

Konstrukcija i mjerenje aktivnosti rekombinantnog proteina Pir2bla_O izloženog na površini stanične stijenke

Prekpalaj, Stefani

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:768089>

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
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Stefani Prekpalaj
0058217664

**Konstrukcija i mjerenje aktivnosti rekombinantnog
proteina Pir2bla_O izloženog na površini stanične stijenke**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija II

Mentor: doc. dr. sc. Bojan Žunar

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Konstrukcija i mjerenje aktivnosti rekombinantnog proteina Pir2bla_O izloženog na površini
stanične stijenke**

Stefani Prekpalaj, 0058217664

Sažetak:

Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* mogu proteine koje izlučuju vezati na svoju staničnu stijenku. Pritom nativni proteini kvasca *S. cerevisiae* često sadrže nestrukturiranu spojnicu, tj. dio polipeptidnog lanca koji se ne smata u unaprijed predodređenu konformaciju. Cilj ovog rada bio je ispitati kako na efikasnost izlaganja na staničnu stijenku proteina izvjestitelja Pir2bla_L utječe njegova nestrukturirana spojnica. U tu svrhu je iz plazmida pRSII423-pir2bla_L uklonjen dio koji kodira za nestrukturiranu spojnicu proteina izvjestitelja, čime je konstruiran plazmid pRSII423-pir2bla_O, koji kodira za protein izvjestitelj Pir2bla_O. Novokonstruirani plazmid zatim je transformiran u stanice kvasca *S. cerevisiae* te je efikasnost izlaganja proteina Pir2bla_O na površini stanične stijenke pomoću nitrocefinskog testa uspoređena s efikasnošću izlaganja izvornog proteina Pir2bla_L. Dobiveni rezultati pokazali su da je uklanjanje spojnice smanjilo efikasnost izlaganja proteina izvjestitelja na staničnoj stijenci (102 % naspram 152 %), ali da navedena razlika nije statistički značajna ($p = 0,06$).

Ključne riječi: Pir2 protein, β -laktamaza, rekombinantni proteini, proteini stanične stijenke, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Rad sadrži: 27 stranica, 10 slika, 4 tablica, 29 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Bojan Žunar

Datum obrane: 11. rujna 2023. god.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Construction and activity determination of recombinant protein Pir2bla_O displayed on the yeast cell surface

Stefani Prekpalaj, 0058217664

Abstract:

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* can bind the proteins it secretes to its cell wall. The native proteins of the yeast *S. cerevisiae* often contain an unstructured linker, a part of the polypeptide chain that does not fold into a predetermined conformation. The aim of this work was to examine how the unstructured linker affected the cell wall display efficiency of the reporter protein Pir2bla_L. For this purpose, the sequence encoding unstructured linker was removed from the plasmid pRSII423-pir2bla_L, thus constructing the plasmid pRSII423-pir2bla_O, which was then transformed into yeast *S. cerevisiae*. Using the nitrocefin test, the cell wall display efficiency of the newly constructed protein Pir2bla_O and original protein Pir2bla_L was compared. The results showed that the removal of the linker reduced the efficiency of the display of the reporter protein on the cell wall (102% vs. 152%), but the difference was not statistically significant ($p = 0.06$).

Keywords: Pir2 protein, β -lactamase, recombinant proteins, cell wall proteins, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 27 pages, 10 figures, 4 tables, 29 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Bojan Žunar, PhD, Assistant Professor

Thesis defended: September 11th, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. STANIČNA STIJENKA KVASCA <i>S. cerevisiae</i>	2
2.3. IZLAGANJE HETEROLOGNIH PROTEINA NA POVRŠINU STANIČNE STIJENKE KVASCA	4
2.4. PIR PROTEINI KAO SIDRA ZA IZLAGANJE PROTEINA NA POVRŠINU STANIČNE STIJENKE	5
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	7
3.1. MATERIJALI.....	7
3.1.1. KEMIKALIJE.....	7
3.1.2. UREĐAJI	9
3.1.3. HRANJIVE PODLOGE	10
3.1.4. LABORATORIJSKI SOJEVI	11
3.1.5. PLAZMIDI.....	11
3.1.6. POČETNICE	14
3.2. METODE	14
3.2.1. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM	14
3.2.2. AGARozNA ELEKTROFOREZA DNA	14
3.2.3. IZOLACIJA DNA IZ AGARozNOG GELA.....	15
3.2.4. SASTAVLJANJE FRAGMENTA DNA PO GIBSONU	15
3.2.5. TRANSFORMACIJA BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i>	15
3.2.6. IZOLACIJA PLAZMIDA IZ BAKTERIJE <i>E.coli</i>	16
3.2.7. SEKVENCIRANJE PLAZMIDNE DNA PO SANGERU	16
3.2.8. TRANSFORMACIJA KVASCA <i>S. cerevisiae</i> POMOĆU LITIJEVOG ACETATA	16
3.2.9. INDUKCIJA PROMOTORA <i>PHO5</i> U STANICAMA KVASCA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.2.10. MJERENJE AKTIVNOSTI B-LAKTAMAZE VEZANE NA STANIČNU STIJENKU KVASCA	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. REZULTATI.....	18
4.1.1. SERIJA PLAZMIDA PRSII423-PIR2BLA	18
4.1.2. KONSTRUKCIJA PLAZMIDA PRSII423-PIR2BLA_O	19
4.1.3. KONSTRUKCIJA SOJA KVASCA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
4.1.4. MJERENJE AKTIVNOSTI B-LAKTAMAZE VEZANE NA POVRŠINU STANIČNE STIJENKE.....	21

4.2. RASPRAVA	23
5. ZAKLJUČCI.....	24
6. POPIS LITERATURE	25

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* modelni je organizam zbog velikog broja poželjnih karakteristika. Kao takav, ovaj jednostanični eukariot već se već dugi niz godina koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji.

Stanična stijenka kvasca čvrsta je i elastična struktura u čijem se vanjskom sloju nalaze manoproteini. Putem ovih manoproteina moguće je na površinu stanične stijenke vezati rekombinantne proteine od interesa, koji mogu biti prokariotskog ili eukariotskog podrijetla i koji se u svrhu uspješnog izlaganja na površnu stanice fuzioniraju s jednim od nativnih proteina stanične stijenke, npr. jednim od Pir proteina. Pritom se za navedenu fuziju često koriste nativni proteini stanične stijenke koji sadrže nestrukturiranu spojnicu, tj. dio polipeptidnog lanca koji se ne smata u unaprijed predodređenu konformaciju.

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati kako nestrukturirana spojnicu proteina izvjestitelja Pir2bla_L utječe na efikasnost njegovog izlaganja na površinu stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*. U tu svrhu konstruiran je plazmid pRSII423-pir2bla_O koji kodira za protein izvjestitelj Pir2bla_O, protein koji je identičan proteinu pir2bla_L, ali koji ne sadrži njegovu nestrukturiranu spojnicu. Nakon što je plazmid pRSII423-pir2bla_O konstruiran, on je transformiran u standardni soj BY 4741 kvasca *S. cerevisiae* te je korištenjem nitrocefinskog testa uspoređena efikasnost izlaganja na staničnu stijenku novokonstruiranog proteina izvjestitelja Pir2bla_O s efikasnošću izlaganja izvornog proteina izvjestitelja Pir2bla_L.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariot, poznat i kao pekarski ili pivski kvasac. Stanica ovog kvasca organizirana je u organele koje su od citoplazme odvojene staničnom membranom. Stanice kvasca ovalnog su oblika te im veličina ovisi o njihovom ploeditetu. Haploidne stanice su manje te se razmnožavaju nespolno – pupanjem, dok su diploidne stanice veće te se mogu razmnožavati spolno i nespolno. Haploidna stanica ima generacijsko vrijeme oko 90 min pri 28-30 °C. Kvasac *S. cerevisiae* jedan je od najvažnijih organizama prehrambene industrije jer može fermentirati određene šećere u etanol. Kao takva, ova vrsta koristi se u proizvodnji alkoholnih pića – piva, vina, jakih alkoholnih pića, i u proizvodnji pekarskih proizvoda – dizanih tijesta.

