Prema tome, proteini se dijele na one koji se na β -1,3-glukan vežu nekovalentno, pretežno vodikovim vezama (Scw – engl. Soluble Cell Wall Proteins) i proteine koji se na β -1,3-glukan vežu kovalentno, bilo to direktno preko Pir ponavljanja ili preko β -1,6-glukana.

2.2.2.1. Nevalentno vezani proteini

Nevalentno vezani proteini ravnomjerno su raspoređeni u staničnoj stijenci te su pretežno *O*-glikozilirani (Capellaro i sur., 1998). Iako njihova fiziološka uloga nije u potpunosti razjašnjena, analizom sekvenci prethodno opisanih nevalentno vezanih proteina uočen je visok stupanj homologije primarne strukture nekih od njih s transglikozidazama (Teparić i Mrša, 2013). Stoga se pretpostavlja kako dio nevalentno vezanih proteina stanične stijenke ima ulogu u pregradnji β -glukana u stijenci tijekom životnih procesa koji podrazumijevaju promjenu stanične stijenke kao što su rast, pupanje, sporulacija i parenje (Teparić i sur., 2010).

Izolacija nevalentno vezanih proteina iz stanične stijenke kvasca provodi se tretmanom vrućim SDS-om (natrij dodecil sulfatom) uz dodatak β -merkaptetoetanolu (Mrša i sur., 1997). Drugi način izolacije nevalentno vezanih proteina je prekonoćni tretman stijenki s 2 mM ditiotreitolum pri 4°C (Cappellaro i sur., 1998), no efikasnost ovakve izolacije značajno je manja u usporedbi s prethodno opisanim postupkom. U tablici 1 prikazan je popis do sada poznatih nevalentno vezanih proteina stanične stijenke.

Tablica 1. Popis do sada poznatih nekovalentno vezanih proteina stijenke kvasca

PROTEIN	FIZIOLOŠKA ULOGA
Bgl2 /Scw9	Endo- ili trans-glukozidaza
Cts1/Scw2	Endohitinaza
Dse4/Eng1	Glukanaza
Exg1/Scw6/Bgl1	Egzo- β -1,3-glukanaza
Scw10	Potencijalna glukanaza
Scw11	Potencijalna glukanaza
Scw4	Potencijalna glukanaza
Sun4/Scw3	Sudjeluje u septaciji
Knh1	Sudjeluje u sintezi β -1,6-glukana
Kre9	Sudjeluje u sintezi β -1,6-glukana

2.2.2.2. Kovalentno vezani proteini

Kovalentno vezani proteini čine manji broj manoproteina koji zaostaju u stijenci nakon izolacije nekovalentno vezanih proteina. Dije se na proteine koji se na β -1,6-glukan vežu preko glikozilfosfatidilinozitolonog ostatka (GPI proteini) i Pir proteine (en. **Proteins with Internal Repeats**) koji se za β -1,3-glukan vežu preko karakterističnih PIR ponavljanja (Ecker i sur., 2006).

GPI proteini vezani su na β -1,6-glukan stanične stijenke kvasca kovalentno preko ostatka GPI sidra. Na N-terminalnom kraju sadrže signalnu sekvencu koja ih upućuje u endoplazmatski retikulum, dok na C-terminalnom kraju sadrže sekvencu koja služi kao signal za dodatak GPI sidra koja se uklanja, a na njeno mjesto transamidacijom se veže GPI sidro. Vežanje GPI sidra odvija se u endoplazmatskom retikulumu, a proteini se zatim prenose u Golgijev aparat i staničnu membranu odakle se translociraju reakcijom transglikozilacije te vežu na β -1,6-glukan (Orlean, 2012). Iz stanične stijenke izoliraju se tretmanom β -1,3-glukanazama ili β -1,6-glukanazama. Intenzivno su N- i/ili O-glikozilirani, a njihova funkcija nije u potpunosti razjašnjena. Pretpostavlja se kako sudjeluju u biosintezi i remodeliranju stanične stijenke, određuju površinsku hidrofobnost i antigenost (Klis i sur., 2002). Poznato je pet proteina GPI skupine koji su pripadnici GAS obitelji te imaju glukan-remodelirajuću aktivnost. Skupini GPI proteina pripadaju i egzonukleaza Exg2 te transglikozidaze Crh1 i Utr2/Crh2 koje su odgovorne za povezivanje β -1,3-glukana s hitinom kao i aglutinini i proteini

iz FLO i TIR obitelji. Gas1 protein jedan je od glavnih manoproteina vezanih na površinu stanice koji sudjeluju u morfogenezi, odvajanju stanica tijekom pupanja i sintezi stanične stijenke (Nuoffer i sur., 1991.). Skupini GPI proteina pripadaju i aglutinini koji sudjeluju u interakciji između stanica te proteini iz obitelji FLO, tzv. flokulini, koji imaju ulogu u flokulaciji. Do sada poznati GPI-proteini prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Popis do sada poznatih GPI-proteina stanične stijenke kvasca

PROTEIN	FIZIOLOŠKA ULOGA	PROTEIN	FIZIOLOŠKA ULOGA
Aga1, Aga2	Podjedinice α -aglutinina	Flo1/Flo2/Flo4, Flo5, Flo9-11	Flokulini
Sag1/Aga1	Nepoznata uloga	Pst1/Hpf2	Izlučuje se u protoplastima
Ccw12	Nepoznata uloga	Sed1	Nepoznata uloga
Cwp1-2	Nepoznata uloga	Spi1	Povećana ekspresija u stacionarnoj fazi
Dan1/Ccw13	<u>Uloga u anaerobiozi</u>	Sps2, Sps22	Uloga u sporulaciji
Dan4	<u>Uloga u anaerobiozi</u>	Tip1	Nepoznata uloga
Dse2	Manoprotein eksprimiran u stanici kćeri	Tir1-4	Uloga u anaerobiozi
Ecm33	Nepoznata uloga	Utr1, Utr2/Crh2	Hitin-transglikozilaza
Egt2	Endoglukanaza	Gas1, Gas3, Gas5	B-1,3-glukoziltransferaza
Fig2	Adhezin	Yps7	Aspartatna proteaza
Fit1-3	Sudjelovanje u transportu željeza		

Pir proteini nazvani su prema motivu unutarnjih ponavljanja preko kojih se ostvaruje kovalentna veza sa stijenkom, a poznata su četiri Pir proteina pripadnika Pir obitelji u *S. cerevisiae* (Mrša i sur., 1997). Četiri Pir proteina međusobno su vrlo slični, a njihova opća struktura sastoji se od signalnog peptida, pro-peptida koji se procesira Kex2 proteazom u Golgijevom aparatu, konzerviranog C-terminalni kraja kojeg karakteriziraju cisteinski ostaci te različitog broja ponavljajućih sekvenci prema kojima su dobili ime (Andres i sur., 2005). Ponavljajuća sekvenca je Ser-Gln-Ile-Gly-Asp-Gly-Gln-Ile-Gln-Ala, a sadrži tri glutaminska ostatka. Najznačajniju ulogu za kovalentno povezivanje ima drugi po redu glutaminski ostatak unutar ponavljajuće sekvence (Ecker i sur., 2006). Točan mehanizam formiranja veze između Pir proteina i polisaharida stijenke nije u potpunosti razjašnjen, no pretpostavlja se da nastaje esterska veza između karboksilne grupe deaminiranog pobočnog ogranka glutamina i

hidroksilne grupe šećera stijenke (Ecker i sur., 2006). Nastala esterska veza nestabilna je u lužnatim uvjetima. Stoga se Pir proteini iz stanične stijenke mogu izolirati tretmanom stijenki sa NaOH ili β -glukanazom (Mrša i sur., 1997). Istraživanja ekspresije i svojstava Pir proteina u različitim mutantima pokazala su kako Pir proteini imaju ulogu u održavanju integriteta stanične stijenke. Inaktivacija gena koji kodiraju za sva četiri Pir proteina rezultira nepravilnim oblikom stanice, rastom u nakupinama, promjenom morfoloških svojstava te povećanom osjetljivošću prema inhibitorima sinteze stanične stijenke (Mrša i sur., 1997), a ekspresija PIR gena pojačana je u uvjetima temperaturnog stresa (Russo i sur., 1993). Pir proteini stanične stijenke kvasca *S.cerevisiae* opisani su u tablici 3.

Tablica 3. Popis Pir proteina stijenke kvasca *S.cerevisiae*

PROTEIN	FIZIOLOŠKA ULOGA
Pir1	Paralog Pir5, nepoznata uloga
Pir2/Hsp150	Paralog Pir3. Sudjeluje u odgovoru na temperaturni šok
Pir3	Paralog Pir2, nepoznata uloga
Pir4/Cis3	Nepoznata uloga
Pir5	Paralog Pir1, nije dokazano prisustvo proteina u stanici

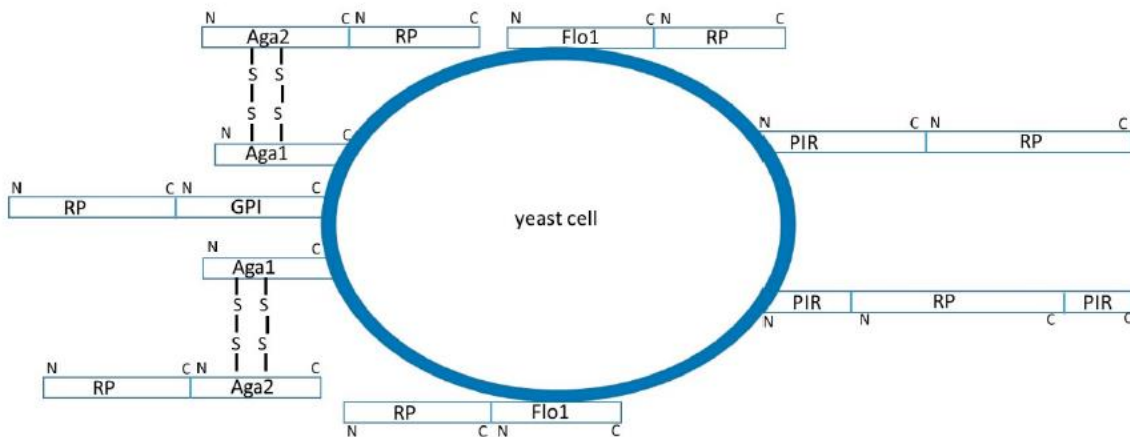
Osim preko PIR ponavljanja, prema podacima objavljenim u literaturi postoji mogućnost da se Pir proteini u staničnu stijenku mogu vezati preko svog C-terminalnog kraja u što su uključeni cisteinski ostaci koji sudjeluju u formiranju intermolekulskih disulfidnih mostova (Castillo i sur., 2003). Isto istraživanje pokazalo je kako delecija ponavljanja unutar Pir4 onemogućava njegovo vezanje u staničnu stijenku vezom nestabilnom u lužnatom, ali se Pir4 i dalje mogao vezati u stijenku disulfidnim mostovima ako prethodno nije bio procesiran Kex2 proteazom.

2.4. SUSTAV ZA IZLAGANJE HETEROLOGNIH PROTEINA NA POVRŠINI STANICE KVASCA

Metode imobilizacije enzima već se dugi niz godina primjenjuju u različitim industrijskim granama, od prehrambene industrije pa sve do kemijske i farmaceutske. Pri tome se najčešće primjenjuju klasične metode imobilizacije koje uključuju kemijski tretman enzima. Enzimi u ulozi biokatalizatora imaju ključnu ulogu u provođenju reakcija, a metode imobilizacije omogućuju višekratnu uporabu, jednostavnu regeneraciju te niže troškove procesa. Sustav izlaganja heterolognih proteina na površini stanice kvasca predstavlja alternativu klasičnim metodama imobilizacije. Metode imobilizacije na površini stanica zahtijevaju manje vremena i manje su kompleksne za provedbu, a njihovim korištenjem izostaju skupi koraci pročišćavanja enzima. Jednom modificirane stanice nastavljaju se dijeliti što omogućuje stalnu proizvodnju rekombinantnih proteina, a stanice se koriste dulje u usporedbi s pročišćenim enzimima. Veliki biotehnološki potencijal u razvoju sustava imobilizacije pokazuje kvasac *S. cerevisiae* koji zbog svog GRAS statusa (engl. **Generally Regarded As Safe**) osigurava sigurnost i nepatogenost sustava potrebnu u industrijama poput prehrambene i farmaceutske. Ostale prednosti kvasca su laka genetička manipulacija, mogućnost pravilnog smatanja i glikozilacije eksprimiranih heterolognih eukariotskih proteina, kao i mogućnost uzgoja stanica do visoke gustoće u jeftinoj hranjivoj podlozi. Rekombinantni proteini se mogu vezati na površinu stanične stijenke kvasca čime se postiže njihova imobilizacija regularnim staničnim procesima (Teparić i sur., 2010). Takva imobilizacija je prirodna i odvija se pri normalnim staničnim uvjetima, a stanica kvasca istovremeno služi kao nosač i producent rekombinantnog proteina (Lozančić i sur., 2019). S druge strane, neki od nedostataka ove metode uključuju posttranslacijske modifikacije proteina poput *N*- ili *O*-glikozilacije koje prethodno nisu postojale na proteinu kojeg želimo imobilizirati te nedovoljan kapacitet stanice za izlaganje proteina za potrebe biotehnološke industrije.

Dobar sustav za izlaganje heterolognih proteina na površini stanice kvasca sastoji se od proteina nosača, koji osigurava vezanje rekombinantnog proteina u staničnu stijenku, fuzioniranog s proteinom od interesa (Lozančić, 2021). Osim čvrstog kovalentnog vezanja u stijenku, sustav mora osigurati prolazak proteina kroz sekretorni put, uspješno zauzimanje konformacije kao i stabilnost rekombinantnog proteina. Strategije imobilizacije proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae* uključuju fuziju proteina na *N*- ili *C*-terminalnom kraju proteina od interesa ili inserciju proteina od interesa unutar sekvence proteina koji se kovalentno veže u stijenku (slika 1). Heterologni proteini u sustavu za izlaganje na površini

stanice kvasca mogu se fuzionirati s GPI vezanim proteinima ili Pir proteinima. Odabir načina fuzioniranja heterolognog proteina od interesa iznimno je bitan jer utječe na efikasnost imobilizacije, posttranslacijske modifikacije i aktivnost heterolognog proteina (Teparić i sur., 2010).



Slika 1. Sustavi sidrenja proteina u staničnu stijenku kvasca : GPI - protein stanične stijenke iz porodice GPI proteina ; PIR - protein stanične stijenke iz Pir obitelji proteina; RP - protein kojeg treba usidriti ; Aga1, Aga2, Flo1 - pojedinačni proteini stanične stijenke (prema Lozančić i sur., 2019)

GPI vezani proteini koji se najčešće upotrebljavaju u svrhu imobilizacije u kvascu *S.cerevisiae* su α -aglutinin, a-aglutinin i Flo1. Aglutinini su kao proteini uključeni u parenje kvasca smješteni na vanjskom dijelu stijenke, pogodni za primjenu metoda imobilizacije (Lipke i Kurjan, 1992). Imobilizacija proteina od interesa s α -aglutininom provodi se preko C-terminalnog dijela proteina od interesa na koji se nastavlja N-terminalni dio α -aglutinina. Sustav imobilizacije s a-aglutininom kompleksniji je zbog postojanja dvije podjedinice proteina, Aga1 i Aga 2, pri čemu se Aga2 disulfidnim mostovima veže na Aga1. Aga1 se preko GPI sidra veže u staničnu stijenku, a protein od interesa fuzionira se preko svog C- ili N- terminalnog kraja s Aga2 (Liu i sur., 2010a). Aglutininski sustavi imobilizacije uspješno su primijenjeni za izlaganje β -galaktozidaza (Schreuder i sur., 1993), glukoamilaza (Murai i sur., 1997), β -glukozidaza (Kaya i sur., 2008) i drugih enzima. Flokulin Flo1 na GPI sidro je vezan preko svog C-terminalnog dijela, a prilikom imobilizacije proteina provodi se fuzija C-terminalnog dijela proteina od interesa sa N-terminalnim dijelom proteina Flo1 (Matsumoto i sur., 2002). Neki od primjera sustava za izlaganje proteina pomoću Flo1 su glukoamilaze (Sato i sur., 2002)

te lipaze iz *Rhizopus oryzae* (Matsumoto i sur., 2002) i *Pseudomonas fluorescens* (Jiang i sur., 2008). Unatoč uspješnim primjerima fuzije željenih proteina s GPI proteinima, metoda imobilizacije preko GPI proteina nije pogodna za enzime čije je aktivno mjesto blizu C-terminalnog kraja enzima. Stoga su razvijeni sustavi imobilizacije pomoću Pir proteina.