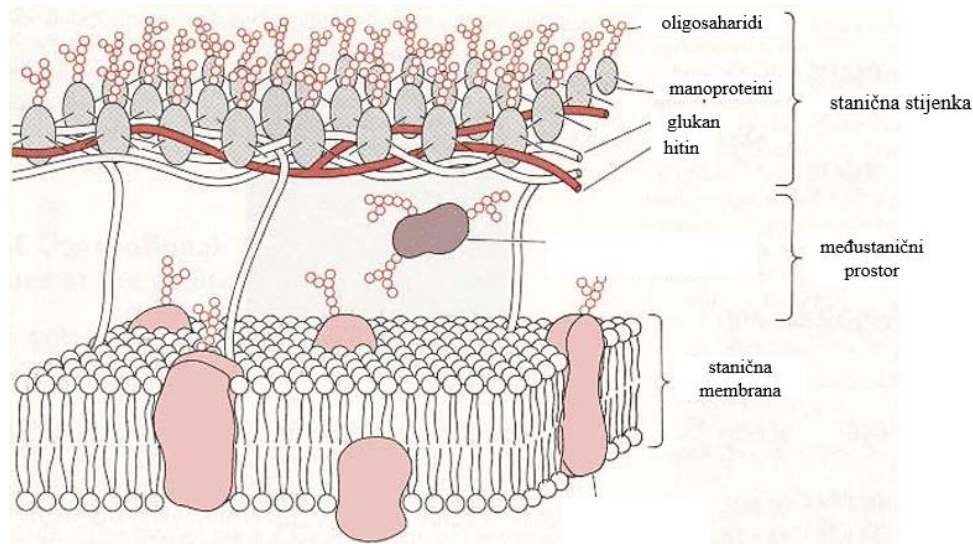
Kvasac *S. cerevisiae* jedan je od najvažnijih modelnih mikroorganizama (Duina, 2014). Ova vrsta posjeduje velik broj poželjnih karakteristika, kao što su kratko generacijsko vrijeme, jednostavna građa stanice, jednostavna i niska cijena uzgoja te nepatogenost. Nadalje, ovaj kvasac lako se transformira stranom DNA, dobro raste na kompleksnim i kemijski definiranim hranjivim podlogama te formira kolonije na podlogama s agarom.

Genom kvasca *S. cerevisiae* prvi je potpuno sekvencirani eukariotski genom (Goffeau i sur., 1996). Genom ovog kvasca sastoji se od 13,5 Mb raspodijeljenih unutar 16 kromosoma te je oko 70 % njegove DNA kodirajuće. Uspješnom korištenju kvasca kao modelnog organizma doprinijela je činjenica da je veliki broj njegovih staničnih procesa usporediv s procesima humanih stanica pa je za 47 % esencijalnih gena kvasca identificiran humani ortolog koji može preuzeti njihovu funkciju (Nielsen, 2019).

2.2. Stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* izvanstanična je struktura koja okružuje stanicu te predstavlja oko 30 % suhe tvari stanice. Kao takva, to je čvrsta i elastična konstrukcija koja određuje oblik stanice, održava osmotsku stabilnost stanice te štiti stanicu od vanjskih utjecaja. Sastav i struktura stanične stijenke variraju te ovise o fazi staničnog ciklusa i uvjetima rasta stanice (Kiels i sur., 2006).

Glavne komponente stanične stijenke su polisaharidi β -1,3-glukan, β -1,6-glukan i hitin te proteini, najčešće manoproteini. Stanična stijenka sastoji se od dva sloja (Slika 1). Vanjski sloj sastoji se od glikoliziranih manoproteina i on sudjeluje u signaliziranju među stanicama. Unutarnji sloj, od kojeg potječe mehanička čvrstoća stijenke, sastoji se od β -1,3-glukana, β -1,6-glukana i hitina (Kiels i sur., 2002).



Slika 1. Shematski prikaz stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* (Paciello, 2023)

β -1,3-glukan polimer je koji se sastoji od monomernih jedinica glukoze povezanih glikozidnom vezom između prvog i trećeg ugljikovog atoma. Lanac β -1,3-glukana u staničnoj stijenci ima stupanj polimerizacije od oko 1500 glukoznih jedinica, sintetizira se djelovanjem kompleksa β -1,3-glukan sintaze te predstavlja okosnicu stanične stijenke. Lanac je oblika opruge koja stijenci omogućava čvrstoću, ali i elastičnost. β -1,3-glukan veže se na reducirajuće krajeve hitina preko nereducirajućih krajeva lanaca pomoću β -1,4-glikozidne veze (Lesage i Bussay, 2006).

β -1,6-glukan polimer je koji se sastoji od monomernih jedinica glukoze povezanih glikozidnom vezom između prvog i šestog ugljikovog atoma. β -1,6-glukan razgranati je polimer topljiv u vodi, stupnja polimerizacije od oko 130 glukoznih jedinica. β -1,6-glukan služi za povezivanje i umrežavanje komponenata stanične stijenke. Smatra se da sinteza lanaca β -1,6-glukana započinje u endoplazmatskom retikulumu nastajanjem primarne strukture vezane na proteine te se zatim nastavlja u Golgijevom aparatu djelovanjem glukoziltransferaze. Konačno, sinteza β -1,6-glukana dovršava se na površini stanice (Montijn i sur., 1999).

Hitin je polimer od oko 190 jedinica molekula N-acetilglukozamina povezanih β -1,4-glikozidnom vezom te predstavlja 1-2 % suhe tvari stanične stijenke. Lanci hitina povezuju se u mikrovlakna koja se stabiliziraju vodikovim vezama (Lesage i Bussay, 2006). Dio hitina se u staničnoj stijenci nalazi u slobodnom obliku, dio je vezan za β -1,3-glukan preko svojeg reducirajućeg kraja te se većinom nalazi na području oko ožiljka pupa na stanici majci, a dio je preko β -1,6-glukana vezan za β -1,3-glukan i manoproteine te se nalazi u unutarnjem sloju stanične stijenke (Orlean, 2012).

Manoproteini su glikoproteini koji čine vanjski sloj stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Pritom ugljikohidratna frakcija manoproteina može sačinjavati 50-95 % mase molekule (Lipke i Ovalle, 1998). Manoproteini su glikolizirani preko N-glikozidne veze, koja nastaje između N-acetilglukozamina i ostatka asparagina, ili O-glikozidne veze, koja nastaje između kratkih lanaca manoze i aminokiselinskih ostataka serina ili treonina (Lesage i Bussay, 2006). Postoje dvije klase proteina koje se kovalentno vežu na staničnu stijenu kvasca: GPI-vezani proteini i Pir proteini. GPI-vezani proteini stanične stijenke su proteini koji se na staničnu stijenu vežu na β -1,6-glukan preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog sidra (Kiels i sur., 2002). Pir proteini, koji sadrže višestruko ponovljene Pir sekvence, izravno su vezani esterskom vezom na β -1,3-glukan preko glutaminskih ostataka prisutnih u ponovljenim sekvencama (Orlean, 2012).

2.3. Izlaganje heterolognih proteina na površinu stanične stijenke kvasca

Heterologni proteini koji se žele izložiti na površinu stanične stijenke najčešće se fuzioniraju s jednim od proteina stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Takvi proteini stanične stijenke djeluju kao sidra preko kojih se protein od interesa veže na staničnu stijenu (Yang i sur., 2019), sadrže signalnu sekvencu koja omogućava učinkovit transport fuzijskog proteina na površinu stanične stijenke te imobiliziraju ciljani protein na površini stijenke. Međutim, također je važno da takvi proteini stanične stijenke ne utječu na stabilnost i aktivnost proteina od interesa (Tanaka i sur., 2012).

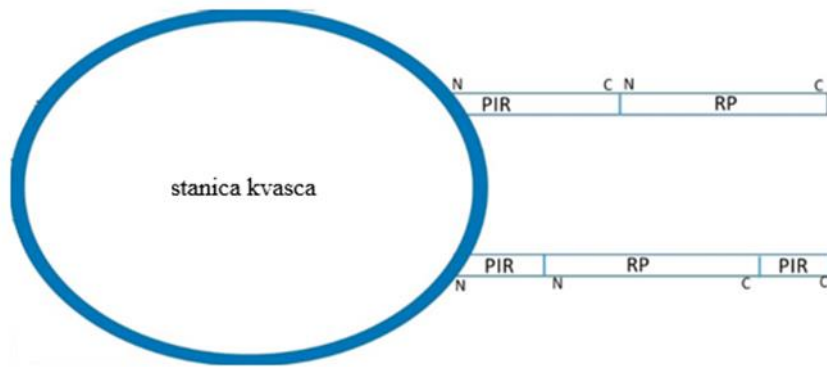
Danas postoje metode koje omogućuju kovalentno i nekovalentno povezivanje heterolognih proteina na staničnu stijenu. Za kovalentno povezivanje često se koriste GPI-vezani i Pir proteini, dok za nekovalentno povezivanje služe proteini poput Flo1 (Teparić i Mrša, 2016).

Pritom, ovisno o izabranom fuzijskom partneru, protein stanične stijenke može biti pripojen na N- ili C-kraj proteina stanične stijenke, ili čak umetnut unutar aminokiselinskog slijeda proteina stanične stijenke. Tako se heterologni proteini pripajaju na N-kraj GPI-vezanih proteina, budući da su GPI-vezani proteini, npr. Aga1, Sed1 i Cwp2, vezani na staničnu stijenkku preko svojeg C-kraja (Tanaka, 2012). S druge strane, Flo1 (flokulacijski protein 1) je protein stanične stijenke koji se nekovalentno veže na manan, jedan od polisaharida stanične stijenke, pomoću flokulacijske domene koja je smještena blizu njegovog N-kraja. Sukladno tome, N-kraj heterolognog proteina pripaja se na C-kraj proteina Flo1. Pritom je heterologni protein od interesa moguće pripojiti na dvije inačice proteina Flo1, FS (*engl.* Flo1 short) i FL (*engl.* Flo1 long), pri čemu obje sadrže signalnu sekvencu i funkcionalnu flokulacijsku domenu (Andreu i del Olmo, 2018).

2.4. Pir proteini kao sidra za izlaganje proteina na površinu stanične stijenke

Stanica kvasca *S. cerevisiae* kodira za pet srodnih Pir proteina (Pir1-Pir5). Gledajući od N-kraja, Pir proteini nose signalnu sekvencu, sekvencu koju cijepa Kex2 proteaza, različiti broj ponovljenih Pir sekvenci dugačkih 18-19 aminokiselinskih ostataka i visokoočuvani C-terminalni dio proteina koji sadrži četiri precizno smještena cisteinska ostatka. Pir proteini se na staničnu stijenkku najčešće vežu preko esterske veze između karboksilne grupe glutaminskog ostatka prisutnog u ponavljajućoj Pir sekvenci i β -1,3-glukana (Andreu i del Olmo, 2018). Pritom je za kovalentno vezanje Pir proteina na staničnu stijenkku kvasca esterskom vezom dovoljna samo jedna od ponavljajućih Pir sekvenci (Sumita i sur, 2005).

Pir proteini također se koriste za izlaganje heterolognih proteina na površinu stanične stijenke. S obzirom na to da se Pir proteini na staničnu stijenkku vežu preko svog N-terminalnog dijela, najčešće se protein od interesa preko svojeg N-kraja fuzionira s C-krajem Pir proteina, čime se heterologni protein kovalentno veže na staničnu stijenkku preko ponavljajućih Pir sekvenci (Slika 2). Također, moguće je heterologni protein umetnuti i unutar aminokiselinskog slijeda Pir proteina ili ga umetnuti tako da zamijeni dio Pir proteina. Kako bi izlaganje na površinu stanične stijenke bilo efikasno, heterologni protein koji se na ovaj način fuzionira s Pir proteinom ne smije sadržavati više od 800 aminokiselinskih ostataka te ne smije imati preveliki broj cisteinskih ostataka (Yang i sur, 2014).



Slika 2. Shematski prikaz izlaganja rekombinantnih Pir proteina na površinu stanične stijenke kvasca *S cerevisiae*. Oznake: PIR – Pir protein stanične stijenke, RP – rekombinantni proteini (Lozančić i sur., 2019)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- agar – Biolife (Milano, Italija)
- agarozna – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- tripton – Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- kvašćev ekstrakt – Biolife (Milano, Italija)
- deionizirana voda
- 96 %-tni etanol – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- standard za elektroforezu – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- boja za elektroforezu – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- etidijev bromid – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- ampicilin – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- glukoza – Lach-Ner d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- uracil – Acros Organics (Geel, Belgija)
- leucin – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- asparagin – Acros Organics (Geel, Belgija)
- triptofan – Acros Organics (Geel, Belgija)
- polietilen glikol (PEG) 3350 – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- litijev acetat – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- jednolančani DNA „nosač“ (ssDNA carrier, 2,0 mg/ml) – Invitrogen (Waltham, Massachusetts, SAD)
- nitrocefim – Calbiochem (San Diego, SAD)
- kalijev dihidrogenfosfat – Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- kalijev hidrogenfosfat – Acros Organics (Geel, Belgija)
- kalijev klorid – Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)

- natrijev klorid – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- natrijev citrat – T.T.T. d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- magnezijev sulfat heptahidrat – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- kalcijev klorid dihidrat – Merck (Darmstadt, Njemačka)
- kemikalije za lančanu reakciju polimerazom: 5x koncentrirani Q5 reakcijski pufer, 10 mM dNTP-ovi, Q5 polimeraza – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- kemikalije za sastavljanje fragmenata DNA po Gibsonu: NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- kemikalije za izolaciju DNA iz gela: NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up – Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)
- kemikalije za izolaciju plazmida DNA iz bakterije *E. coli*: NucleoSpin[®] Plasmid – Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)
- kemikalije za transformaciju bakterije *E. coli*: High Efficiency Transformation Protocol – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- smjesa „drop-out“ (**Tablica 1**)
- elementi u tragovima (**Tablica 2**)
- 1.000x koncentrirana otopina biotina i vitamina (**Tablica 3**)
- 250x koncentrirana otopina riboflavina i vitamina (**Tablica 4**)

Tablica 1. Sastav smjese „drop-out“

adenin	3,0 g	L-glutaminska kiselina	2,0 g
inozitol	2,0 g	L-izoleucin	2,0 g
L-arginin	2,0 g	L-metionin	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-tirozin	2,0 g
L-fenilalanin	2,0 g	L-treonin	2,0 g
L-glicin	2,0 g	L-valin	2,0 g
L-glutamin	2,0 g	p-aminobenzojeva kiselina	0,2 g

Tablica 2. Sastav 500x koncentrirane otopine elemenata u tragovima

amonijev molibdat tetrahidrat ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O)	0,10 g/l
borna kiselina (H ₃ BO ₃)	0,25 g/l
bakrov sulfat pentahidrat (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0,20 g/l
cinkov sulfat heptahidrat (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	0,20 g/l
kalijev jodid (KI)	0,05 g/l
magnezijev sulfat heptahidrat (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0,20 g/l
željezov(III)klorid heksahidrat (FeCl ₃ · 6H ₂ O)	0,10 g/l

Tablica 3. Sastav 1.000x koncentrirane otopine biotina i vitamina

biotin (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S)	0,02 g/l
folna kiselina (C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆)	0,02 g/l
kalcijev pantotenat (C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀)	4,00 g/l
niacin (nikotinska kiselina, C ₆ H ₅ NO ₂)	4,00 g/l
piridoksal hidroklorid (C ₈ H ₁₀ ClNO ₃)	4,00 g/l
tiamin hidroklorid (C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS)	4,00 g/l

Tablica 4. Sastav 250x koncentrirane otopine riboflavina i vitamina

inozitol (C ₆ H ₁₂ O ₆)	0,50 g/l
p-aminobenzojeva kiselina (C ₇ H ₇ NO ₂)	0,05 g/l
riboflavin (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆)	0,05 g/l

3.1.2. Uređaji

- autoklav 2540M – Tuttnauer (Breda, Noord-Brabant, Nizozemska)
- centrifuga Centric 322A – Tehnice (Podplat, Slovenija)
- centrifuga 5425 R – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- centrifuga LLG-uniCFUGE 2/5 – Lab Logistics Group GmbH (Meckenheim, Njemačka)
- PCR uređaj Mastercycler nexus 12 – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- vorteks VM-10 – Witeg (Wertheim, Njemačka)
- spektrofotometar Helios γ – Thermo Electron Corporation (Waltham, Massachusetts, SAD)
- spektrofotometar BioSpectrometer Basic – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)

- spektrofotometar NanoDrop One – ThermoFischer Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- tresilica New Brunswick Innova 40 – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- tresilica TS-100C – Biosan (Riga, Latvija)
- transiluminator Skylight Super-Blue – Vilber (Collégien, Francuska)
- transiluminator Uvidoc HD6 – Uvitec Ltd (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- magnetna miješalica MMS-3000 – Biosan (Riga, Latvija)
- kadice za elektroforezu Mini-Sub Cell GT – Bio-Rad (Hercules, California, SAD)
- napajanje za elektroforezu Mighty Slim Sx250 – Hoefer (Kansas City, Missouri, SAD)

3.1.3. Hranjive podloge

Hranjive podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*:

- LB – kruta hranjiva podloga: tripton (10 g/l), kvašćev ekstrakt (5 g/l), NaCl (5 g/l), agar (15 g/l), ampicilin (100 µg/ml)
- 2xYT – tekuća hranjiva podloga: tripton (16 g/l), kvašćev ekstrakt (10 g/l), NaCl (5 g/l), ampicilin (100 µg/ml dodaje se prije naciepljivanja)

Hranjive podloge za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*:

- YPD – kompleksna podloga za uzgoj kvasca: kvašćev ekstrakt (10 g/l), pepton (20 g/l), glukoza (20 g/l)
- YNBP⁺ His⁻ – tekuća hranjiva podloga s fosfatom: YNB-AA (6,7 g/l), smjesa „drop-out“ (1,6 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), uracil (0,08 g/l), leucin (0,16 g/l), triptofan (0,08 g/l), 50 %-tna otopine glukoze (20 ml, dodaje se neposredno prije korištenja)
- YNBP⁻ His⁻ – tekuća hranjiva podloga bez fosfata: KCl (1 g/l), asparagin (2 g/l), MgSO₄ · 7 H₂O (0,5 g/l), NaCl (0,1 g/l), CaCl₂ · 2H₂O (0,1 g/l), natrijev citrat (5,882 g/l), smjesa „drop-out“ (2 g/l), 500x konc. otopina elemenata u tragovima (1 ml/l), uracil (0,08 g/l), leucin (0,16 g/l), triptofan (0,08 g/l), 250x konc. otopina riboflavina i vitamina (2 ml), 1.000x konc. otopina biotina i vitamina (500 µl), 50 %-tna otopine glukoze (20 ml, se dodaje se neposredno prije korištenja)

3.1.4. Laboratorijski sojevi

- soj NEB Stable bakterije *E. coli*

genotip: F' *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ (*lacZ*)*M15* *zzf::Tn10* (Tet^R)/ Δ (*ara-leu*) 7697 *araD139* *fhuA* Δ *lacX74* *galK16* *galE15* *e14-* Φ 80*dlacZ* Δ *M15* *recA1* *relA1* *endA1* *nupG* *rpsL* (Str^R) *rph* *spoT1* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)

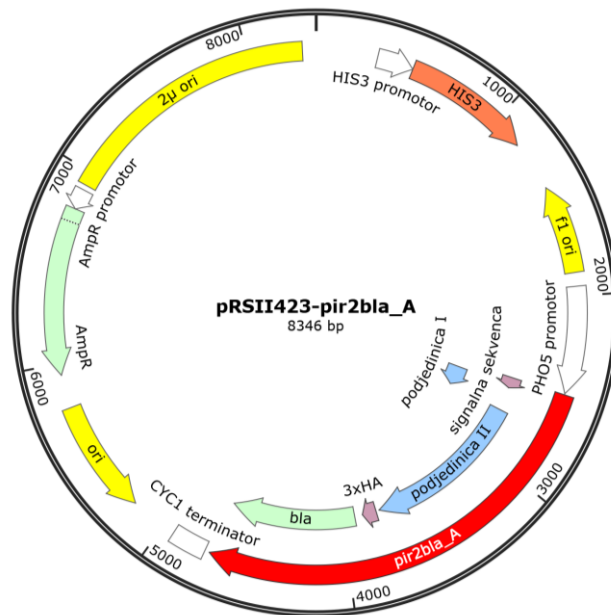
- transformanti soja BY 4741 kvasca *S. cerevisiae*

genotip: MATa *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0

3.1.5. Plazmidi

Plazmid pRSII423-pir2bla_A

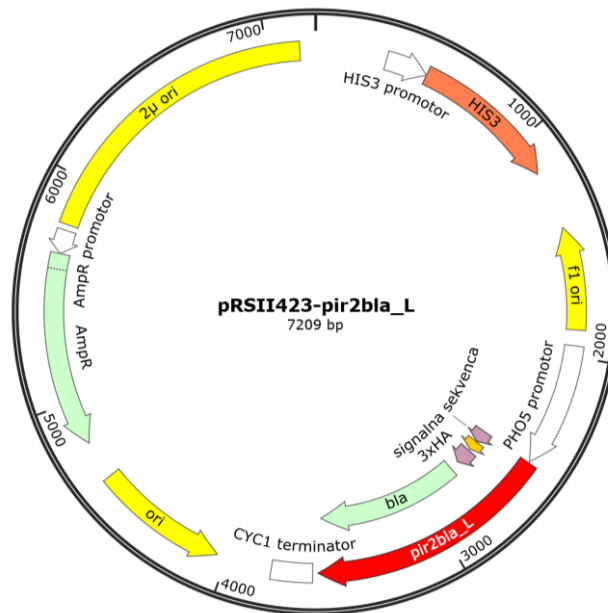
Plazmid pRSII423-pir2bla_A (Slika 3) kvašćev je replikativni plazmid koji kodira za fuzijski protein Pir2bla_A pod kontrolom inducibilnog promotora *PHO5*. Fuzijski protein Pir2bla_A sastoji se od proteina Pir2 kvasca *S. cerevisiae*, nestrukturirane spojnice koja kodira za tri puta uzastopno ponovljenu hemaglutininsku (HA) oznaku i β -laktamaze, tj. enzima koji tijekom provođenja nitrocefinskog testa služi kao enzim izvjestitelj. Ovaj fuzijski protein može se preko svog N-terminalnog kraja kovalentno vezati za staničnu stijenkku. Stanice kvasca transformirane ovim plazmidom su tijekom provođenja nitrocefinskog testa korištene kao pozitivna kontrola.



Slika 3. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla_A. Oznake: 2 μ ori – ishodište replikacije plazmida 2 μ , HIS3 – selektivni biljeg koji stanicama kvasca *S. cerevisiae* omogućava rast na podlozi bez histidina, HIS3 promotor – promotor gena HIS3, AmpR – selektivni biljeg koji stanicama bakterije *E. coli* omogućava rast na podlozi s ampicilinom, AmpR promotor – promotor gena AmpR, ori – plazmidno ishodište replikacije bakterije *E. coli*, f1 ori – ishodište replikacije filamentoznog bakteriofaga M13, PHO5 promotor – promotor PHO5 kvasca *S. cerevisiae* koji se inducira kada u podlozi nedostaje fosfata, pir2bla_A – otvoreni okvir čitanja (ORF) koji kodira za fuzijski protein Pir2bla_A, signalna sekvenca – slijed nukleotida koji kodira za signalnu sekvencu proteina Pir2, podjedinica I – slijed nukleotida koji kodira za podjedinicu I proteina Pir2, podjedinica II – slijed nukleotida koji kodira za podjedinicu II proteina Pir2, 3xHA – nestrukturirana spojnica, tj. tri puta uzastopce ponovljena hemaglutininska oznaka, bla – ORF koji kodira za enzim β -laktamazu, CYC1 terminator – terminator CYC1 kvasca *S. cerevisiae*.

Plazmid pRSII423-pir2bla_L

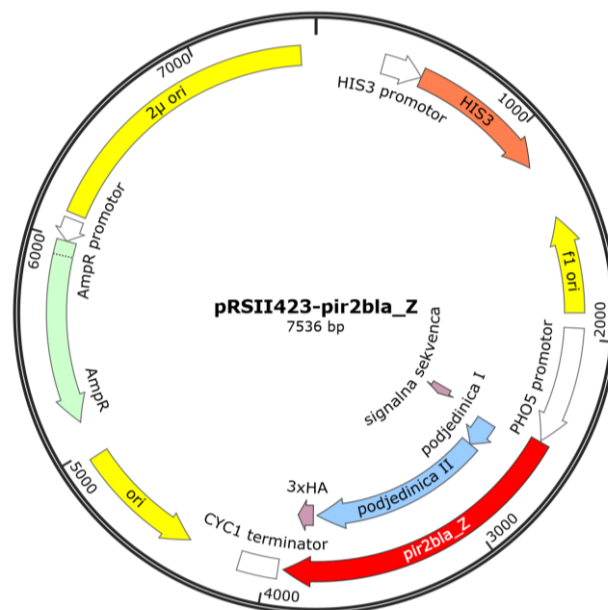
Plazmid pRSII423-pir2bla_L (Slika 4) kvašćev je replikativni plazmid koji kodira za fuzijski protein Pir2bla_L. Za razliku od proteina Pir2bla_A, protein Pir2bla_L na svojem N-terminalnom kraju umjesto punog proteina Pir2 nosi samo njegovu signalnu sekvencu i jedno Pir ponavljanje, koje mu omogućuje kovalentno vezanje na β -1,3-glukan stanične stijenke. Ovaj plazmid je korišten za konstrukciju plazmida pRSII423-pir2bla_O.