Pir proteini vežu se u staničnu stijenku kvasca kovalentno preko glutaminskih ostataka unutar PIR ponavljanja na N-terminalnom dijelu proteina. Metoda imobilizacije preko Pir proteina najčešće koristi vezanje N-terminalnog dijela proteina od interesa sa C-terminalnim dijelom Pir proteina. Ovakav način imobilizacije posebno je pogodan za enzime čije se aktivno mjesto nalazi bliže C-terminalnom kraju sekvence proteina jer osigurava zadržavanje enzimske aktivnosti te stabilnost enzima. No, istraživanjima je pokazano kako se Pir proteini u staničnu stijenku potencijalno mogu vezati i preko cisteinskih ostataka na C-terminalnom dijelu koji sudjeluju u stvaranju intermolekulskih disulfidnih mostova (Castillo i sur., 2003). Istim istraživanjem je pokazano kako delecija ponavljanja unutar proteina Pir4 onemogućava vezanje u stijenku vezom koja je nestabilna u lužnatim uvjetima, no vezanje proteina i dalje je moguće disulfidnim mostovima ukoliko protein nije prethodno proteolitički procesiran s Kex2. Navedene spoznaje dovele su do razvoja dvije nove strategije imobilizacije s Pir proteinima. Prva strategija uključuje fuziju preko N-terminalnog dijela Pir proteina pri čemu se konstrukt sastoji od signalne sekvence fuzionirane na N-terminalni kraj proteina od interesa iza kojeg slijedi Pir protein koji ne sadrži niti signalnu sekvencu niti pro-regiju koja se inače procesira Kex2 proteazom (Tanaka i sur., 2012). Druga strategija uključuje fuziju gena od interesa unutar gena koji kodira za Pir protein pri čemu se koriste dva od tri restrikcijska mjesta u proteinu Pir4 (Andrés i sur., 2005).

Strategija insercije proteina od interesa unutar sekvence proteina koji se kovalentno veže u stijenku koristi se rjeđe od metoda imobilizacije na C- ili N-terminalnom kraju. Neki od primjera uspješne imobilizacije ovom metodom uključuju imobilizaciju tri glikozil-transferaze (α -1,2-galaktoziltransferaze, α -1,2-manoziltransferaze i α -1,3-manoziltransferaze) u Pir1 odnosno Pir2 pri čemu su sva tri enzima uspješno imobilizirana na površini stanice kvasca, a uz to su zadržali svoje aktivnosti. Nadalje, pokazano je kako dva fuzijska proteina, u ovom slučaju dvije različite manoziltransferaze, mogu istovremeno eksprimirati i biti izložene na površini stanice (Abe i sur., 2003). Drugi primjer insercije proteina je fuzija dvije glikozil-transferaze sisavaca za proizvodnju specifičnih oligosaharida u staničnoj stijenci kvasca (Salo i sur., 2005). Specifični oligosaharidi koriste se u medicini za liječenje upala uzrokovanih

odbacivanjem organa i drugih upalnih procesa u tijelu. Vežanje specifičnih oligosaharida na selektive inhibira adheziju leukocita na endotelne stanice i smanjuje oštećenje tkiva. Još jedan primjer uspješne insercije proteina od interesa unutar sekvence proteina je insercija gena koji kodira za ksilanazu A iz *Bacillus sp.* BP-7 u kodirajuću regiju gena *PIR4* iza PIR ponavljajuće sekvence ili na C-terminalnom kraju (Andrés i sur., 2005). No, ukoliko u fuziji nedostaje PIR ponavljajuća sekvenca ili C-terminalni dio proteina Pir4, proizvedena ksilanaza izlučuje se u hranjivu podlogu. Stoga je ovom metodom moguće usmjeravanje ksilanaze u staničnu stijenku kvasca ili hranjivu podlogu, ovisno o potrebama industrijskih procesa.

Većina sustava za izlaganje na površini stanice razvijena je za kvasac *S.cerevisiae*, no posljednjih godina sa porastom primjene sustava imobilizacije u različitim područjima, sve je veći interes za razvoj sustava imobilizacije u drugim vrstama kvasaca koje bi mogle eliminirati neke nedostatke kvasca poput prekomjerne *N*- ili *O*-glikozilacije pojedinih proteina koja potencijalno negativno djeluje na aktivnost proteina koji u nativnoj formi nije glikoziliran na taj način. Osim toga, neke vrste kvasaca mogu rasti u ekstremnim uvjetima što smanjuje industrijske potrebe za sterilnost sustava, mogu imati druge tipove glikozilacije koji su pogodniji za određene proteine te veći kapacitet ugradnje heterolognih proteina u staničnu stijenku. Najveći broj novih sustava za izlaganje proteina na površini stanice razvijen je za kvasac *Pichia pastoris* koji ima smanjenu glikozilaciju u odnosu na *S. cerevisiae*. Ostali kvasci za koje su razvijeni sustavi za izlaganje proteina na površini stanice su *Yarrowia lipolytica* koji ima GRAS status, a može metabolizirati hidrofobne supstrate poput masti i ulja te rasti na masnim kiselinama kao jedinom izvoru ugljika (Rodrigues i Pais, 2000), *Kluyveromyces marxianus* koji je termotolerantni kvasac te može rasti na velikom broju različitih jeftinih supstrata (Yanase i sur., 2010), a veliki potencijal pokazuje i *Shizosaccharomyces pombe* čije su zanimljive metaboličke karakteristike dobro istražene (Tanaka i sur., 2013).

2.5. ENDOCITOZA

Endocitoza je mehanizam kojim eukariotske stanice unose molekule iz okolne hranjive podloge deformacijom stanične membrane. Uvrtačanjem membrane nastaju endosomi koji sadrže molekule unesene iz okoline u stanicu. Funkcionalni aspekti endocitoze nisu ograničeni samo na unos nutrijenata te imaju važnu ulogu u evolucijski konzerviranim procesima poput regulacije aktivnosti membranskih proteina, pokretljivosti stanica te mitoze (Canton i Battaglia, 2012). Heterologni proteini eksprimirani u kvascu *S. cerevisiae* mogu se izlučiti u hranjivu podlogu ili zaostati u citoplazmi (Porro i sur., 2005), a proteini koji sadrže signalnu sekvencu

koja ih usmjerava u sekretorni put jednostavnije se izoliraju i pročišćavaju (Liu i sur., 2010b). Sekretorni put u kvascu je strogo reguliran, a proteini koji sadrže signalnu sekvencu za upućivanje u pojedine organele ili izvanstanični prostor sintetiziraju se na ribosomima vezanim za endoplazmatski retikulum u koji se i prenose kotranslacijski (Anelli i sur., 2008). Iz endoplazmatskog retikuluma izlaze samo pravilno smotani proteini koji zatim odlaze u Golgijev aparat gdje se provode daljnje modifikacije poput glikozilacije proteina. Heterologni proteini nakon izlaska iz Golgijevog aparata mogu ući u egzocitozni put nakon čega se u stanicu mogu vratiti endocitozom prije difuzije kroz staničnu stijenku (Kübler i sur., 1993). Problemi povezani sa sekrecijom proteina u posljednjem se desetljeću rješavaju metodama genetičkog inženjerstva. Istraživanja su pokazala kako veliku ulogu u endocitozi kod kvasca igra aktinski citoskelet (Kübler i sur., 1993), a detektiran je protein End3 koji igra važnu ulogu u koraku endocitoze kojim se unose molekule u stanicu te formira citoskelet (Benedetti i sur., 1994). Drugo istraživanje pokazalo je kako mutacije proteina End6 uzrokuju delokalizaciju aktina čime je blokiran korak unosa molekula u stanicu tijekom endocitoze (Munn i sur., 1995).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- agar, kvašičev ekstrakt – Biolife (Milano, Italija)
- agaroz, N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), akrilamid, β -merkaptotanol, N-dodecilsulfat (SDS), histidin, kalcijev klorid dihidrat, nitrocefim – SigmaAldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- pepton, BactoTryptone, kvašičeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) - BD Biosciences (Franklin Lakes, SAD)
- kalij klorid, kalij-dihidrogenfosfat – Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- amonijev persulfat (APS), N,N' –metilenbisakrilamid, Triton X-100 – Fluka (Buch, Švedska)
- D (+) glukoza bezvodna – Lach-Ner (Brno, Češka)
- uracil, leucin, triptofan, kalijev fosfat – Acros Organics (Antwerpen, Belgija)
- ECL otopine za razvijanje blota – Bio-Rad (Hercules, SAD)
- obojeni standardi za proteinsku elektroforezu – New England Biolabs (Ipswich, SAD)
- standardi za proteinsku elektroforezu (LMV), nitrocelulozna membrana – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- Ponceau S – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- anti-HA peroksidaza antitijela – Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Njemačka)

Ostale kemikalije korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od standardnih proizvođača te su analitičke čistoće.

3.2. HRANJIVE PODLOGE, LABORATORIJSKI SOJEVI, PLAZMIDI

3.2.1. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*

Stanice kvasca *S. cerevisiae* uzgajane su submerzno u selektivnoj YNB hranjivoj podlozi. Tekuća YNBP podloga priprema se otapanjem u deioniziranoj vodi 6,7 g/L YNB (Yeast Nitrogen Base, bez aminokiselina), 2 g/L smjese vitamina i aminokiselina („drop out“, sastav prikazan u tablici 4.) uz dodatak 1 g/L kalijevog dihidrogen fosfata. Ovisno o auksotrofnosti soja, u podlogu se dodaju histidin (80 mg/L), uracil (80 mg/L), triptofan (80 mg/L) i leucin (160mg/L). Hranjive podloge se nakon pripreme steriliziraju autoklaviranjem

pri 121°C i tlaku 1 atm. Neposredno prije naciepljivanja kvasaca, u tekuću podlogu dodaje se glukoza u konačnoj koncentraciji 2%.

Tablica 4. Sastav "drop-out" smjese

adenin	3,0 g	L-metionin	2,0 g
L-arginin	2,0 g	L-fenilalanin	2,0 g
L-asparagin	2,0 g	L-prolin	2,0 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g	L-serin	6,0 g
L-cistein	2,0 g	L-treonin	2,0 g
L-glutamin	2,0 g	L-tirozin	2,0 g
L-glutaminska kiselina	2,0 g	L-valin	2,0 g
L-glicin	2,0 g	p-aminobenzojeva kiselina	0,2 g
L-izoleucin	2,0 g	inozitol	2,0 g

3.2.2. Hranjiva podloga za indukciju *PHO5* promotora

Hranjiva podloga bez fosfata priprema se otapanjem sastojaka navedenih u tablici 5 u 480 mL deionizirane vode, a zatim se u smjesu doda 1 mL otopine elemenata u tragovima (500 puta koncentrirane) čiji je sastav opisan u tablici 6. Prije sterilizacije, dodatkom koncentrirane HCl podešava se pH vrijednost podloge na pH=5,5. Neposredno nakon sterilizacije, u podlogu se dodaju otopina riboflavina (tablica 7) i otopina biotina (tablica 8) sterilizirane filtracijom.

Tablica 5. Sastav Wickerhamove sintetske minimalne podloge

KCl	1 g/L
Asparagin	2 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g/L
NaCl	0,25 g/L
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,25 g/L
Na – citrat	5,882 g/L
„drop-out“	2 g/L
Elementi u tragovima 500x	1 mL

Tablica 6. Sastav otopine elemenata u tragovima

Borna kiselina	0,25 g/L
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,02 g/L
KJ	0,05 g/L
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,1 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	0,1 g/L
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g/L

Tablica 7. Sastav otopine riboflavina

Riboflavin	0,05 g/L
p-aminobenzojeva kiselina	0,05 g/L
Inozitol	0,5 g/L

Tablica 8. Sastav otopine biotina

Biotin	0,02 g/L
Ca – pantotenat	4 g/L
Niacin (nikotinska kis.)	4 g/L
Piridoksal –HCl	4 g/L
Tiamin – HCl	4 g/L
Folna kiselina	0,02 g/L

3.2.3. Laboratorijski sojevi kvasca *S. cerevisiae*

Tijekom eksperimentalnog rada korišteni su laboratorijski sojevi kvasca *S. cerevisiae* prikazani u tablici 6.

Tablica 9. Laboratorijski sojevi kvasca korišteni tijekom eksperimentalnog rada

Soj kvasca	Genotip
BY4741 <i>wt</i>	Mat a; <i>HIS3</i> Δ1; <i>leu2</i> Δ0; <i>met15</i> Δ0; <i>ura3</i> Δ0
BY4741 <i>end3</i>	Mat a; <i>HIS3</i> Δ1; <i>leu2</i> Δ0; <i>met15</i> Δ0; <i>ura3</i> Δ0; YNL084c::kanMX4
BY4741 <i>end6</i>	Mat a; <i>HIS3</i> Δ1; <i>leu2</i> Δ0; <i>met15</i> Δ0; <i>ura3</i> Δ0; YCR009Yc::kanMX4

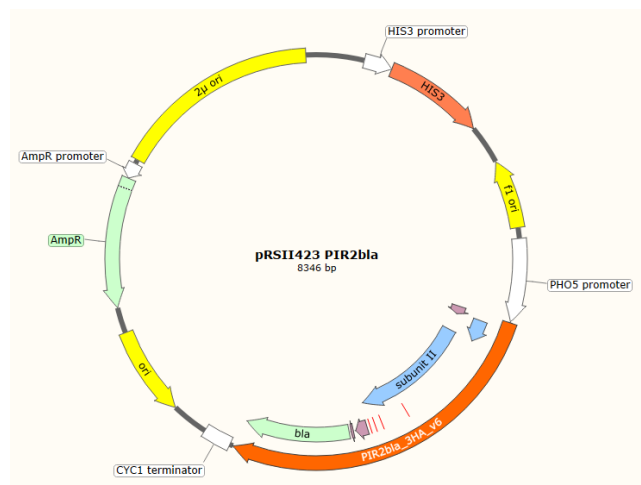
3.2.4. Plazmidi

3.2.4.1. Plazmid pRSII423 PIR2

Plazmid pRSII423 *PIR2* sadrži nativni gen koji kodira za protein *PIR2* čija je ekspresija pod kontrolom *PHO5* promotora. Na C-terminalnom kraju proteina nalaze se His-oznaka i HA-oznaka koje prepoznaju specifična antitijela. Seleksijski markeri prisutni na plazmidu su AmpR i *HIS3*.

3.2.4.2. Plazmid pRSII423 *PIR2bla*

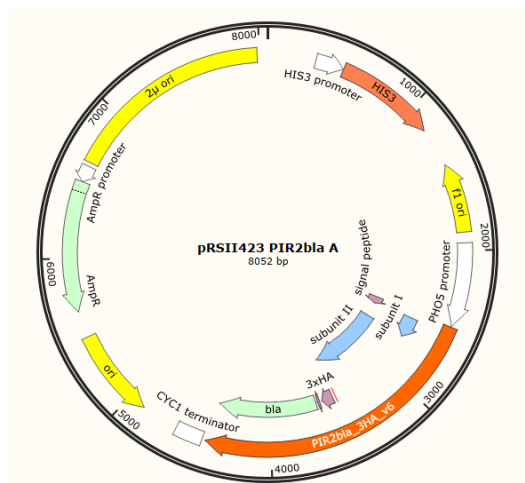
Plazmid pRSII423 *PIR2bla* sadrži nativni gen *PIR2* fuzioniran sa genom *bla* koji kodira za bakterijsku β -laktamazu. Ekspresijom *PIR2bla* gena nastaje rekombinantni protein Pir2bla koji se svojim N-terminalnim dijelom kovalentno veže u staničnu stijenku, a enzim β -laktamaza služi kao "reporter" protein u promatranom sustavu imobilizacije. Gen *AmpR* služi kao seleksijski marker u bakteriji *E. coli*, dok je gen *HIS3* seleksijski marker u stanicama kvasca. Ekspresija gena pod kontrolom je *PHO5* promotora koji je induciran u uvjetima nedostatka fosfata. Na C-terminalnom kraju nalaze se His- i HA-oznake koje prepoznaju specifična antitijela. Mapa plazmida prikazana je na slici 2.



Slika 2. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla*

3.2.4.3. Plazmid pRSII423 *PIR2bla* A

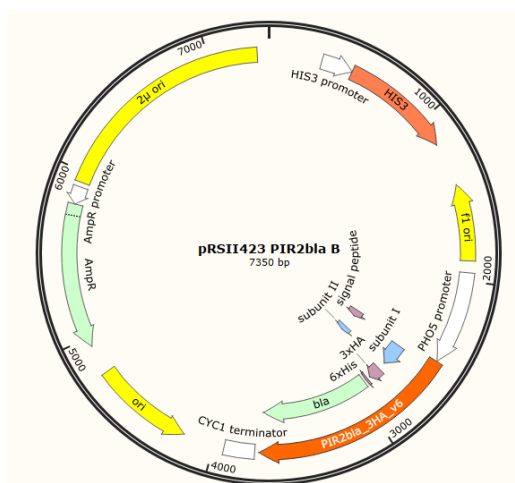
Plazmid pRSII423 *PIR2bla* A sadrži gen *PIR2* u kojemu je deletirano tri od četiri cisteinska ostatka na C-terminalnom kraju. Na C-terminalnom kraju nalaze se i His- te HA-oznake koje prepoznaju specifična antitijela. Na gen *PIR2* fuzioniran je gen *bla*, a ekspresija fuzioniranog gena pod kontrolom je *PHO5* promotora. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 3.



Slika 3. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla A*

3.2.4.4. Plazmid pRSII423 *PIR2bla B*

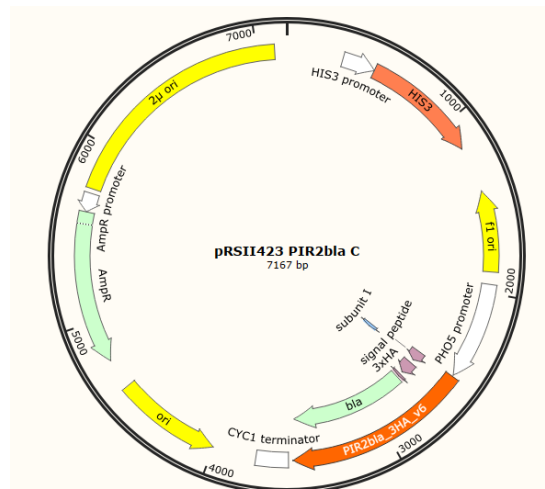
Plazmid pRSII423 *PIR2bla B* sadrži gen *PIR2* u kojemu je deletirano devet od deset PIR ponavljajućih sekvenci te C-terminalnog dijela gena *PIR2* uključujući sve cisteinske ostatke. Na C-terminalnom kraju nalaze se i His- te HA-oznaka koje prepoznaju specifična antitijela. Na gen *PIR2* fuzioniran je gen *bla*, a ekspresija fuzioniranog gena pod kontrolom je *PHO5* promotora. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 4.



Slika 4. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla B*

3.2.4.5. Plazmid pRSII423 PIR2bla C

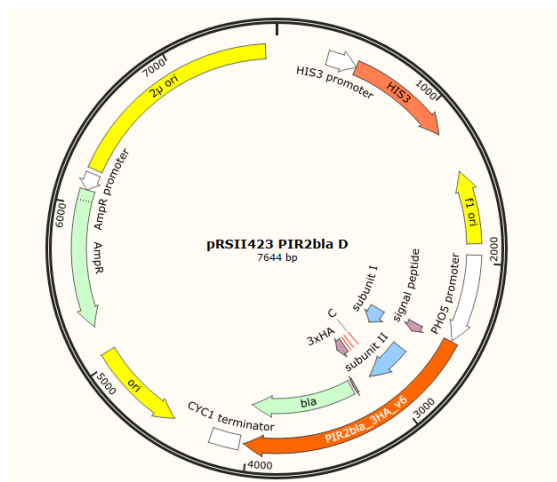
Plazmid pRSII423 *PIR2bla C* sadrži gen *PIR2* u kojemu je deletirana većina podjedinice I te cijela podjedinica II koja uključuje sva PIR ponavljanja i cisteine, a očuvani su signalni peptid, HA- i His-oznake. Na gen *PIR2* fuzioniran je gen *bla*, a ekspresija fuzioniranog gena pod kontrolom je *PHO5* promotora. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 5.



Slika 5. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla C*

3.2.4.6. Plazmid pRSII423 PIR2bla D

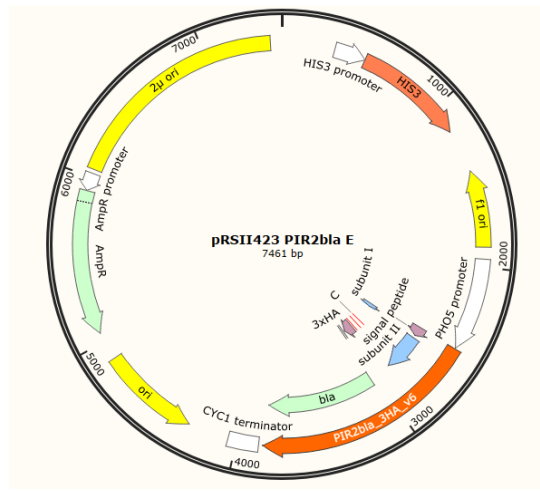
Plazmid pRSII423 *PIR2bla D* sadrži gen *PIR2* u kojemu je deletirano devet od deset PIR ponavljanja i jedan cisteinski ostatak na C-terminalnom kraju, dok su očuvani signalni peptid, podjedinica I, tri cisteina na C-terminalnom kraju kao i His- i HA-oznake. Na gen *PIR2* fuzioniran je gen *bla*, a ekspresija fuzioniranog gena pod kontrolom je *PHO5* promotora. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 6.



Slika 6. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla D*

3.2.4.7. Plazmid pRSII423 PIR2bla E

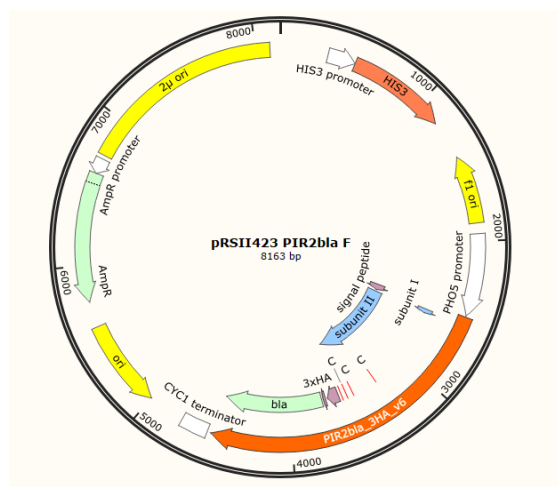
Plazmid pRSII423 *PIR2bla* E sadrži gen *PIR2* u kojemu je deletirana gotovo cijela podjedinica I, sva PIR ponavljanja i jedan od četiri cisteina sa C-terminalnog kraja, a očuvani su signalni peptid, tri cisteinska ostatka te His- i HA-oznake na C-terminalnom kraju. Na gen *PIR2* fuzioniran je gen *bla*, a ekspresija fuzioniranog gena pod kontrolom je *PHO5* promotora. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 7.



Slika 7. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla* E

3.2.4.8. Plazmid pRSII423 PIR2bla F

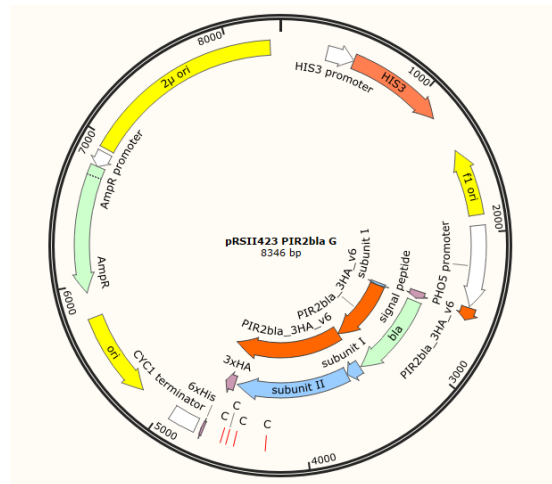
Plazmid pRSII423 *PIR2bla* F sadrži gen *PIR2* u kojemu je deletirana podjedinica I, dok su ostali dijelovi gena očuvani. Na gen *PIR2* fuzioniran je gen *bla*, a ekspresija fuzioniranog gena pod kontrolom je *PHO5* promotora. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 8.



Slika 8. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla* F

3.2.4.9. Plazmid pRSII423 PIR2bla G

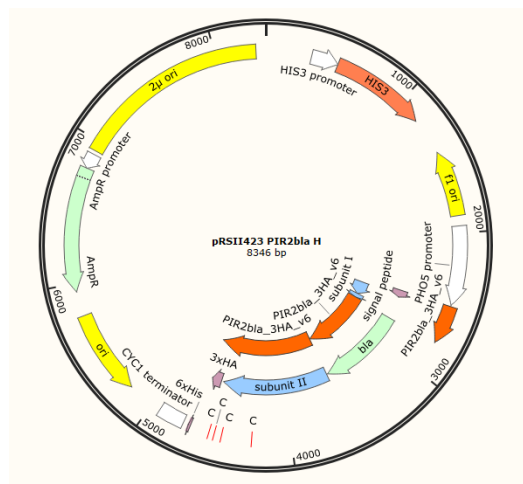
Plazmid pRSII423 *PIR2bla* G sadrži cjelovit nativni gen *PIR2* u koji je insertiran gen *bla*. Gen *bla* insertiran je unutar podjedinice I, a ekspresija gena je pod kontrolom *PHO5* promotora. Na C-terminalnom kraju gena nalaze se His- i HA-oznake koje prepoznaju specifična antitijela. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 9.



Slika 9. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla* G

3.2.4.10. Plazmid pRSII423 PIR2bla H

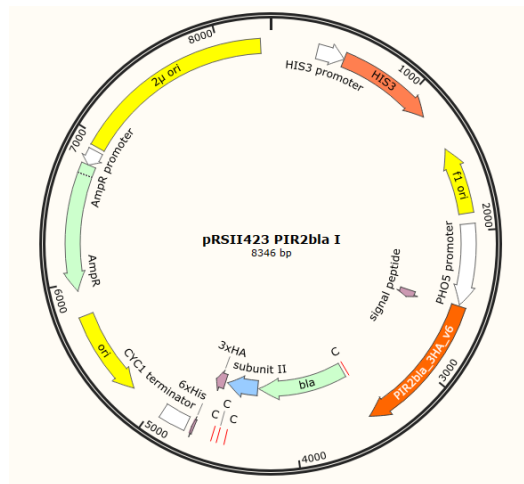
Plazmid pRSII423 *PIR2bla* H sadrži cjelovit nativni gen *PIR2* u koji je insertiran gen *bla*. Gen *bla* insertiran je unutar podjedinice II ispred prvog PIR ponavljanja, a ekspresija gena je pod kontrolom *PHO5* promotora. Na C-terminalnom kraju gena nalaze se His- i HA-oznake koje prepoznaju specifična antitijela. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 10.



Slika 10. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla* H

3.2.4.11. Plazmid pRSII423 PIR2bla I

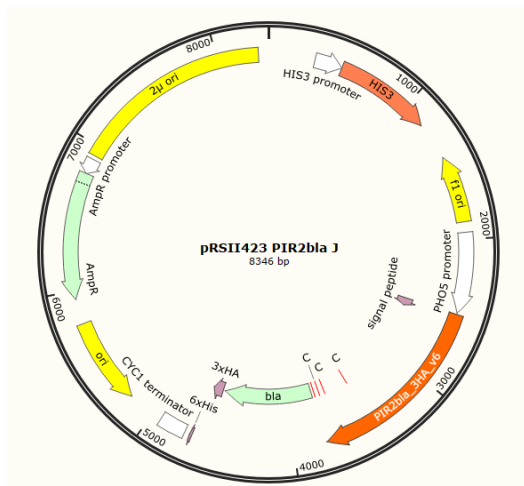
Plazmid pRSII423 *PIR2bla I* sadrži cjelovit nativni gen *PIR2* u koji je insertiran gen *bla*. Gen *bla* insertiran je iza prvog cisteinskog ostatka unutar podjedinice II, a ekspresija gena je pod kontrolom *PHO5* promotora. Na C-terminalnom kraju gena nalaze se His- i HA-oznake koje prepoznaju specifična antitijela. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 11.



Slika 11. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla I*

3.2.4.12. Plazmid pRSII423 PIR2bla J

Plazmid pRSII423 *PIR2bla J* sadrži cjelovit nativni gen *PIR2* u koji je insertiran gen *bla*. Gen *bla* insertiran je iza posljednjeg cisteinskog ostatka, a prije HA- i His-oznake na C-terminalnom kraju. Ekspresija gena je pod kontrolom *PHO5* promotora. Seleksijski markeri su AmpR i *HIS3*. Mapa plazmida prikazana je na slici 12.



Slika 12. Mapa plazmida pRSII424 *PIR2bla J*

3.3. METODE

3.3.1. Transformacija kvasca

Transformacija kvasca provedena je prema prilagođenom protokolu sa litij acetatom (Gietz i sur., 1995). Kvasac je uzgojen do rane logaritamske faze nakon čega je iz ukupnog volumena kulture izdvojen volumen suspenzije stanica koji odgovara 5 OD₆₀₀ stanica kvasca. Stanice su od hranjive podloge izdvojene centrifugiranjem 5 min. na 3000 rpm, te isprane u jednakom volumenu sterilne deionizirane vode, a potom i u jednakom volumenu sterilnog 0,1 M litij acetata. Talog stanica resuspendiran je u 1 mL 0,1 M sterilnog litij acetata i prebačen u sterilne mikroepuvete te ponovno ispran. Litij acetat je uklonjen pipetiranjem, a na talog stanica dodano je redom: 240 µL PEG (50 % w/v), 36 µL 1M LiAc, 25 µL jednolančane „carrier“ DNA i 50 µL ukupnog volumena sterilne dH₂O i plazmidne DNA (1 µg plazmida). Smjesa je vorteksirana do homogenosti te inkubirana 30 min pri 30°C, a zatim 20 min pri 42°C. Stanice su izdvojene centrifugiranjem 30 sekundi pri 8000 o/min pri čemu se transformacijska smjesa odvoji od taloga stanica. Talog stanica resuspendiran je u 1 mL sterilne deionizirane vode te je po 100 µL stanica naciepljeno na selektivne YNB His- ploče. Rast kolonija do odgovarajuće veličine očekivan je kroz 2 – 4 dana od transformacije.