Slika 4. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla_L. Oznake su identične kao na Slici 3.

Plazmid pRSII423-pir2bla_Z

Plazmid pRSII423-pir2bla_Z (Slika 5) kvašćev je replikativni plazmid koji kodira za protein Pir2bla_Z. Za razliku od fuzijskog proteina Pir2bla_A, protein Pir2bla_Z ne sadrži enzim β-laktamazu. Kao takve, stanice kvasca koje su nosile ovaj plazmid su tijekom provođenja nitrocefinskog testa služile kao negativna kontrola.



Slika 5. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla_Z. Oznake su identične kao na Slici 3.

3.1.6. Početnice

— pir2bla-O-f

CTACAACAACCTGGCCCTAGAGGTTTCGCGAGGTTGCCAC

— pir2bla-O-r

TCTAGGGCCAGTTGTTGT

— b-pho5-seq

TGATGTTTTGCTAAGTCG

3.2. Metode

3.2.1. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) provedena je korištenjem DNA polimeraze Q5. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 50 μ l. Reakcijska smjesa pripravljena je tako da je u 33,0 μ l deionizirane vode dodano 10,0 μ l 5x koncentriranog Q5 reakcijskog pufera, 1,0 μ l otopine dNTP-a koncentracije 10 mM, 2,5 μ l početnice pir2bla-O-f koncentracije 10 μ M i 2,5 μ l početnice pir2bla-O-r koncentracije 10 μ M. Pripravljena reakcijska smjesa je promiješana te je u nju dodano 0,5 μ l DNA kalupa i 0,5 μ l DNA polimeraze Q5. Reakcijska smjesa zatim je prenesena u uređaj za provođenje reakcije PCR. Tijekom reakcije PCR, početna denaturacija trajala je 30 s pri temperaturi od 98 °C, nakon čega je uslijedilo 30 ciklusa umnažanja željenog fragmenta. U svakom ciklusu korak denaturacije proveden je 10 s pri 98 °C, korak sparivanja početnica 20 s pri 64 °C te korak ekstenzije 4 min i 40 s pri 72 °C. Korak završne ekstenzije proveden je 10 min pri 72 °C.

3.2.2. Agarozna elektroforeza DNA

Agarozna elektroforeza DNA provedena je u 0,7 % agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem 0,21 g agaroze u 30 ml 1x koncentriranog pufera TAE, zagrijavanjem dobivene otopine do vrenja. Ohlađena otopina prelivena je u pripremljeni kalup za agarozni gel, u koji je zatim umetnut češljic za formiranje jažica. Nakon što je gel polimerizirao, češljic je uklonjen, a kalup je, zajedno s gelom, prenesen u kadicu za elektroforezu i uronjen u pufer TAE. Nakon što su uzorci DNA nanoseni na gel, elektroforeza je provedena pri naponu od 140 V u trajanju

od 45 min.

3.2.3. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Nakon provedene elektroforeze, gel je 20 min inkubiran u etidijevom bromidu koncentracije 0,5 mg/L, nakon čega su pomoću transiluminatora Skylight Super-Blue vizualizirane razdvojene vrpce DNA. Zatim je komadić gela koji sadrži željeni fragment DNA pomoću skalpela izrezan iz gela i prenesen u mikrokivetu te je iz njega DNA pročišćena pomoću kompleta kemikalija NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, prema uputama proizvođača. Ukratko, u mikrokivetu je dodano 200 µl pufera NTI na svakih 100 mg gela te je uzorak inkubiran 5 min na 50 °C. Potom je 700 µl dobivene otopine naneseo na kolonu za vezanje DNA, koja je zatim centrifugirana 30 s na 11.000 g. Kolona je zatim centrifugiranjem 30 s pri 11.000 g dva puta isprana s po 700 µl pufera NT3, a potom i osušena centrifugiranjem te inkubacijom kolone 3 min na 70 °C. Vezana DNA je eluirana s kolone dodatkom 15 µl pufera NE izravno na matricu kolone, inkubacijom kolone 1 min na sobnoj temperaturi i centrifugiranjem 1 min pri 11.000 g.

3.2.4. Sastavljanje fragmenata DNA po Gibsonu

Sastavljanje fragmenata DNA provedeno je pomoću smjese enzima NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix, prema uputama proizvođača. Ukratko, 3 µl otopine DNA izolirane iz agaroznog gela pomiješano je s 3 µl smjese enzima NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix i inkubirano 15 min na 50 °C.

3.2.5. Transformacija bakterije *Escherichia coli*

Kompetentne stanice soja NEB Stable bakterije *E. coli* odmrznute su na ledu te je na njih dodano 2 µl plazmidne DNA. Tako pripremljena transformacijska smjesa promiješana je laganim tapkanjem mikrokivete 4-5 puta. Smjesa je zatim inkubirana na ledu 30 min te izložena toplinskom šoku u trajanju od 30 s na 42 °C. Reakcijska smjesa zatim je ponovno 5 min inkubirana na ledu, nakon čega je na nju dodano 950 µl otopine hranjivog medija SOC, prethodno zagrijanog na sobnu temperaturu. Smjesa je inkubirana 60 min na 37 °C pri 200 okr/min. Reakcijska smjesa nacijepljena je na krutu LB podlogu koja sadrži ampicilin, prethodno zagrijanu na 37 °C. Nacijepljene ploče inkubirane su preko noći na 37 °C.

3.2.6. Izolacija plazmida iz bakterije *E. coli*

Plazmidna DNA izolirana je iz bakterije *E. coli* pomoću kompleta kemikalija NucleoSpin® Plasmid, prema uputama proizvođača. Ukratko, talog stanica izdvojen je centrifugiranjem od 30 s na 11.000 g iz 3 ml bakterijske kulture u ranoj stacionarnoj fazi rasta. Stanice su automatskom pipetom resuspendirane u 250 µl pufera A1 na koji je zatim dodano 250 µl pufera A2. Dobiveni lizat stanica zatim je promiješan preokretanjem mikrokivete 6-8 puta i inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi. Na lizat stanica dodano je 300 µl pufera A3, smjesa je promiješana preokretanjem sve dok nije poprimila bijelu boju te je zatim centrifugirana 10 min na 11.000 g. Izdvojen supernatant nanesen je na NucleoSpin® Plasmid kolonu te je iz njega plazmidna DNA vezana na matricu kolone centrifugiranjem od 1 min na 11.000 g. Kolona je zatim isprana s 500 µl pufera AW i 600 µl pufera A4 te osušena centrifugiranjem od 2 min na 11.000 g. Kolona je zatim prebačena u novu mikrokivetu od 1,5 ml te je na matricu dodano 50 µl pufera EB. Nakon inkubacije od 1 min na sobnoj temperaturi, plazmidna DNA eluirana je centrifugiranjem od 1 min na 11.000 g.

3.2.7. Sekvenciranje plazmidne DNA po Sangeru

U mikrokivetu od 1,5 ml dodano je 12 µl otopine plazmidne DNA, koncentracije 100 ng/µl u 10 mM Tris-HCl puferu (pH 8), koja je zatim pomiješana s 3 µl početnice za sekvenciranje (20 µM). Tako pripremljen uzorak otpremljen je na sobnoj temperaturi tvrtki Mycrosynth (Beč, Austrija), koja je provela sekvenciranje po Sangeru.

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

Kolonija kvasca *S. cerevisiae* nacijepljena je u 5 ml tekuće hranjive podloge YPD i inkubirana preko noći na tresilici na 30 °C pri 200 okr/min. Nakon prekonoćnog uzgoja, $2,5 \cdot 10^8$ svježih uzgojenih stanica kvasca nacijepjeno je u 50 ml hranjive podloge YPD prethodno zagrijane na 30 °C te inkubirano otprilike 4 h na 30 °C na 200 okr/min, dok mikrobna kultura nije dosegla gustoću od $2 \cdot 10^7$ stanica/ml. Stanice su zatim istaložene centrifugiranjem od 5 min na 3.000 g, dva puta isprane u po 25 ml sterilne deionizirane vode (sdH₂O), resuspendirane u 1 ml sdH₂O, prenesene u kivetu od 1,5 ml i razdijeljene u alikvote od 100 µl, koji su zatim centrifugirani 30 s na 13.000 g. Nakon što je s taloga stanica uklonjen supernatant, na talog stanica dodano je 60 µl PEG 3350 (50 % w/v), 9 µl litijevog acetata (1,0 M), 12,5 µl jednolančane DNA (2 mg/ml), 6,5 µl sdH₂O i 2,0 µl plazmidne DNA. Stanice su resuspendirane vorteksiranjem u trajanju od

45 s, nakon čega je transformacijska smjesa inkubirana u kupelji 40 min na 42 °C, a potom i centrifugirana 30 s na 13.000 g. Nakon uklanjanja supernatanta, stanice su resuspendirane u 100 µl sdH₂O i nacijepljene na selektivne krute hranjive podloge koje su potom 3-4 dana inkubirane na 30 °C.