3.3.2. Uzgoj kvasca uz indukciju *PHO5* promotora

Ekspresija gena u stanicama kvasca pod kontrolom je promotora *PHO5*. Promotor *PHO5* induciran je u uvjetima nedostatka fosfata odnosno kada stanice potroše unutarstanične zalihe fosfata. Stoga su stanice, nakon uzgoja do rane logaritamske faze u selektivnoj podlozi s dodatkom fosfata (YNBP His-), prebačene na sintetsku selektivnu podlogu bez fosfata. Nakon što su stanice postigle ranu logaritamsku fazu uzgojem u YNBP His- podlozi, iz ukupnog volumena kulture izdvojen je volumen koji odgovara koncentraciji stanica od OD₆₀₀=0,3 te su stanice isprane dva puta u po 10 mL sterilne deionizirane vode. Isprane stanice naciepljene su u 15 mL His- podloge bez fosfata te uzgojene prekonoćno pri 30°C kako bi se potrošile unutarstanične zalihe fosfata te postigla indukcija *PHO5* promotora.

3.3.3. Određivanje aktivnosti β-laktamaze na površini stanica kvasca

Aktivnost enzima β-laktamaze određuje se reakcijom razgradnje nitrocefina koju katalizira β-laktamaza. Nitrocefina je antibiotik čijom razgradnjom nastaje cefalosporanska kiselina koju je moguće kvantificirati spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri 482 nm. Tijekom mjerenja aktivnosti korištena je 0,1 mM radna otopina nitrocefina (0,1 mM

otopina nitrocefina u DMSO). Stanice kvasca uzgojene su u sintetskoj podlozi bez fosfata za indukciju *PHO5* promotora i centrifugiranjem 5 min pri 3000 rpm izdvojene od hranjive podloge. Hranjiva podloga izdvojena je u sterilnu epruvetu te inkubirana na +4°C do mjerenja aktivnosti. Talog stanica ispran je prvo u deioniziranoj vodi, a zatim i u 100 mM kalij fosfatnom puferu pH=7 koji se koristi i u daljnjim koracima mjerenja. Stanice su nakon drugog ispiranja resuspendirane u istom puferu na koncentraciju od približno 100 OD₆₀₀/mL te prebačene u mikroeprevete. Zbog preciznosti kasnijeg izračuna, ponovno je izmjerena koncentracija stanica OD₆₀₀ u suspenziji stanica prebačenih u mikroeprevete. Za određivanje aktivnosti, korišteno je prvo decimalno razrjeđenje originalne suspenzije (≈100 OD) koje je pripremljeno dodatkom 10 μL originalne suspenzije stanica u 90 μL pufera. Razrijeđena suspenzija korištena je u daljnjim koracima mjerenja. Mjerenje je provedeno u tri paralele, a reakcijska smjesa sadržava 467,5 μL pufera i 7,5 μL razrijeđene suspenzije stanica. Reakcijska smjesa predinkubirana je 2 minute pri 30°C, a zatim je u reakcijsku smjesu dodano 25 μL 0,1 mM nitrocefina. Nakon dodatka nitrocefina, suspenzija je kratko vorteksirana te inkubirana 5 minuta pri 30°C uz intenzivno miješanje. Reakcija je prekinuta centrifugiranjem na 8000 o/min 15 sekundi. Supernatant je izdvojen u kivete te je spektrofotometrijski određena apsorbancija pri 482 nm.

3.3.4. Određivanje aktivnosti β-laktamaze u hranjivoj podlozi

Aktivnost β-laktamaze određena je i u hranjivoj podlozi u kojoj su uzgojene stanice kvasca, a koja je prethodno odvojena u zasebnu epruvetu te inkubirana pri 4°C. Reakcijska smjesa sadržava 220 μL hranjive podloge i 255 μL 100 mM kalij fosfatnog pufera pH=7, a mjerenje je provedeno na jednak način kao i u suspenziji stanica.

3.3.5. Izolacija proteina stanične stijenke

Stanice kvasca prekončno su uzgojene u podlozi bez fosfata pri 30°C do koncentracije OD₆₀₀=2-3 te su od podloge izdvojene centrifugiranjem pri 6000 o/min. Talog stanica ispran je dva puta deioniziranom vodom te dva puta 50 mM kalij fosfatnim puferom pH=8. Nakon ispiranja, talog stanica je resuspendiran u 1 mL 50 mM kalij fosfatnog pufera pH=8, prenesen u mikroeprevetu i centrifugiran pri 8000 o/min. Supernatant je uklonjen pipetiranjem, a talog stanica je resuspendiran u približno 300 μL istog pufera i prenesen u BeadBug kivete za razbijanje stanica. U resuspendirane stanice u BeadBug kiveti dodane su staklene kuglice tako da volumen kuglica iznosi približno 50% volumena suspenzije. Stanice su razbijene u BeadBug homogenizatoru u dva ciklusa po 3 min pri brzini 4000 rpm uz inkubaciju stanica na ledu minimalno 1 min između ciklusa razbijanja. Suspenzija razbijenih stanica pipetiranjem je

prenesena u nove mikroepuvete te centrifugirana pri 8000 o/min. Supernatant koji sadrži intracelularne proteina uklanjen je pipetiranjem i odbačen, a talog stanica ispran je četiri puta sa po 1 mL 50 mM kalij fosfatnog pufera pH=8.

Nekovalentno vezani proteini izolirani su kuhanjem taloga staničnih stijenki u 1 mL Laemmli pufera (50 mM TRIS-HCl pufer pH 6,8, 2 mM Na-EDTA, 2% SDS, 0,001% bromfenol plavo i 5% β -merkaptotanol) 10 minuta u vrijućoj vodenoj kupelji. Suspenzija stijenki nakon kuhanja centrifugirana je pri 8000 o/min, a supernatant koji sadrži nekovalentno vezane proteine izdvojen je u zasebnu mikroepuvetu pohranjenu na -20°C. Talog zaostao nakon izdvajanja supernatanta resuspendiran je u još 1 mL Laemmli pufera te ponovno kuhan 10 minuta u vrijućoj vodenoj kupelji. Suspenzija je centrifugirana pri 8000 o/min, a supernatant je izdvojen pipetiranjem te odbačen. Talog nakon centrifugiranja ispran je četiri puta u po 1 mL kalij fosfatnog pufera pH=8, a posljednje ispiranje provedeno je sa 1 mL deionizirane vode.

Kovalentno vezani proteini izolirani su tretmanom ispranih stijenki sa 30 mM NaOH (u omjeru 1 μ L NaOH na 1 mg taloga staničnih stijenki), pri čemu je suspenzija preko noći inkubirana na +4°C. Nakon prekonoćne inkubacije, suspenzija je centrifugirana pri 8000 o/min nakon čega je supernatant izdvojen u nove mikroepuvete i pomiješan sa Laemmli puferom za uzorke s 10%-tnim glicerolom. Ekstrakti kovalentno vezanih proteina pohranjeni su na -20°C.

3.3.6. Izolacija proteina iz podloge

Stanice kvasca uzgojene su prekonoćno pri 30°C u sintetskoj podlozi bez fosfata do koncentracije OD₆₀₀=2-3 te su od podloge izdvojene centrifugiranjem pri 6000 o/min te je podloga izdvojena u zasebne epruvete. U kivete za centrifugiranje izdvojeno je 22,5 mL podloge u koji je zatim dodano 15 mL acetona prethodno ohlađenog na -20°C. Hranjiva podloga pomiješana s acetonom inkubirana je preko noći pri +4°C. Nakon prekonoćne inkubacije, smjesa je centrifugirana 60 minuta na 10 000 rpm pri +4°C. Supernatant je odbačen nakon centrifugiranja, a talog zaostao u kivetama za centrifugiranje osušen na zraku. Kada je talog potpuno osušen, resuspendiran je u 50 μ L Laemmli pufera za uzorke (1x koncentriran) i pohranjen pri -20°C.

3.3.7. SDS elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Izolirani proteini stanične stijenke razdvojeni su elektroforezom u 10% -tnom poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima. Uzorci su prije elektroforeze tretirani Laemmli puferom s 10%-tnim glicerolom kako bi se postigla denaturacija proteina. Elektroforeza je provedena u diskontinuiranom sustavu sa gornjim gelom za sabijanje (pH=6,8)

i donjim gelom za razdvajanje (pH=8,8). Gornji gel za sabijanje sadrži: 4,5% akrilamida, 0,12% N,N'-metilenbisakrilamida, 0,1% SDS-a, 0,075% N,N,N',N'-tetrametiletiletildiamina (TEMED) i 7,5% amonij-persulfata (APS) u 0,5M TRIS-HCl puferu pH 6,8. Donji gel za razdvajanje sadrži: 10% akrilamida, 0,3% N,N'-metilenbisakrilamida, 0,1% SDS-a, 0,05% TEMED-a i 5% APS-a u 1,5 M TRIS-HCl puferu pH 8,8. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu (25 mM TRIS-glicin pufer 6,8, 0,1% SDS) pri naponu od 180 V. Tijek elektroforeze praćen je migracijom bojila bromfenol plavo, a elektroforeza je zaustavljena kada je boja dosegla rub gela.

3.3.8. Immunoblot

Nakon provedene elektroforeze, proteini su iz gela na nitroceluloznu membranu preneseni polusuhim (eng. semi-dry) transferom. Transfer je proveden u uređaju za polusuhi prijenos (Trans-Blot®Turbo™ Transfer System, BioRad) uz korištenje TRIS-glicinskog pufera koji se priprema otapanjem 3,03 g TRIS-a i 14,4 g glicina u 200 mL metanola i 800 mL dH₂O. Transfer je proveden pri jakosti struje od 1 A i naponu od 25 V tijekom 25 min.

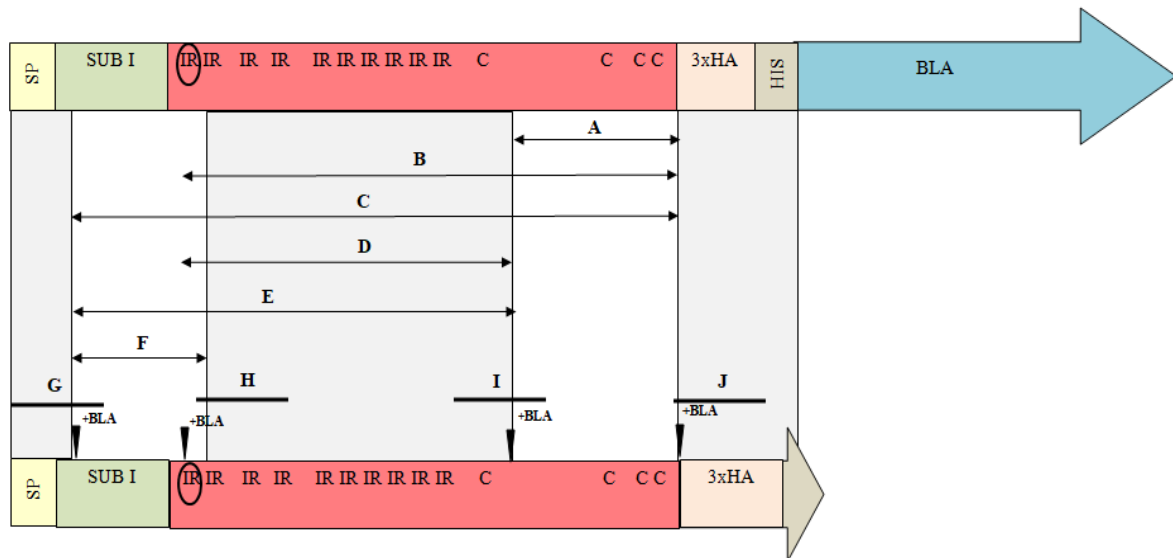
Nitrocelulozna membrana je nakon transfera obojena s bojom Ponceau S što omogućuje vizualizaciju i obilježavanje vrpce standarda. Membrana je zatim odbojena s deioniziranom vodom i blokirana inkubacijom u 1% otopini bezmasnog obranog mlijeka u prahu u puferu za blokiranje (50 mM TRIS-HCl pufer pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) uz lagano potresanje 1h. Nakon blokiranja, otopina za blokiranje je uklonjena, a na membranu je dodano 5 mL pufera za blokiranje i 5 µL anti-HA antitijela konjugiranih s peroksidazom. Membrana je u otopini inkubirana prekoćnočno pri +4°C. Sljedeći dan membrana je isprana tri puta po 10 min sa po 10 mL pufera za blokiranje. Nakon posljednjeg ispiranja, kemiluminiscentnom olovkom (WesternSure Pen) označeni su standardi te su na membrani dodani supstrati peroksidaze u obliku komercijalno dostupnih ECL otopina (BioRad). Proteinske vrpce vizualizirane su korištenjem C-Digit skenera (C-DiGit® Blot Scanner– LI-COR Biosciences).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Sustav za izlaganje heterolognih proteina na površini stanica predstavlja alternativu grubim i skupim klasičnim metodama imobilizacije proteina. Metoda imobilizacije proteina na površini stanica važan je alat u proteinskom inženjerstvu, a ima potencijal za primjenu u različitim područjima kao što su biotehnologija, medicina, farmakologija i prehrambeno inženjerstvo. Primjena sustava za izlaganje heterolognih proteina najčešća je u kvascu *S. cerevisiae* koji kao eukariotski organizam omogućava provedbu posttranslacijskih modifikacija, zauzimanja ispravne konformacije proteina i glikozilacije kao i laku genetičku manipulaciju i jednostavan uzgoj. Proteini imobilizirani na površini stanice kvasca pokazuju i povećanu stabilnost na promjene temperature, pH, organska otapala te proteaze. S druge strane, ovakvi sustavi još uvijek su nedovoljno istraženi te nisu u širokoj uporabi zbog nedostataka kao što su hiperglikozilacija nekih heterolognih proteina te niska učinkovitost izlaganja rekombinantnih proteina na površini stanice.

Metoda imobilizacije na površini stanice kvasca temelji se na fuziji gena koji kodira za protein od interesa sa nekim od gena koji kodiraju za native proteine stanične stijenke. Stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* sastoji se od unutarnjeg glukanskog sloja sastavljenog od β -1,3-glukana (50-55%), β -1,6-glukana (10-15%) i hitina (1-2%) te vanjskog sloja manoproteina (Lesage i Bussey, 2006). Manoproteini se u staničnu stijenku mogu vezati nekovalentno, kovalentno preko glukana ili disulfidnim vezama preko drugih proteina koji su u staničnu stijenku vezani kovalentno (de Nobel i Lipke, 1994). Kovalentno vezani proteini dijele se na proteine vezane preko GPI sidra na β -1,6-glukan i proteine PIR obitelji koji su vezani na β -1,3-glukan esterskom vezom preko specifičnih glutaminskih ostataka unutar repetitivne sekvence karakteristične za ovu obitelj proteina. Proteini PIR obitelji primjenjuju se za N-terminalnu imobilizaciju rekombinantnih proteina što je posebno pogodno za enzime čija se katalitička mjesta nalaze blizu C-terminalnog kraja proteina. Prvi sustavi za imobilizaciju konstruirani su fuzijom cjelovitih PIR proteina sa proteinom od interesa. Međutim, ovom fuzijom nastaju veliki rekombinantni proteini što predstavlja potencijalni problem za sekreciju i vezanje u staničnu stijenku. U prethodnim istraživanjima ovoga Laboratorija, optimizacija ovakvog sustava je provedena uvođenjem određenih mutacija u stanice kvasca kako bi se povećala količina rekombinantnog proteina ugrađenog na površinu stanica. Istraživanja na mutantima u endocitozi, kao i N- i O-glikozilaciji sa rekombinantnim proteinom Pir2bla pokazala su zanimljive rezultate te povećanje ekspresije rekombinantnih proteina u određenim mutantima. Kako bi dodatno optimizirali sustav za izlaganje proteina na površini stanice, u

ovome radu ispitano je koji su dijelovi proteina Pir2 neophodni za kovalentno vezanje rekombinantnog proteina u staničnu stijenku i koja je idealna pozicija "reporter" enzima β -laktamaze unutar rekombinantnog proteina.



SP = signalni peptid, SUB I = podjedinica 1, 3xHA = tri puta ponovljeni HA-oznaka, HIS = 6xHis oznaka, BLA = β -laktamaza, IR = PIR ponavljanje, C = cistein, + = mjesto insercije BLA, strelice označavaju deletirane dijelove gena

Slika 13. Konstrukti rekombinantnog gena pir2bla

U tu svrhu, konstruirane su dvije skupine modificiranih oblika proteina Pir2bla, koji se sastoji od cijelog proteina Pir2 na koji se nastavlja β -laktamaza iz *E.coli*. U prvoj skupini konstrukata (A-F) provedena je delecija pojedinih dijelova gena koji kodira za protein Pir2 kako bi se ispitala uloga odgovarajućih dijelova proteina u vezanju u stijenku (slika 13.). Posebno zanimljivi konstrukti su B i D u kojima je očuvano samo jedno PIR ponavljanje preko kojega bi se rekombinantni protein mogao kovalentno vezati u staničnu stijenku kvasca. Međutim, prema literaturnim podacima postoji i mogućnost da se rekombinantni protein u staničnu stijenku veže i disulfidnim vezama preko cisteina na C-terminalnom kraju Pir2 (Castillo i sur., 2003) što je ispitano pomoću konstrukta E koji nema očuvano niti jedno PIR ponavljanje.

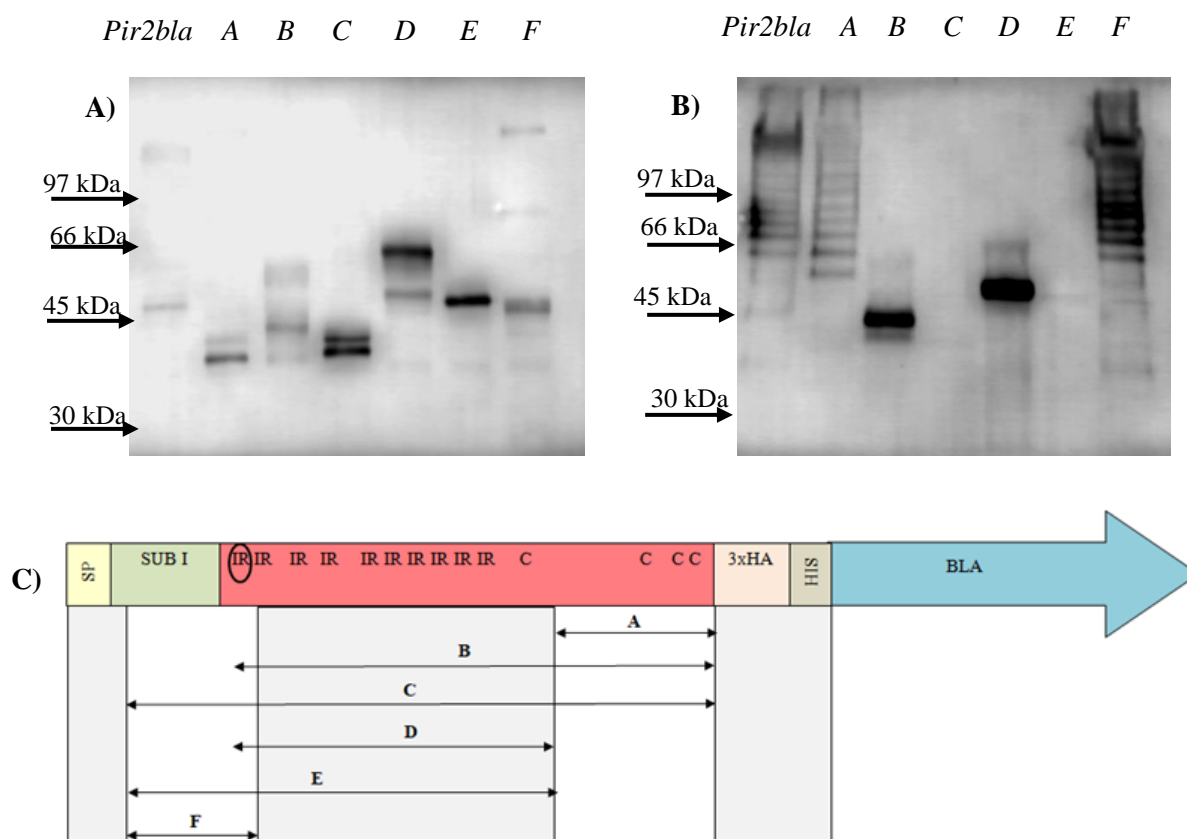
U drugoj skupini konstrukata (G-J) "reporter" enzim β -laktamaza premještena je sa samog C-terminalnog kraja na različite pozicije unutar sekvence proteina Pir2. Cilj premještanja β -laktamaze bio je ispitati utjecaj položaja "reporter" enzima na vezanje rekombinantnog proteina u stijenku te na aktivnost enzima. Tako je β -laktamaza u konstruktu G premještena na N-terminalni kraj proteina Pir2, u konstruktu H ispred prvog PIR ponavljanja,

u konstruktu *I* iza svih PIR ponavljanja, a u konstruktu *J* iza domene koja sadrži cisteine, a ispred HA- i His oznaka.

Konstruiranim plazmidima transformiran je divlji tip kvasca *S.cerevisiae*, a stanice kvasca uzgojene su u uvjetima indukcije *PHO5* promotora. Iz uzgojenih stanica kvasca su prema prethodno opisanom protokolu izolirani proteini stanične stijenke te je njihovo vezanje u stijenku ispitano metodom imunoblota. Također, provedeno je i mjerenje aktivnosti β -laktamaze u stanicama i hranjivoj podlozi nakon uzgoja sojeva transformiranih konstruktima u kojima je β -laktamaza premještena na različite pozicije unutar Pir2 (*G–J*) te u konstruktima sa delecijom dijelova Pir2 koji su prema imunoblotu pokazali najveću količinu kovalentno vezanog rekombinantnog enzima u staničnu stijenku.

4.1. VEZANJE KONSTRUKATA A-F U STANIČNU STIJENKU

Stanice divljeg tipa kvasca prethodno transformirane konstruktima rekombinantnih proteina su prekonočno uzgojene u uvjetima indukcije *PHO5* promotora. Stanice u logaritamskoj fazi rasta su razbijene, a iz stijenki su prema prethodno opisanom protokolu izolirani proteini. Nekovalentno vezani proteini izolirani su kuhanjem u SDS-u uz dodatak β -merkaptoetanolu, a kovalentno vezani proteini tretmanom sa 30 mM NaOH (Mrša i sur.,1997). Izolirani proteini razdvojeni su elektroforezom u poliakrilamidnom gelu te analizirani imunoblotom, čiji su rezultati prikazani na slici 14.



A) SDS ekstrakt u kojemu su vizualizirani nekovalentno vezani proteini. B) NaOH ekstrakt u kojem su vizualizirani kovalentno vezani proteini. C) Shema konstrukata sa deletiranim dijelovima PIR2 na kojoj je strelicom prikazano koji dio PIR2 je deletiran u pojedinom konstrukt

Slika 14. Imunoblot analiza vezanja konstrukata A-F u staničnu stijenku kvasca

Imunoblot analizom provjereno je nekovalentno i kovalentno vezanje rekombinantnog proteina Pir2bla u staničnu stijenku kvasca. Analizom SDS ekstrakta, koji sadrži nekovalentno vezane proteine, za svaki od konstrukata vizualizirane su vrpce odgovarajuće veličine modificiranog proteina Pir2bla (slika 14.A). Navedeni rezultat pokazuje kako u kvascu dolazi do normalne sinteze svih modificiranih oblika rekombinantnog proteina koji su u staničnu stijenku vezani nekovalentnim interakcijama.

Analiza NaOH ekstrakta (slika 14.B), koji sadrži kovalentno vezane rekombinantne proteine, pokazuje kako nisu prisutne vrpce konstrukata C i E. Zajednička karakteristika konstrukata C i E je delecija svih PIR ponavljanja preko kojih se protein Pir2 kovalentno veže u staničnu stijenku. Prisustvo vrpce u SDS ekstraktu kod oba konstrukta pokazuje kako se u stanicama normalno sintetiziraju proteini koji se nekovalentno vežu u staničnu stijenku, no zbog delecije PIR ponavljanja rekombinantni protein se u konstruktima C i E ne može kovalentno

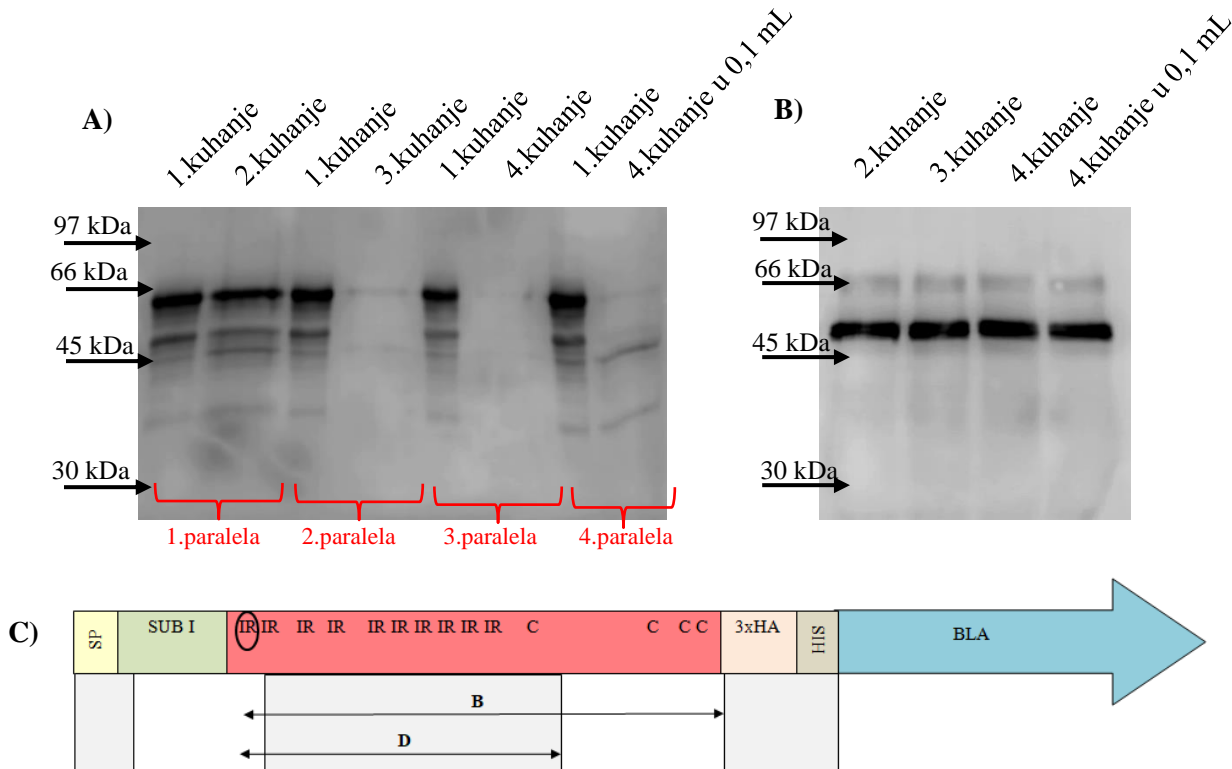
vezati u staničnu stijenku te se ne detektira u NaOH ekstraktu. Nadalje, u konstruktima *A* i *F* u kojima su očuvana PIR ponavljanja, u NaOH ekstraktu vidljiv je karakterističan uzorak "ljestvica" kao i u nemodificiranom Pir2. Ovakav rezultat bi mogao biti posljedica različitog procesiranja proteina između PIR sekvenci što bi rezultiralo serijom proteina različite veličine (ovisno o mjestu procesiranja) i karakterističnim uzorkom "ljestvice" na imunoblotu. Vrpca konstrukta *E*, u kojemu su deletirana sva PIR ponavljanja, a očuvani cisteini na C-terminalnom kraju, nije vizualizirana u NaOH ekstraktu što pokazuje da disulfidni mostovi nemaju ulogu u vezanju rekombinantnog proteina u stijenku. Takav konstrukt nije pogodan za daljnji razvoj metode imobilizacije jer nije čvrsto vezan u stijenku. Usporedbom vrpce u NaOH ekstraktu konstrukata *A*, *B* i *D* vidljivo je kako nema uzorka "ljestvice" na imunoblotu ukoliko su deletirana PIR ponavljanja (konstrukti *B* i *D*).

Konstrukti *B* i *D* u NaOH ekstraktu pokazuju vrpce najjačeg intenziteta što ukazuje na veću količinu proteina kovalentno vezanog u staničnu stijenku. Oba konstrukta sadrže jedno očuvano PIR ponavljanje preko kojeg se kovalentno vežu u stijenku što sugerira kako je dovoljna samo jedna repetitivna sekvenca za kovalentno vezanje rekombinantnog proteina u stijenku. Kako bi se ispitalo je li zaista samo jedna PIR ponavljajuća sekvenca dovoljna za čvrsto kovalentno vezanje u stijenku, u nastavku je provedeno višekratna ekstrakcija proteina kuhanjem stijenke u SDS-u i β -merkaptetanolu i nakon toga NaOH tretman stijenke kvasca koji eksprimira konstrukt *D*.

4.2. ISPITIVANJE JAČINE VEZANJA KONSTRUKTA *D* U STIJENKU

Konstrukti *B* i *D* u sekvenci proteina Pir2bla imaju očuvano jedno PIR ponavljanje preko kojeg se kovalentno vežu u staničnu stijenku kvasca. Kako bi se uvjerali da u NaOH ekstraktu ne zaostaju nekovalentno vezani proteini i da je za kovalentno vezanje u stijenku dovoljna samo jedna PIR repetitivna sekvenca, proveden je modificirani protokol izolacije proteina stijenke iz stanica kvasca koje su transformirane konstruktom *D*. Modificirani protokol izolacije proveden je na četiri paralele stanice iz istog uzgoja pri čemu su proteini iz prve paralele izolirani uobičajenim protokolom izolacije uz dva kuhanja u 1 mL SDS-a sa dodatkom β -merkaptetanola, druga paralela kuhana je tri puta u po 1 mL, treća paralela kuhana je četiri puta u po 1 mL, dok je četvrta paralela kuhana ukupno četiri puta od kojih je tri puta kuhana u po 1 mL, a posljednje kuhanje provedeno je u 0,1 mL SDS-a sa dodatkom β -merkaptetanola. Izolacija kovalentno vezanih proteina iz taloga stijenke zaostalog nakon višekratne ekstrakcije

provedena je tretmanom sa 30 mM NaOH prema uobičajenom protokolu nakon različitog broja kuhanja u otopini SDS-a sa dodatkom β -merkaptetanola. Izolirani proteini analizirani su metodom imunoblota čiji rezultati su prikazani na slici 15.



A) konstrukt D u SDS ekstraktu nakon različitog broja ekstrakcija SDS-om i β -merkaptetanolom. B) kovalentno vezan konstrukt D nakon provedene višestruke ekstrakcije SDS-om i β -merkaptetanolom. C) Shema konstrukata B i D sa delecijom dijela proteina Pir2.