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

U 5 ml tekuće kemijski definirane podloge YNBP⁺ His⁻ dodano je 500 µl kulture kvasca *S. cerevisiae* u stacionarnoj fazi te je novonacijepljena kultura preko noći na 30 °C i 200 okr/min uzgajana do stacionarne faze rasta. Ujutro je 15 ml svježih podloga YNBP⁺ His⁻ nacijepljeno s volumenom novouzgojene kulture potrebnim da početna optička gustoća kulture bude 0,5 OD₆₀₀/ml, nakon čega je kultura uzgajana 5 h na 30 °C i 200 okr/min, do eksponencijalne faze rasta. Porasle stanice isprane su u 15 ml sdH₂O, izmjerena je njihova optička gustoća, te su nacijepljene u 15 ml svježih podloga bez fosfata YNBP⁻ His⁻ tako da je početna gustoća kulture bila 0,3 OD₆₀₀/ml. Ovakva kultura uzgajana je na tresilici preko noći na 30 °C i 200 okr/min.

3.2.10. Mjerenje aktivnosti β-laktamaze vezane na staničnu stijenu kvasca

Kultura stanica s induciranim promotorom *PHO5* centrifugirana je na 3.000 g tijekom 5 min, nakon čega je supernatant odbačen. Zatim je talog stanica ispran s 15 ml sdH₂O i 15 ml kalijevog fosfatnog pufera (pH 7). Nakon ispiranja, stanice su resuspendirane u sdH₂O do optičke gustoće od 100 OD₆₀₀/ml. U 467,5 µl kalijevog fosfatnog pufera (pH 7) zatim je dodano 7,5 µl prvog decimalnog razrjeđenja suspenzije stanica. Ova smjesa zatim je inkubirana na tresilici na 30 °C s brzinom od 1.200 okr/min tijekom 2 min. Potom je u nju dodano 25 µl otopine nitrocefina (0,1 mM) te je smjesa inkubirana na tresilici na istim uvjetima još 5 min i centrifugirana 30 s na 8.000 g. Apsorbancija supernatanta mjerena je na valnoj duljini od 482 nm, a dobiveni rezultati statistički su obrađeni pomoću programa Microsoft Office Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

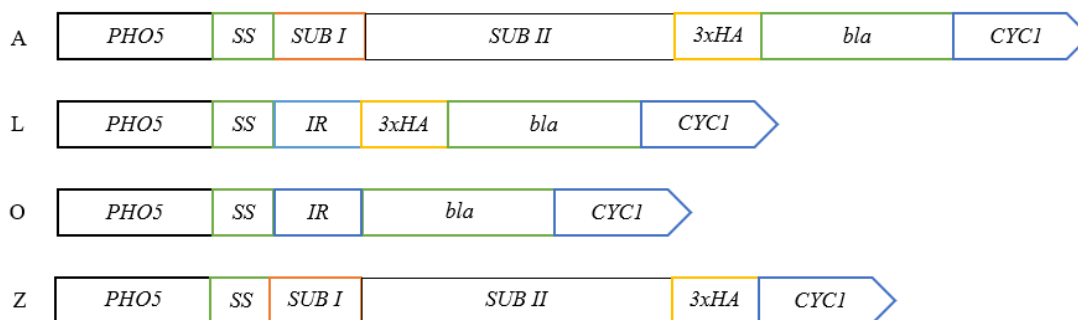
4.1. Rezultati

Cilj ovog eksperimentalnog završnog rada bio je odrediti kako na efikasnost izlaganja proteina izvjestitelja Pir2bla_L utječe nestrukturirana spojnica koju protein sadrži. U tu svrhu je iz plazmida pRSII423-pir2bla_L (poglavlje 4.1.1), koji kodira za navedeni protein, uklonjena sekvenca koja kodira za nestrukturiranu spojnicu, čime je konstruiran plazmid pRSII423-pir2bla_O (poglavlje 4.1.2). Navedeni plazmid zatim je transformiran u soj BY 4741 kvasca *S. cerevisiae* (poglavlje 4.1.3) u kojemu je potom uspoređena efikasnost izlaganja novokonstruiranog proteina Pir2bla_O s izvornim proteinom Pir2bla_L, kao i kontrolnim proteinima izvjestiteljima Pir2bla_A i Pir2bla_Z (poglavlje 4.1.4).

4.1.1. Serija plazmida pRSII423-pir2bla

U ovom radu korištene su tri i konstruirana jedna nova inačica plazmida iz serije pRSII423-pir2bla (Slika 6). Plazmid pRSII423-pir2bla_A kodira za protein Pir2bla_A (Slika 3) koji se sastoji od podjedinica I i II proteina Pir2, tri puta uzastopce ponovljene hemaglutininske oznake i β -laktamaze. Soj koji nosi ovaj plazmid korišten je tijekom mjerenja efikasnosti izlaganja proteina izvjestitelja na staničnu stijenku kao pozitivna kontrola. Plazmid pRSII423-pir2bla_L (Slika 4) konstruiran je uklaňanjem 379 aminokiselina iz plazmida pRSII423-pir2bla_A te kodira za protein Pir2bla_L koji nosi samo jednu ponavljajuću Pir sekvencu, tri puta uzastopce ponovljenu hemaglutininsku oznaku i β -laktamazu. Plazmid pRSII423-pir2bla_Z (Slika 5) derivat je plazmida pRSII423-pir2bla_A kojemu je uklonjena sekvenca koja kodira za enzim β -laktamazu. Kao takav, ovaj plazmid je tijekom mjerenja efikasnosti izlaganja proteina na staničnu stijenku korišten kao negativna kontrola.

U ovom završnom radu konstruiran je plazmid pRSII423-pir2bla_O koji, za razliku od plazmida pRSII423-pir2bla_L, ne kodira za tri puta uzastopce ponovljenu hemaglutininsku oznaku. Navedena regija u proteinu izvjestitelju Pir2bla_L služi kao nestrukturirana spojnica. Kako bi se konstruirao plazmid pRSII423-pir2bla_O, iz plazmida pRSII-423-pir2bla_L metodom sastavljanja fragmenata DNA po Gibsonu uklonjeno 126 pb.

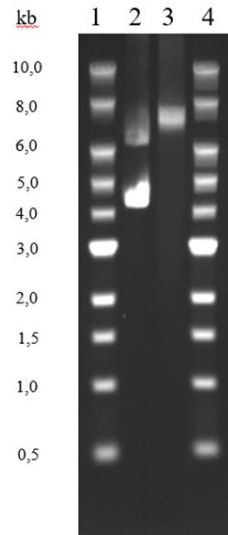


Slika 6. Shematski prikaz gena koji kodiraju za proteine izvjestitelje korištene u ovom završnom radu. Navedene oznake predstavljaju dijelove gena koji kodiraju za: A – protein Pir2bla_A, L – protein Pir2bla_L, O – protein Pir2bla_O, Z – protein Pir2bla_Z, PHO5 – inducibilni promotor PHO5 kvasca *S. cerevisiae*, SS – signalnu sekvencu proteina Pir2, SUB I – podjedinicu I proteina Pir2, SUB II – podjedinicu II proteina Pir2, 3xHA – tri puta uzastopce ponovljenu hemaglutininsku oznaku, bla – β -laktamazu, IR – jednom ponovljenu Pir sekvencu proteina Pir2, CYC1 – terminator gena CYC1 kvasca *S. cerevisiae*

4.1.2. Konstrukcija plazmida pRSII423-pir2bla_O

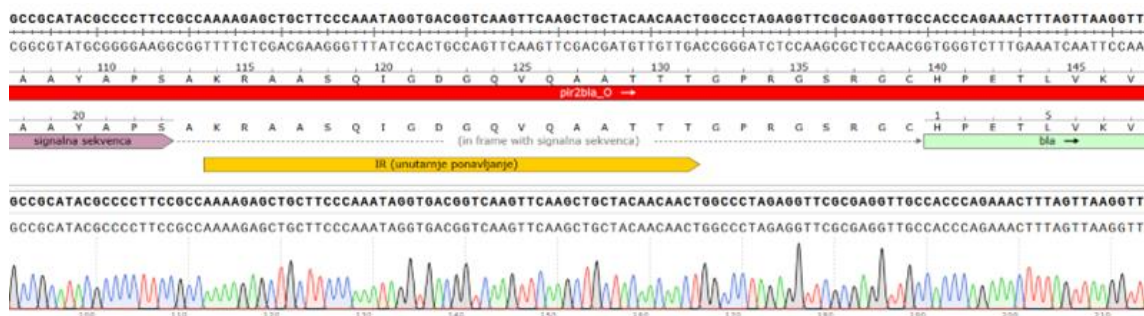
Kao ishodni plazmid za konstrukciju plazmida pRSII423-pir2bla_O korišten je plazmid pRSII423-pir2bla_L, veličine 7209 pb (Slika 4). Plazmid pRSII423-pir2bla_L umnožen je lančanom reakcijom polimeraze (PCR) koristeći visokotočnu DNA polimerazu Q5 te početnice pir2bla-O-r i pir2bla-O-f (poglavlje 3.2.1), nakon čega je dobiveni PCR produkt izoliran iz agaroznog gela (poglavlja 3.2.2 i 3.2.3). Na ovaj način umnožen je i pročišćen PCR produkt koji ne sadrži 126 pb što kodiraju za nestrukturiranu spojnicu, tj. tri puta uzastopno ponovljenu hemaglutininsku oznaku.

Uspješnost reakcije PCR i izolacije iz gela provjerena je agaroznom gel elektroforezom (Slika 7, poglavlje 3.2.2). Rezultati elektroforeze pokazuju da je izvorni plazmid pRSII423-pir2bla_L (jažica 2) prisutan u superzavijenoj konformaciji i konformaciji otvorenog kruga, dok je umnoženi linearni PCR produkt (jažica 3) očekivane veličine (> 7 kb).



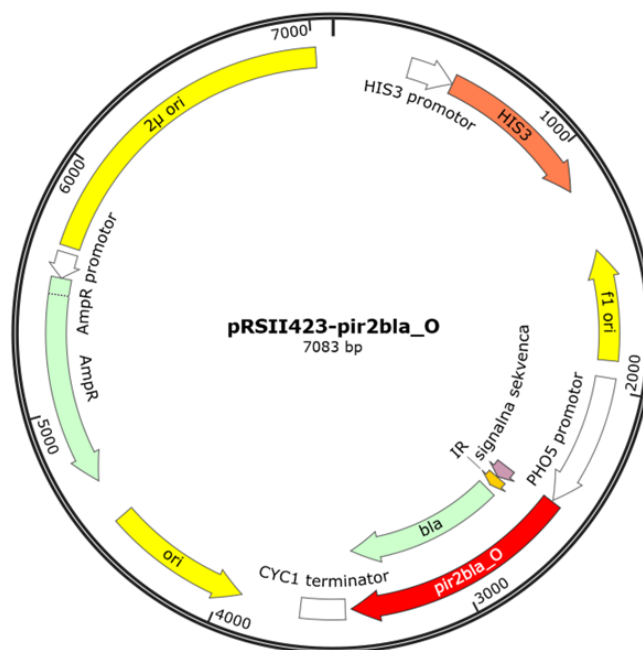
Slika 7. Agarozni gel nakon provedene elektroforeze. Oznake 1 – standard 1 kb DNA Ladder, 2 – plazmid pRSII423-pir2bla_L, 3 – umnoženi PCR produkt pročišćen iz gela, 4 – standard 1 kb DNA Ladder.

Pročišćeni PCR produkt podvrgnut je metodi sastavljanja fragmenata DNA po Gibsonu (poglavlje 3.2.4), nakon čega je dobiveni produkt reakcije korišten za transformaciju kompetentnih bakterijskih stanica soja NEB Stable bakterije *E. coli* (poglavlje 3.2.5). Nakon što je tijekom prekonoćne inkubacije na selektivnim podlogama poraslo nekoliko stotina transformanata, iz dva nasumično izabrana transformanta izolirana je plazmidna DNA (poglavlje 3.2.6) i upućena na sekvenciranje po Sangeru (poglavlje 3.2.7). Rezultati sekvenciranja jednog plazmida potvrdili su odsutnost tri puta uzastopno ponovljene hemaglutininske sekvence (Slika 8), čime je potvrđena konstrukcija plazmida pRSII423-pir2bla_O (Slika 9).



Slika 8. Rezultati sekvenciranja po Sangeru konstruiranog plazmida pRSII423-pir2bla_O. Očekivana sekvenca plazmida i oznake plazmidnih regija prikazane su u gornjoj polovici slike,

dok su poravnani kromatogram dobiven sekvenciranjem i iz njega očitana sekvenca prikazani na dnu.



Slika 9. Mapa plazmida pRSII423-pir2bla_O. Oznake su identične onima na Slici 3.

4.1.3. Konstrukcija soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

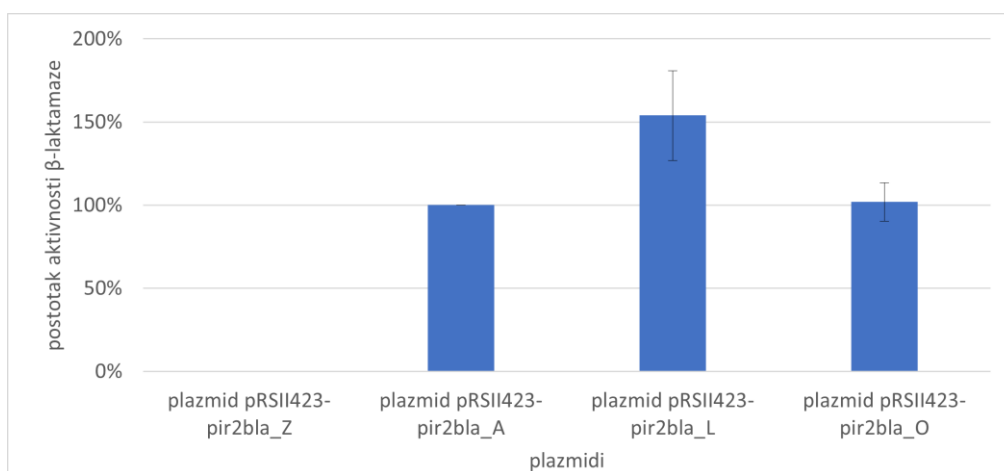
U idućem koraku je novokonstruirani plazmid pRSII423-pir2bla_O unesen u kvasac *S. cerevisiae*. U tu svrhu su stanice soja BY 4741 kvasca *S. cerevisiae* transformirane metodom koja se zasniva na litijevom acetatu (poglavlje 3.2.8). Od nekoliko stotina transformanata koji su porasli na selektivnoj hranjivoj podlozi YNBP⁺ His⁻, jedan je precijepljen u selektivnu tekuću hranjivu podlogu YNBP⁺ His⁻, uzgajan do stacionarne faze rasta i do daljnjih eksperimenata pohranjen na 4 °C.

4.1.4. Mjerenje aktivnosti β-laktamaze vezane na površinu stanične stijenke

Inačice gena *pir2bla* u seriji plazmida pRSII423-pir2bla pod kontrolom su inducibilnog promotora *PHO5* kvasca *S. cerevisiae*, aktivnog kada u podlozi nije prisutan fosfat. Stoga, kako bismo mogli usporediti efikasnost izlaganja proteina Pir2bla_L i proteina Pir2bla_O, prvo je provedena indukcija promotora *PHO5* u sojevima koji su nosili plazmid pRSII423-pir2bla_A (pozitivna kontrola), pRSII423-pir2bla_L, pRSII423-pir2bla_O i pRSII423-pir2bla_Z (negativna kontrola) (poglavlje 3.2.9).

Zatim su inducirane stanice podvrgnute kolorimetrijskom nitrocefinskom testu (poglavlje 3.2.10), kako bi se kvantificirala aktivnost β -laktamaze na površini njihove stanične stijenke. Naime, nitrocefín je spoj žute boje koji ne prelazi kroz staničnu membranu i koji enzim β -laktamaza cijepa u crveno obojeni produkt. Stoga nitrocefinski test omogućava kvantifikaciju isključivo β -laktamaze izložene na površinu stanične stijenke.

Rezultati nitrocefinskog testa (Slika 10), normalizirani prema sojevima koji nose plazmide pRSII423-pir2bla_A (pozitivna kontrola, 100 % aktivnosti) i pir2bla_Z (negativna kontrola, 0 % aktivnosti), pokazali su da se protein izvjestitelj pir2bla_L izlaže na staničnu stijenku efikasnije od proteina pir2bla_O (154 % naspram 102 % aktivnosti β -laktamaze). Međutim, zbog značajne varijacije u aktivnosti β -laktamaze u biološkim replikama, statistička obrada rezultata dvostranim Welchvim t-testom utvrdila je da dobiveni rezultat nije statistički značajan ($p = 0,06$).