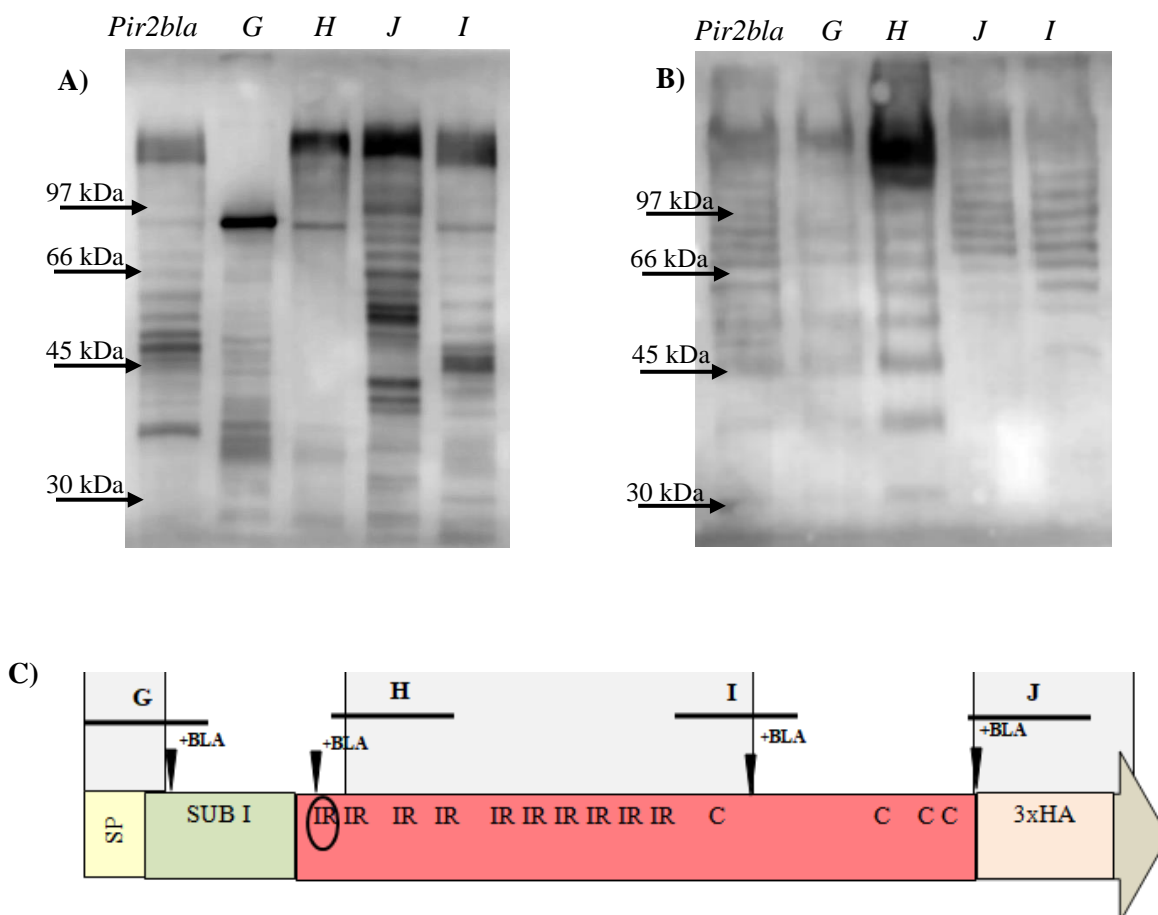
Slika 15. Imunoblot analiza vezanja konstrukta D u staničnu stijenku

Rezultati imunoblot analize pokazuju kako se i nakon višestrukog kuhanja detektiraju vrpce nekovalentno i kovalentno vezanog proteina u SDS odnosno NaOH ekstraktu. Povećanjem broja kuhanja, vrpce u SDS ekstraktu su slabijeg intenziteta što je u skladu s očekivanjima budući da se svakim kuhanjem ekstrahira određena količina proteina (slika 15.A). Razlika u intenzitetu vrpce treće i četvrte paralele rezultat je različitog volumena u kojemu su uzorci kuhani. Tako je slabiji intenzitet vrpce kod treće paralele kuhane u 1 mL dok je jači intenzitet vrpce kod četvrte paralele kuhane u 0,1 mL SDS-a sa dodatkom β -merkaptetanola posljedica veće koncentracije proteina u uzorku manjeg volumena. U NaOH ekstraktu (slika 15.B) unatoč višestrukome kuhanju u SDS-u sa dodatkom β -merkaptetanola, količina čvrsto kovalentno vezanog rekombinantnog proteina u staničnu stijenku ostaje jednaka, što potvrđuje

da je samo jedna PIR sekvenca dovoljna za kovalentno vezanje u staničnu stijenku kvasca te da u NaOH ekstraktu ne zaostaje nekovalentno vezani protein.

4.3. PROVJERA VEZANJA KONSTRUKATA G-J U STANIČNU STIJENKU

Optimizacija sustava za izlaganje proteina na površini stanica zahtijeva čvrsto vezanje rekombinantnog proteina u stijenku, ali i optimalan položaj proteina od interesa unutar rekombinantnog proteina. Stoga je u konstruktima G-J protein Bla insertiran na različite položaje unutar sekvence proteina Pir2 te su stanice kvasca transformirane takvim konstruktima. Stanice su uzgojene u sintetskoj podlozi bez fosfata te su iz stijenki prethodno opisanim protokolom izolirani nekovalentno i kovalentno vezani proteini. Izolirani proteini razdvojeni su elektroforezom te analizirani imunoblotom čiji su rezultati prikazani na slici 16.



A) SDS ekstrakt u kojem se nalaze nekovalentno vezani proteini. B) NaOH ekstrakt u kojemu su vizualizirani kovalentno vezani proteini. C) Shema konstrukata u kojima je gen bla insertiran na različite pozicije unutar PIR2 – mjesto insercije je označeno okomitom strelicom.

Slika 16. Imunoblot analiza vezanja konstrukata G-J u staničnu stijenku

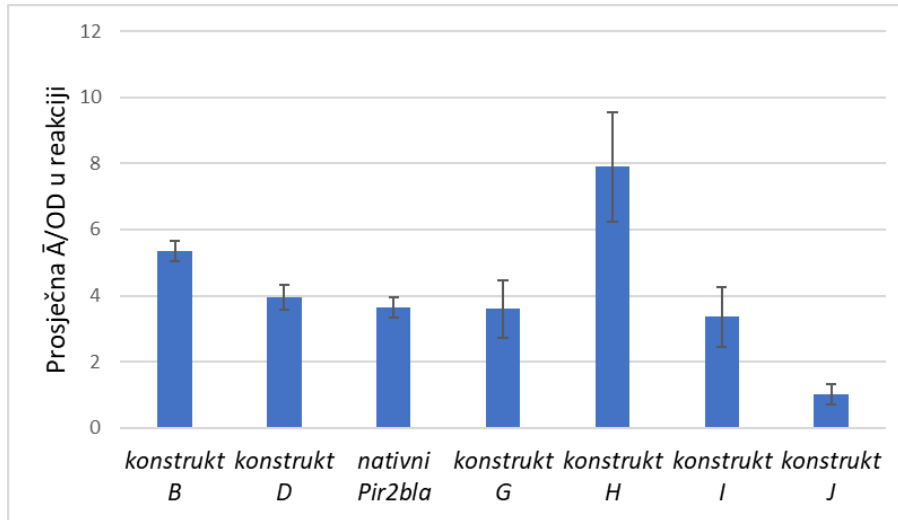
Imunoblot analizom SDS ekstrakta (slika 16.A), koji sadrži nekovalentno vezane proteine, detektirane su vrpce za svaki od četiri konstrukta što potvrđuje uspješnu produkciju proteina te njihovo nekovalentno vezanje u stijenku. Pri tome je najjači intenzitet vrpce detektiran za konstrukte *G* i *J*, intenzitet vrpce konstrukta *H* nešto je slabiji, a intenzitet vrpce konstrukta *I* gotovo je jednak intenzitetu vrpce nemodificiranog, originalnog konstrukta Pir2bla. Veći intenzitet vrpce ukazuje na veću količinu proteina koji su nekovalentno vezani u stijenku.

Analizom NaOH ekstrakta (slika 16.B), koji sadrži proteine kovalentno vezane u stijenku, također su detektirane vrpce za svaki od konstrukata, a zamjetan je i karakterističan uzorak "ljestvica" u svim uzorcima koji se pripisuje PIR ponavljanjima. Iako se svi konstrukti kovalentno vežu u stijenku, konstrukt *H* pokazuje značajno veći intenzitet vrpce od ostalih konstrukata. Takav rezultat sugerira da je optimalan položaj rekombinantnog proteina na N-terminalnom kraju Pir2 proteina između prve podjedinice (sub I) i repetitivne sekvence, što rezultira najefikasnijim vezanjem u stijenku.

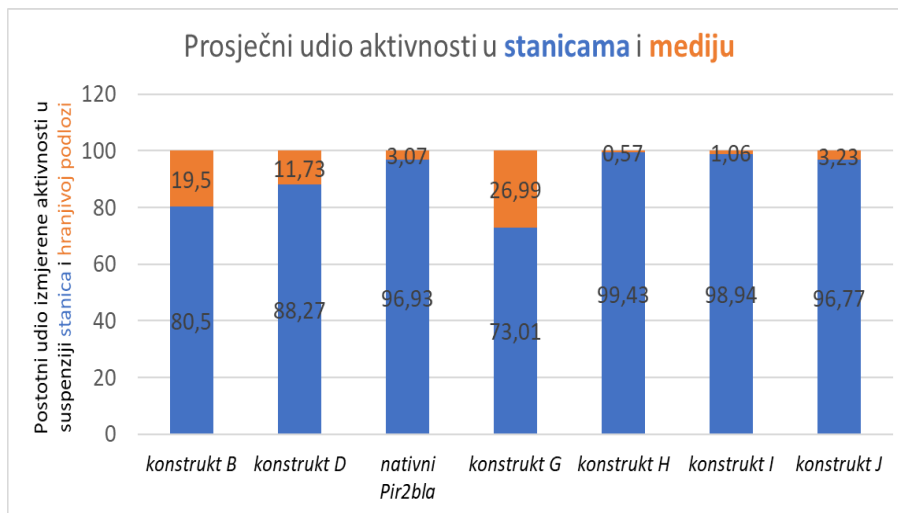
4.4. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI β -LAKTAMAZE

U opisanom sustavu za optimizaciju imobilizacije proteina na površini stanica, kao "reporter" enzim koristi se bakterijska β -laktamaza. Supstrat β -laktamaze je nitrocefim koji je žuto obojeni derivat cefalosporina i ne ulazi u stanicu. U reakciji β -laktamaza cijepa β -laktamski prsten nitrocefina čime nastaje cefalosporanska kiselina koja je obojena crveno, a kvantificira se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 482 nm. Aktivnost je ispitana u stanicama koje sadrže konstrukte sa izmijenjenim pozicijama β -laktamaze te konstruktima sa delecijom dijela sekvence proteina Pir2 koji su pokazali najčvršće vezanje u staničnu stijenku (konstrukti *B* i *D*). Mjerenje aktivnosti "reporter" enzima provedeno je prema prethodno opisanom protokolu u stanicama te hranjivoj podlozi nakon uzgoja stanica kako bi se odredilo koliko se rekombinantnog proteina tijekom uzgoja izluči u podlogu.

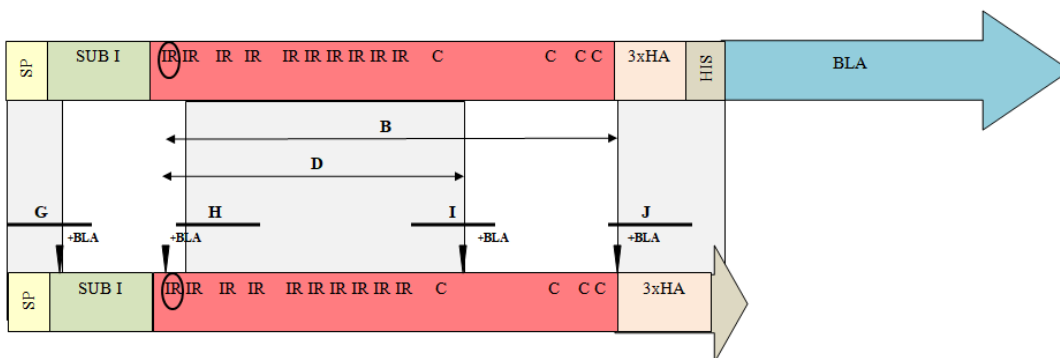
A)



B)



C)



A) aktivnost u suspenziji stanica prikazana kao omjer prosječne izmjerene apsorbancije i količine stanica u reakcijskoj smjesi izražene brojem OD₆₀₀ jedinica, B) postotni udio izmjerene aktivnosti u suspenziji stanica i hranjivoj podlozi, C) Shema konstrukata ispitivanih u ovom eksperimentu.

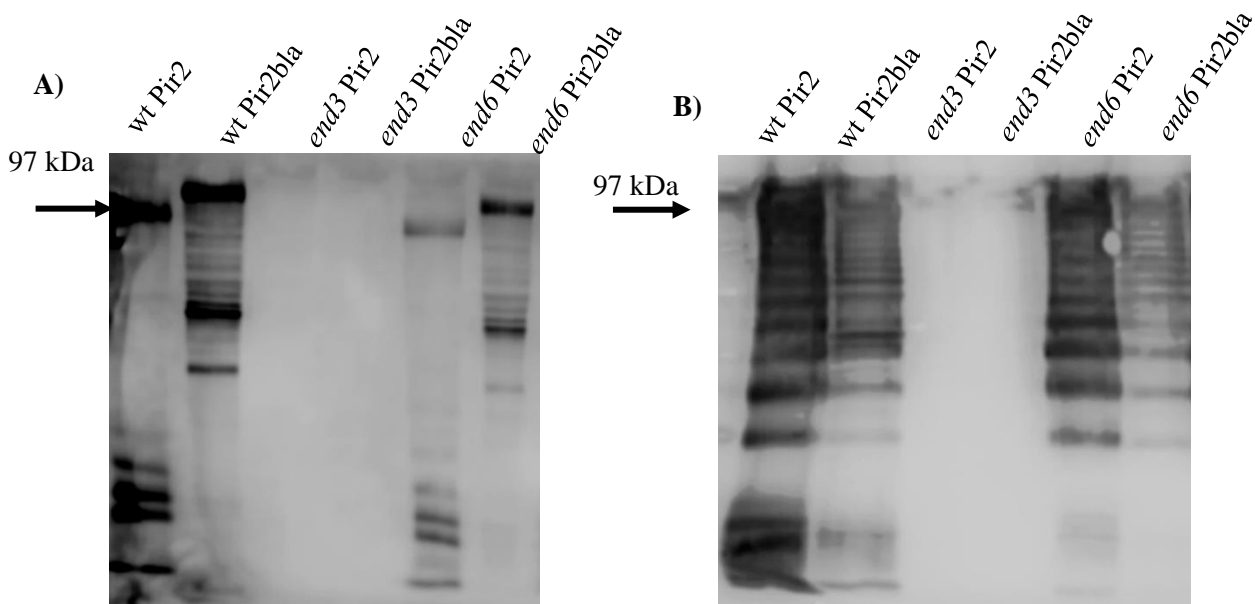
Slika 17. Rezultati mjerenja aktivnosti β -laktamaze

Rezultati mjerenja aktivnosti β -laktamaze, prikazani na slici 17.A, pokazuju kako je najveća aktivnost izmjerena za konstrukt *H* u kojemu je β -laktamaza premještena u N-terminalnom dijelu proteina Pir2 između prve podjedinice i ponavljajuće sekvence. Druga po veličini aktivnost izmjerena je za konstrukt *B* u kojem je očuvano samo jedno PIR ponavljanje preko kojeg se rekombinantni protein kovalentno veže u staničnu stijenkku, a β -laktamaza se nalazi na C-terminalnom kraju rekombinantnog proteina. Najslabija aktivnost izmjerena je za konstrukt *J* u kojemu je β -laktamaza pozicionirana iza domene koja sadrži cisteine unutar sekvence Pir2. Rezultati mjerenja aktivnosti β -laktamaze pokazuju kako je optimalan položaj "reporter" proteina na N-terminalnom kraju, neposredno ispred repetitivne sekvence, dok položaj "reporter" proteina unutar sekvence dalje prema C-terminalnom kraju nepovoljno djeluje na aktivnost. U budućim istraživanjima za postizanje najbolje aktivnosti "reporter" enzima bi trebalo pripremiti konstrukt koji bi imao kombinaciju karakteristika konstrukata *B* i *H* koji pokazuju najveću aktivnost. Takav konstrukt imao bi očuvano samo jedno PIR ponavljanje, a pozicija β -laktamaze bila bi u N-terminalnom dijelu proteina ispred PIR ponavljanja.