Slika 10. Grafički prikaz rezultata mjerenja aktivnosti β -laktamaze u stanicama koje sadrže plazmide pRSII423-pir2bla_A, pRSII423-pir2bla_L, pRSII423-pir2bla_O i pRSII423-pir2bla_Z.

4.2. Rasprava

Kvasac *S. cerevisiae* jednostaničan je eukariotski organizam koji ima sposobnost vezanja proteina na površinu svoje stanične stijenke. Ova sposobnost koristi se za konstrukciju rekombinantnih proteina koje će stanica kvasca izlučiti i vezati na vanjsku površinu stanične stijenke. Kako navedeni rekombinantni proteini mogu biti eukariotskog ili prokariotskog podrijetla, ova metoda imobilizacije ima široki spektar primjene u biotehnološkoj industriji.

U sklopu istraživanja provedenih u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta konstruirana je serija plazmida pRSII423-pir2bla. Ovi plazmidi kodiraju za inačice fuzijskog proteina izvjestitelja Pir2bla, nastalog spajanjem proteina stanične stijenke Pir2 i enzima β -laktamaze. Jedna od inačica ovog fuzijskog proteina je i Pir2bla_L, koja umjesto punog proteina Pir2 sadrži najmanji dio proteina Pir2 potreban za kovalentno vezanje na staničnu stijenku. Međutim, unatoč tome što sadrži tek mali dio proteina Pir2, protein izvjestitelj Pir2bla_L efikasno se izlaže na površini stanične stijenke.

Cilj ovog rada bio je ispitati kako na efikasnost izlaganja na staničnu stijenku utječe nestrukturirana spojnica fuzijskog proteina Pir2bla_L, koja je u njemu prisutna u obliku tri puta uzastopno ponovljene hemaglutininske oznake. U tu svrhu je iz postojećeg plazmida pRSII423-pir2bla_L konstruiran novi plazmid pRSII423-pir2bla_O, koji ne kodira za nestrukturiranu spojnicu. Novokonstruirani plazmid zatim je uveden u standardni laboratorijski soj BY 4741 kvasca *S. cerevisiae*, u kojem je i inducirana ekspresija fuzijskog proteina Pir2bla_O. Konačno, nitrocefinskim testom uspoređena je efikasnost izlaganja proteina Pir2bla_L s efikasnošću izlaganja proteina Pir2bla_O.

Rezultati nitrocefinskog testa pokazali su da je aktivnost fuzijskog proteina Pir2bla_L na površini stanične stijenke u prosjeku 52 % veća naspram aktivnosti izloženog fuzijskog proteina Pir2bla_O. Navedena razlika u aktivnosti mogla bi biti posljedica pozitivnog utjecaja nestrukturirane spojnice na smatanje β -laktamazne domene fuzijskog proteina ili na efikasnost samog procesa izlučivanja i izlaganja proteina na staničnu stijenku. Međutim, statistička obrada podataka ukazala je da zbog izražene varijabilnosti bioloških replika dobivena razlika nije statistička značajna ($p = 0,06$). Dakle, na temelju provedenih eksperimenata ne možemo pouzdano utvrditi da nestrukturirana regija izloženog fuzijskog proteina Pir2bla_L utječe na efikasnost njegova izlaganja na staničnu stijenku.

5. ZAKLJUČCI

1. U ovom eksperimentalnom završnom radu uspješno je konstruiran plazmid pRSII423-pir2bla_O, koji kodira za novi fuzijski protein Pir2bla_O.
2. Uzgoj soja BY 4741 kvasca *S. cerevisiae* koji nosi plazmid pRSII423-pir2bla_O u podlozi bez fosfata inducira ekspresiju i izlaganje fuzijskog proteina na površinu stanične stijenke kvasca.
3. Iako se protein Pir2bla_L, koji nosi nestrukturiranu spojnicu, u prosjeku izlaže na staničnoj stijenci 50 % efikasnije od proteina Pir2bla_O, izmjerena razlika nije statistički značajna ($p = 0,06$).

6. POPIS LITERATURE

Andrés I, Gallardo O, Parascandola P, Pastor F, 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>

Andreu C, del Olmo, ML (2018). Yeast arming systems: pros and cons of different protein anchors and other elements required for display. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 2543-2561. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8827-6>

Bulik DA, Olczak M, Lucero HA, Osmond BC, Robbins PW, Specht CA (2003). Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryot Cell* **2**, 886-900. <https://doi.org/10.1128/ec.2.5.886-900.200>

Dončević L (2017) Primjena elektroforetskih tehnika u analizi nukleinskih kiselina (završni rad) Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek

Duina AA, Miller ME, Keeney JB (2014). Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* **197**, 33–48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>

Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, Mrša V, Tanner W (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3- glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* **281**, 11523-11529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600314200>

Goffeau A, Barrell B. G, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H. i sur. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546-567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

Ghanegolmohammadi F, Okada H, Liu Y, Itto-Nakama K, Ohnuki S, Savchenko A i sur. (2021) Defining functions of mannoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* by high-dimensional morphological phenotyping. *J Fungi* **7**, 769. <https://doi.org/10.3390/jof7090769>

Klis FM, Boorsma A, De Groot PW (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185-202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>

Klis FM, Mol P, Hellingwerf 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>

Lesage G, Bussey H (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 317-343. <https://doi.org/10.1128/membr.00038-05>

Levin DE (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 262 – 291. <https://doi.org/10.1128/membr.69.2.262-291.2005>

Lipke PN, Ovalle R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**, 3735-3740. <https://doi.org/10.1128/jb.180.15.3735-3740.1998>

Lozančić M, Hossain A, Mrša V, Teparić R (2019) Surface Display—An Alternative to Classic Enzyme Immobilization. *Catalysts* **9**, 728. <https://doi.org/10.3390/catal9090728>

Montijn RC, Vink E, Müller WH, Verkleij AJ, Van Den Ende H, Henrissat B i sur. (1999) Localization of synthesis of β -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**, 7414-7420. <https://doi.org/10.1128/jb.181.24.7414-7420.1999>

Nielsen J. (2019) Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnol J* **14**, 1800421. <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>

Orlean P (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**, 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>

Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E. (2020) *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol* **6**, 1-31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

Paciello L (2023) PRODUCTION OF HETEROLOGOUS PROTEINS BY ENGINEERED YEAST CELLS - Scientific Figure on ResearchGate. https://www.researchgate.net/figure/21-1-The-cell-wall-of-Saccharomyces-cerevisiae_fig2_242569910. Pristupljeno 15. kolovoz 2023.

Sumita T, Yoko-o T, Shimma Y, Jigami Y (2005) Comparison of Cell Wall Localization among Pir Family Proteins and Functional Dissection of the Region Required for Cell Wall Binding and Bud Scar Recruitment of Pir1p. *Eukaryot Cell* **11**, 1872–1881. <https://doi.org/10.1128/ec.4.11.1872-1881.2005>

Smits GJ, Kapteyn JC, van den Ende H, Klis FM (1999) Cell wall dynamics in yeast. *Curr*

Opin Microbiol **2**, 348-352. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80061-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80061-7)

Švec D (2017) Ekspresija rekombinantne ksiloza reduktaze na površini stanice kvasca *S. cerevisiae* (Završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Tanaka T, Yamada R, Ogino C, Kondo A (2012) Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**, 577-591. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4175-0>

Teparić R, Vladimir M (2016) Overview of systems and techniques for surface display of recombinant proteins in yeast *S. cerevisiae*. *Appl Food Biotechnol* **3**, 3–14. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i1.9457>

Teparic R, Stuparević I, Vladimir M (2004) Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology* **150**, 3145-3150. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27296-0>

Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Yuiko Takebayashi Y i sur. (2019) β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol* **431**, 3472-3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>

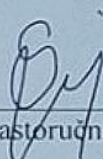
Van der Vaart JM, te Biesebeke R, Chapman JW, Toschka HY, Klis FM, Verrips CT (1997) Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl Environ Microbiol* **63**, 615–620. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.615-620.1997>

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

Yang X, Tang H, Song M, Shen Y, Hou J, Bao X (2019) Development of novel surface display platforms for anchoring heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* **18**, 85. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1133-x>

Izjava o izvornosti

Ja Stefani Prekpalaj izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Vlastoručni potpis