Aktivnost β -laktamaze izmjerena je prema prethodno opisanom protokolu u suspenziji stanica te u hranjivoj podlozi u kojoj su stanice uzgojene (slika 17.B). Konstrukt *H* prema slici 17.A pokazuje najveću ukupnu aktivnost, a usporedbom aktivnosti izmjerene u stanicama i u hranjivoj podlozi (slika 17.B) vidljivo je kako je vrlo nizak postotak aktivnosti detektiran i u hranjivoj podlozi. Navedeni rezultat upućuje na to da se konstrukt *H* čvrsto veže u staničnu stijenkku te se vrlo mala količina rekombinantnog proteina otpušta u hranjivu podlogu. S druge strane, konstrukti *B*, *D* i *G* pokazuju značajno veći postotak aktivnosti β -laktamaze u hranjivoj podlozi. Usporedbom rezultata mjerenja aktivnosti sa rezultatima imunoblotu, zamjetno je kako konstrukt *G* pokazuje aktivnost i intenzitet vizualiziranih vrpca na imunoblotu približno jednake nemodificiranom obliku Pir2bla. Suprotno tome, konstrukti *B* i *D* u analizi imunoblotom pokazuju značajno veći intenzitet vrpca od nemodificiranog Pir2bla, što sugerira kako se oba konstrukta čvrsto vežu u staničnu stijenkku te se produciraju u većoj količini nego nemodificirani Pir2bla. Stoga se može pretpostaviti kako konstrukti *B* i *D* općenito proizvode više rekombinantnog proteina, ali i da se značajan dio proteina otpusti u hranjivu podlogu što bi moglo biti posljedica dosezanja granice kapaciteta stijenkke za vezanje rekombinantnog proteina.

4.5. ISPITIVANJE UTJECAJA MUTACIJA U ENDOCITOZI NA VEZANJE REKOMBINANTNOG PROTEINA Pir2bla U STIJENKU

U prethodnim istraživanjima ispitan je utjecaj mutacija u endocitozi na učinkovitost imobilizacije rekombinantnog proteina u staničnu stijenku mjerenjem aktivnosti enzima β -laktamaze izložene na površini stanice. Endocitoza je proces kojim eukariotske stanice unose molekule iz okolne hranjive podloge, a karakterizira ga uvrtnje citoplazmene membrane u vezikule. Odvajanjem vezikule od citoplazmene membrane nastaje struktura endosoma koji sadrži molekule unesene iz okoline u stanicu. Mutacija *end3* rezultira defektom u koraku unosa molekula u stanicu i u organizaciji citoskeleta (Bénédicti i al., 2017) dok mutacija *end6* rezultira delokalizacijom aktina, što blokira unos molekula u stanicu (Munn i al., 1995). Prethodna istraživanja provedena su na *end3* i *end6* mutantima koji eksprimiraju nemodificirani Pir2bla rekombinantni protein. Mjerenjem aktivnosti β -laktamaze u *end6* mutantu pokazana je veća aktivnost u odnosu na divlji tip dok *end3* mutant pokazuje vrlo nisku (gotovo nikakvu) aktivnost Pir2bla konstrukta u odnosu na divlji tip. Vezanje rekombinantnog proteina Pir2bla u staničnu stijenku mutanata *end3* i *end6* u ovom radu analizirano je metodom imunoblota čiji rezultati su prikazani na slici 18. Kao kontrola korišten je protein Pir2 bez dodanog "reporter" enzima kako bi se provjerio utjecaj ovih mutacija na vezanje nativnog proteina Pir2 u stijenku.



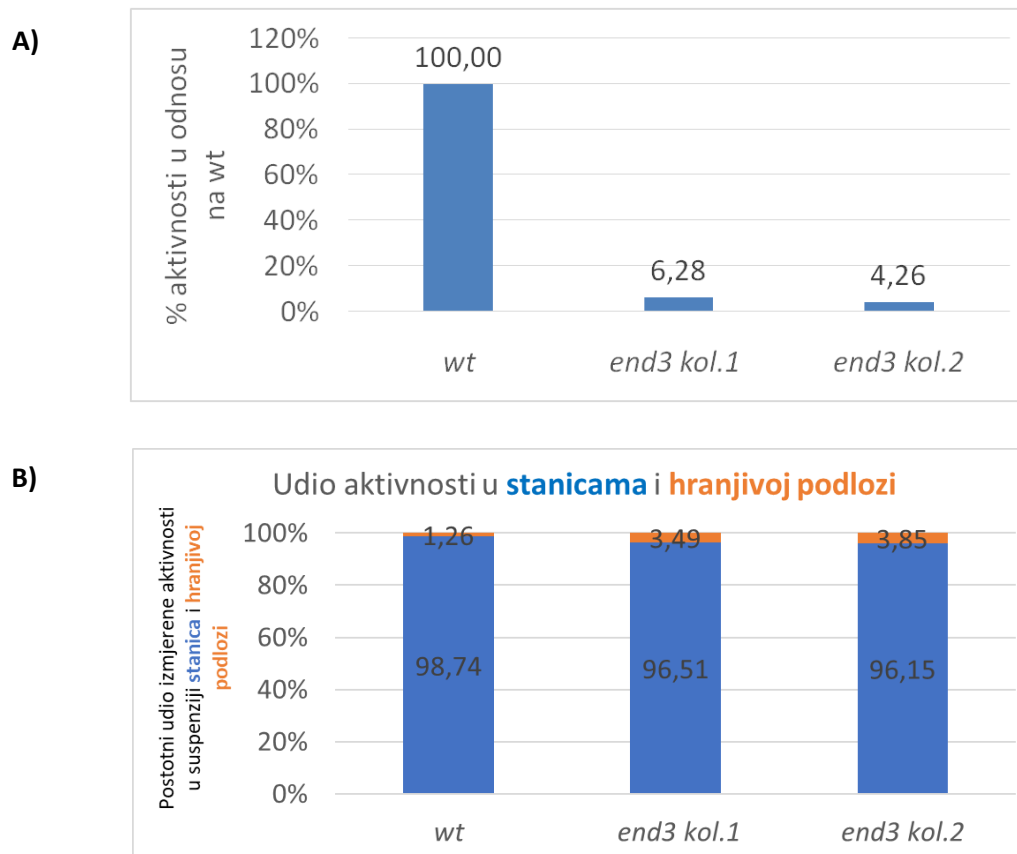
A) SDS ekstrakt u kojemu su vizualizirane vrpce nekovalentno vezanih proteina. B) NaOH ekstrakt u kojemu su vizualizirane vrpce kovalentno vezanih proteina.

Slika 18. Imunoblot analiza vezanja rekombinantnog proteina Pir2bla u staničnu stijenku mutanata *end3* i *end6*.

Imunoblot analiza pokazuje kako vrpca Pir2bla rekombinantnog proteina u *end3* mutantu nije prisutna ni u SDS (slika, 18.A) ni u NaOH ekstraktu (slika, 18.B) što sugerira da se rekombinantni protein Pir2bla jako slabo ili uopće ne veže u staničnu stijenkku ovog mutanta. Međutim, nije prisutna niti vrpca nativnog Pir2 proteina, što ukazuje da ova mutacija djeluje negativno na ugradnju nativnog proteina Pir2 u stijenkku, odnosno da se rekombinantni protein nije uspio ugraditi u stijenkku zbog defekta u vezanju Pir2, a ne zbog karakteristika samog rekombinantnog proteina. S druge strane, vrpce nativnog Pir2 i rekombinantnog Pir2bla proteina u *end6* mutantu vidljive su i u SDS i u NaOH ekstraktu što pokazuje kako se oba normalno vežu u staničnu stijenkku. Ovakav rezultat potvrđuje rezultate prethodnog istraživanja u kojemu je izmjerena vrlo niska aktivnost β -laktamaze u mutantu *end3* u odnosu na divlji tip, dok je u mutantu *end6* izmjerena veća aktivnost β -laktamaze u odnosu na divlji tip stanica.

Usporedbom uzoraka Pir2 i Pir2bla u SDS i NaOH ekstraktu stijenkki divljeg tipa kvasca i *end6* mutanta, može se uočiti da su vrpce Pir2bla jače izražene u SDS ekstraktu dok su vrpce Pir2 jače izražene u NaOH ekstraktu. Takav rezultat sugerira kako veća količina ukupno sintetiziranog proteina Pir2bla završava u nekovalentno vezanoj frakciji tj. da mu je otežano kovalentno vezanje.

Kako bi se dodatno potvrdili rezultati dobiveni za Pir2bla u stanicama *end3* mutanta provedena je ponovna transformacija mutanta *end3* sa plazmidom pRSII423 *pir2bla* prema protokolu opisanom u poglavlju Metode. Transformanti su uzgojeni u selektivnoj sintetskoj podlozi bez fosfata za indukciju *PHO5* promotora. Aktivnost β -laktamaze je izmjerena za dvije novotransformirane kolonije, a rezultati mjerenja prikazani su na slici 19.



A) aktivnost u suspenziji stanica prikazana kao omjer prosječne izmjerene aktivnosti i količine stanica u reakcijskoj smjesi izražene brojem OD₆₀₀ jedinica, B) postotni udio izmjerene aktivnosti u suspenziji stanica i hranjivoj podlozi

Slika 19. Rezultati mjerenja aktivnosti β -laktamaze

Mjerenje aktivnosti novotransformiranih kolonija *end3* mutanta pokazalo je vrlo nisku razinu izmjerene aktivnosti β -laktamaze u mutantima u usporedbi sa divljim tipom te je takav rezultat u skladu sa prijašnjim mjerenjima (slika 19.A). Također, izmjerena niska razina aktivnosti β -laktamaze u skladu je sa rezultatima imunoblota u kojima nije vizualizirana vrpca rekombinantnog proteina Pir2bla u mutantu *end3*. Izgledno je da se u staničnu stijenku mutanta *end3* veže vrlo mala količina rekombinantnog proteina koja posljedično rezultira niskom aktivnošću β -laktamaze, no takva količina proteina nedovoljna je za vizualizaciju imunoblotom.

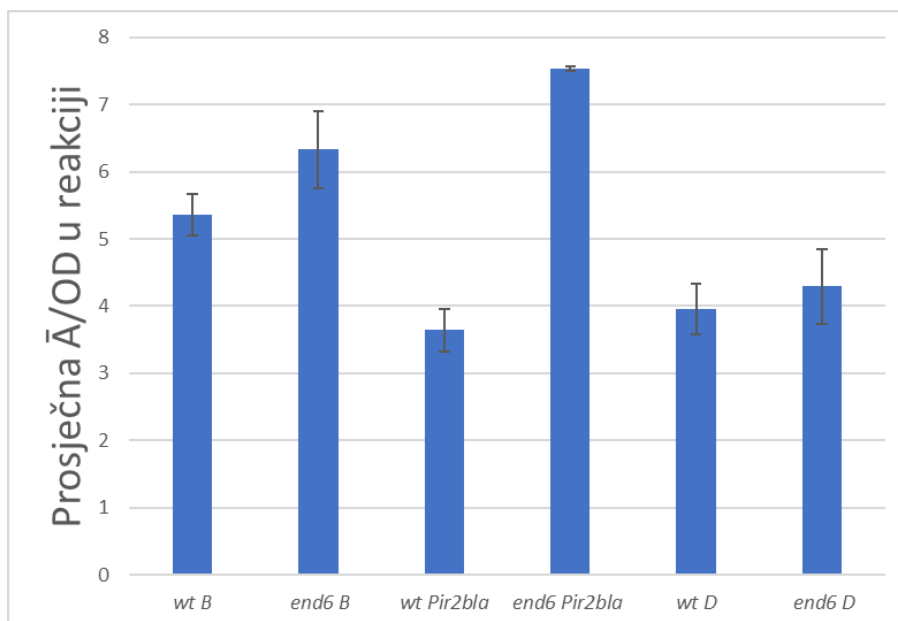
Usporedba izmjerene aktivnosti β -laktamaze u stanicama i hranjivoj podlozi divljeg tipa te *end3* mutanta (slika 19.B) pokazuje kako je najveći dio aktivnosti izmjeren u suspenziji stanica. No, usporedbom aktivnosti izmjerene u hranjivoj podlozi, vidljivo je kako je u mediju *end3* mutanata izmjerena tri puta veća aktivnost u odnosu na aktivnost izmjerenu u hranjivoj podlozi

u kojoj je uzgajan divlji tip kvasca, što dodatno potvrđuje slabu efikasnost vezanja rekombinantnog proteina u stijenku ovog mutanta.

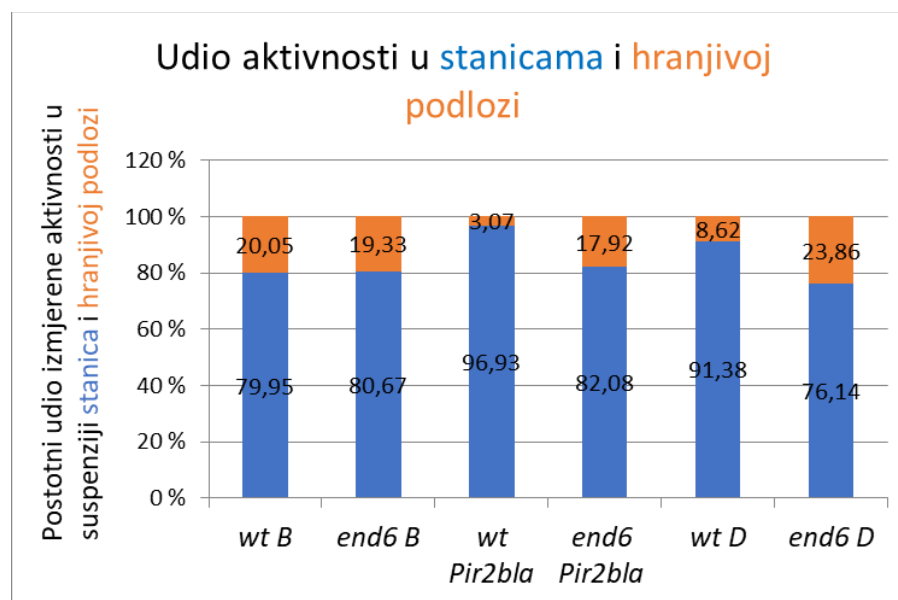
4.6. ISPITIVANJE UTJECAJA MUTACIJE U END6 NA VEZANJE MODIFICIRANIH OBLIKA REKOMBINANTNOG PROTEINA Pir2bla U STIJENKU

Obzirom da je mutant *end6* u prethodnim istraživanjima pokazao bolje rezultate u izlaganju rekombinantnog Pir2bla na površini stanica od divljeg tipa kvasca, transformiran je i sa konstruktima *B* i *D* u kojima su deletirani pojedini dijelovi Pir2 proteina (slika 20.C). Konstrukti *B* i *D* pokazali su najbolje vezanje u staničnu stijenku i najveću aktivnost β -laktamaze u divljem tipu kvasca, a time i najveći potencijal za daljnji razvoj sustava imobilizacije. Transformacija mutanta *end6* sa plazmidima *B* i *D* provedena je prethodno opisanom metodom pomoću litij acetata, a transformanti su selekcionirani na podlogama bez histidina te uzgojeni u uvjetima indukcije *PHO5* promotora u sintetskoj podlozi bez fosfata. Mjerenje aktivnosti provedeno je prema prethodno opisanom protokolu u suspenziji stanica te hranjivoj podlozi u kojoj su stanice uzgojene, a rezultati mjerenja prikazani su na slici 20.

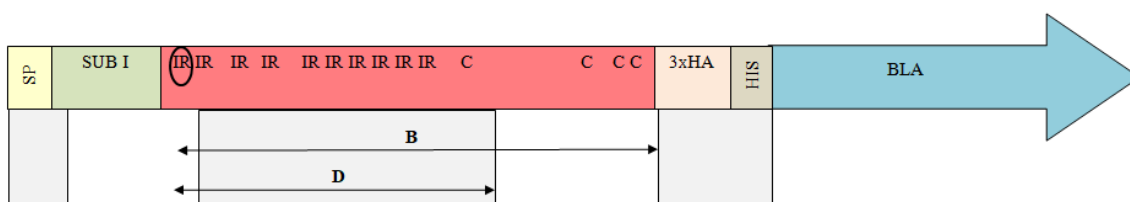
A)



B)



C)



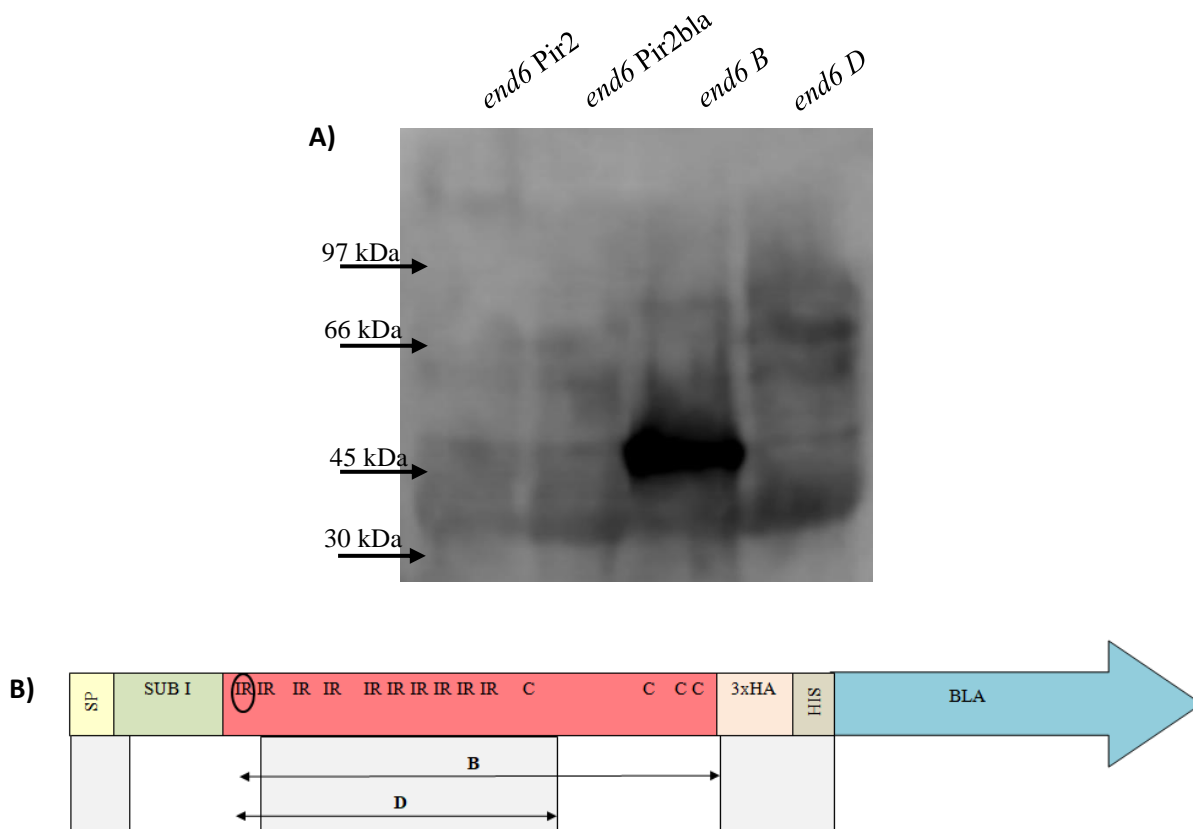
A) aktivnost u suspenziji stanica prikazana kao omjer prosječne izmjerene aktivnosti i količine stanica u reakcijskoj smjesi izražene brojem OD₆₀₀ jedinica, B) postotni udio izmjerene aktivnosti u suspenziji stanica i hranjivoj podlozi, C) Shema konstrukata B i D.

Slika 20. Rezultati mjerenja aktivnosti β-laktamaze

Rezultati mjerenja aktivnosti β -laktamaze pokazuju kako transformanti *end6* sa konstruktima *B* i *D* ne pokazuju značajno povećanje aktivnosti β -laktamaze u usporedbi sa divljim tipom transformiranim istim konstruktima (slika 20.A). Nešto veća aktivnost je pri tome zabilježena u *end6* mutantu transformiranom konstruktom *B*, no izmjerene aktivnosti svih transformanata i dalje su manje od aktivnosti nemodificirane rekombinantne β -laktamaze izmjerene u *end6* mutantu. Više aktivnosti i u ovom je slučaju izmjereno u suspenziji stanica nego u hranjivoj podlozi, a mutanti u endocitozi imaju nešto veću aktivnost u hranjivoj podlozi u usporedbi sa uzorcima iz divljeg tipa kvasca (slika 20.B). Konstrukt *B* u divljem tipu pokazuje dva puta veću aktivnost u hranjivoj podlozi od konstrukta *D* u divljem tipu što je, kako je prethodno objašnjeno, vjerojatno rezultat ukupno veće proizvodnje rekombinantnog proteina koja stoga rezultira i većim otpuštanjem rekombinantnog proteina u hranjivu podlogu.

4.7. IZOLACIJA PROTEINA IZ HRANJIVE PODLOGE

Tijekom mjerenja aktivnosti β -laktamaze u uzorcima hranjive podloge u kojoj su uzgajani mutanti *end6* koji eksprimiraju konstrukte *B* i *D* uočen je značajno veći intenzitet obojenja reakcijske smjese. Pri tome, intenzivnije obojenje primijećeno je u reakcijskoj smjesi konstrukta *B*. Pretpostavka je da do jačeg intenziteta obojenja dolazi zbog veće ukupne količine proteina izlučene u hranjivu podlogu. Pretpostavka je provjerena izolacijom proteina iz hranjive podloge prema prethodno opisanom protokolu (poglavlje Metode), a izolirani proteini analizirani su imunoblotom. Rezultati imunoblota prikazani su na slici 21.



A) Immunoblot analiza proteina izoliranih iz hranjive podloge u kojoj su uzgajane stanice kvasca, B) Shema konstrukata B i D.

Slika 21. Imunoblot proteina izoliranih iz hranjive podloge

Rezultati imunoblot analize pokazuju jače izražene vrpce rekombinantnog proteina u uzorcima hranjive podloge *end6 B* i *end6 D* nego u divljem tipu (slika 21.A). Najizraženija je vrpca rekombinantnog proteina u uzorku *end6 B* što je u skladu sa intenzitetom obojenja reakcijske smjese prilikom mjerenja aktivnosti. Rezultat imunoblota u skladu je sa podacima dobivenim prethodnim mjerenjima te imunoblotom koji pokazuju čvrsto vezanje konstrukta *B* u staničnu stijenku i veću aktivnost β -laktamaze. Takav rezultat sugerira kako zaista dolazi do veće ukupne proizvodnje modificiranog rekombinantnog proteina Pir2bla u konstruktu *B* zbog čega više proteina završava u hranjivoj podlozi te reagira sa supstratom dajući intenzivno obojenje.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu eksperimentalnih podataka dobivenih u ovom istraživanju, moguće je donijeti sljedeće zaključke:

1. Za čvrsto vezanje rekombinantnog proteina u staničnu stijenk u prilikom primjene sustava za imobilizaciju proteina putem proteina Pir2, dovoljna je samo jedna PIR repetitivna sekvenca.
2. Konstrukti Pir2bla rekombinantnog proteina sa očuvanom samo jednom PIR repetitivnom sekvencom pokazuju ukupno veću proizvodnju rekombinantnog proteina zbog čega se i u hranjivu podlogu izlučuje više proteina nego kod ostalih delecijских konstrukata.
3. Optimalan položaj rekombinantnog proteina u sustavu imobilizacije putem Pir2 proteina je ispred PIR sekvence na N-terminalnom kraju proteina Pir2. Takvim položajem, ostvaruje se najveća aktivnost te čvrsto vezanje rekombinantnog proteina u stijenk u kvasca.
4. Analiza utjecaja mutacija u endocitozi na efikasnost ugradnje rekombinantnog proteina u staničnu stijenk u kvasca pokazala je kako mutant *end6* veže više rekombinantnog Pir2bla u staničnu stijenk, dok se u mutantu *end3* on izuzetno slabo veže u staničnu stijenk u usporedbi s divljim tipom kvasca.
5. Transformacija stanica *end6* mutanata sa konstruktima *B* i *D* koji su pokazali čvrsto vezanje u staničnu stijenk u divljeg tipa kvasca ne rezultira značajnijim povećanjem aktivnosti β -laktamaze te stoga ne pokazuje potencijal za primjenu u sustavima imobilizacije.

Sljedeći korak u optimizaciji sustava za imobilizaciju proteina na površini stanice kvasca putem proteina Pir2 bio bi pripremiti konstrukte u kojima je očuvano samo jedno PIR ponavljanje te u kojima je β -laktamaza smještena na N-terminalni dio proteina Pir2 neposredno ispred repetitivne sekvence, što osigurava veću aktivnost enzima.

6. LITERATURA

- 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/ 10.1016/S1567-1356\(03\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00193-4)
- Aimanianda V, Clavaud C, Simenel C, Fontaine T, Delepierre M, Latgé JP (2009) Cell wall β -(1, 6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* structural characterization and in situ synthesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 13401–13412. [https://doi.org/ 10.1074/JBC.M807667200](https://doi.org/10.1074/JBC.M807667200)
- Andrés I, Gallardo O, Parascandola P, Javier Pastor FI, 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](https://doi.org/10.1002/bit.20375)
- Benedetti H, Raths S, Crausaz F, Riezman H (1994) The END3 Gene Encodes a Protein that Is Required for the Internalization Step of Endocytosis and for Actin Cytoskeleton Organization in Yeast, *Molecular Biology of the Cell* **5**, 1023-1037. [https://doi.org/ 10.1091/mbc.5.9.1023](https://doi.org/10.1091/mbc.5.9.1023).
- Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* **28**, 799–808. [https://doi.org/ 10.1002/BIES.20441](https://doi.org/10.1002/BIES.20441)
- Brown JA, Catley BJ (1992) Monitoring polysaccharide synthesis in *Candida albicans*. *Carbohydr. Res.* **227**, 195–202. [https://doi.org/ 10.1016/0008-6215\(92\)85071-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(92)85071-7)
- Canton I, Battaglia G (2012) Endocytosis at the nanoscale, *Chemical Society Reviews* **41**, 2718-2739. [https://doi.org/ 10.1039/C2CS15309B](https://doi.org/10.1039/C2CS15309B)
- Cappellaro C, Mrsa 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](https://doi.org/10.1128/JB.180.19.5030-5037.1998)
- Castillo L, Martinez AI, Garcer 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](https://doi.org/10.1002/yea.1016)

- De Groot PWJ, Ram AF, Klis FM. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 657–675. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.04.002>
- de Nobel H, Lipke PN (1994) Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly?, *Trends in Cell Biology*, **4**, 42-45. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90003-5)
- Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, Mersa V, Tanner W (2006). Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1, 3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11523–11529. <https://doi.org/10.1074/JBC.M600314200>
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355–360. <https://doi.org/10.1002/YEA.320110408>
- Jiang Z, Gao B, Ren R, Tao X, Ma Y, Wei D (2008). Efficient display of active lipase LipB52 with a *Pichia pastoris* cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface. *Bmc Biotechnol.* **8**, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-4>
- Klis FM, Mol P, Hellingwer K, Brul S (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x>
- Kübler E, Riezman H (1993) Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast, *EMBO Journal*, **12**, 2855-2862. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1993.TB05947.X>
- 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>
- Levin D (2005) Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **69**, 262-291. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005>
- Lipke PN, Kurjan J (1992). Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **56**, 180–194. <https://doi.org/10.1128/MR.56.1.180-194.1992>

Liu W, Jia B, Zhao H, Xu L, Yan Y (2010a) Preparation of a whole-cell biocatalyst of *Aspergillus niger* lipase and its practical properties, *J.Agric.Food Chem.*, **58**, 10426-10430. [https://doi.org/ 10.1021/jf1008555](https://doi.org/10.1021/jf1008555)

Liu W, Zhao H, Jia B, Xu , Yan, Y (2010b) Surface display of active lipase in *Saccharomyces cerevisiae* using Cxp2 as an anchor protein, *Biotechnol.Lett* **32**, 255-260. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0138-7>

Lozančić M, Sk Hossain A, Mrša V, Teparić R (2019) Surface Display – An Alternative to Classic Enzyme Immobilization, *Catalysts* **9**, 728, 20. doi: 10.3390/catal9090728. IF= 3.520 (Q2). [https://doi.org/ 10.3390/catal9090728](https://doi.org/10.3390/catal9090728)

Lozančić M (2021) Proteini staničnih stijenki različitih rodova kvasaca i njihov potencijal za izlaganje heterolognih proteina na staničnoj površini (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Matsumoto T, Fukuda H, Ueda M, Tanaka A, Kondo A (2002) Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4517–4522. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4517-4522.2002>

Mrša V, Seidl T, Gentsch M, Tanner W (1997) Specific Labelling of Cell Wall Proteins by Biotinylation. Identification of Four Covalently Linked O-mannosylated Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1145–1154. [https://doi.org/ 10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19970930\)13:12](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19970930)13:12)

Munn A, Stevenson B, Geli M, Riezman H (1995) end5, end6, and end7: Mutations that Cause Actin Delocalization and Block the Internalization Step of Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Biology of the Cell* **6**, 1721-1742. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.12.1721>

Murai T, Ueda M, Yamamura M, Atomi H, Shibasaki Y, Kamasawa N, Osumi M, Amachi T, Tanaka A (1997) Construction of a starch-utilizing yeast by cell surface engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1362–1366. <https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1362-1366.1997>

- Nuoffer C, Jenö P, Conzelmann A, Riezman H (1991) Determinants for Glycophospholipid Anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 Protein to the Plasma Membrane. *Molecular and cellular biology* **11**, 27-37. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.1.27-37.1991>
- Orlean, P. (2012) Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**, 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D (2005) Recombinant protein production in yeasts, *Mol Biotechnol.* **31**, 245-259. <https://doi.org/10.1385/MB:31:3:245>
- Qadota H, Python CP, Inoue SB, Arisawa M, Anraku Y, Zheng Y, Watanabe T, Levin DE, Ohya Y (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1, 3- β -glucan synthase. *Science* **272**, 279–281. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5259.279>
- Rodrigues G, Pais C (2000) The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Food Technol. Biotechnol.* **38**, 27–32.
- Russo P, Simonen M, Uimari A, Teesalu T, Makarow M (1993) Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast HSP150 gene encoding a secretory glycoprotein. *Mol. Gen. Genet. MGG* **239**, 273–280. <https://doi.org/10.1007/BF00281628>
- Salo H, Sievi E, Suntio T, Mecklin M, Mattila P, Renkonen R, Makarow M (2005) Co-expression of two mammalian glycosyltransferases in the yeast cell wall allows synthesis of sLex, *FEMS Yest Res* **5**, 341-350. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.11.007>
- Sato N, Matsumoto T, Ueda M, Tanaka A, Fukuda H, Kondo A (2002) Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 469–474. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1121-6>
- Schreuder M, Brekelmans S, Van Den Ende H, Klis FM (1993) Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 399–409. <https://doi.org/10.1002/YEA.320090410>

Tanaka T, Matsumoto S, Yamada M, Yamada R, Matsuda F, Kondo A (2013) Display of active beta-glucosidase on the surface of *Schizosaccharomyces pombe* cells using novel anchor proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 4343–4352. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4733-0>


Teparić R, Mrša V (2013) Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls, *Current Genetics* **59**, 171-185. <https://doi.org/10.1007/S00294-013-0403-0>

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.

Yanase S, Hasunuma T, Yamada R, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A (2010) Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 381–388. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2784-z>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja ANA MATIČEVIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis