

Obilježavanje S-adenozil-metionin sintetaze hemaglutininskom-oznakom i njezina detekcija na površini stanične stijenke kvasca

Vukšić, Anđela

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:159:292823>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Anđela Vukšić

0058219380

**Obilježavanje S-adenozil-metionin sintetaze
hemaglutininskom-oznakom i njezina detekcija
na površini stanične stijenke kvasca**

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

**Obilježavanje S-adenozil-metionin sintetaze hemaglutininskom-oznakom i
njezina detekcija na površini stanične stijenke kvasca**

Andela Vukšić, 0058291380

Sažetak: Izlaganje proteina na staničnu stijenku kvasca inovativna je tehnika korištenja enzima u biotehnološkoj proizvodnji. Kako bi se ispitalo može li se na staničnoj stijenci kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izložiti i na nju kovalentno vezati kvašćev enzim S-adenozil-metionin sintetaza (Sam1), u ovom radu konstruiran je plazmid pRSII423-ccw12sam1-3ha, koji kodira za hemaglutininskom oznakom obilježen fuzijski protein Sam1-Ccw12. Navedeni fuzijski protein, spoj enzima Sam1 i C-terminalnog dijela proteina stanične stijenke Ccw12, zatim je eksprimiran u stanicama kvasca, nakon čega je imunoblotom pokazano da on uspješno prolazi kroz sekretorni put kvasca te se nekovalentno i kovalentno, preko GPI sidra, veže na staničnu stijenku kvasca. Ovim rezultatima po prvi je puta pokazano da je enzim S-adenozil-metionin sintetazu moguće izložiti na površini stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*.

Ključne riječi: izlaganje proteina na staničnu stijenku, hemaglutininska oznaka, S-adenozil-metionin sintetaza, stanična stijenka, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Rad sadrži: 30 stranica, 10 slika, 6 tablica, 22 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, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Bojan Žunar

Datum obrane: 01. 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

HA-labeling of S-adenosyl-methionine synthetase and its detection on the surface of the yeast cell wall

Andela Vukšić, 0058219380

Abstract: Displaying proteins on the yeast cell wall is an innovative technique for the use of enzymes in biotechnological production. To investigate the possibility of displaying and covalently attaching the yeast enzyme S-adenosylmethionine synthase (Sam1) to the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a plasmid named pRSII423-ccw12sam1-3ha was constructed in this study. This plasmid encodes a fusion protein, Sam1-Ccw12, which is marked with a hemagglutinin tag. This fusion protein, a combination of the Sam1 enzyme and the C-terminal part of the cell wall protein Ccw12, was then expressed in yeast cells. Immunoblot analysis demonstrated that this fusion protein successfully traverses the yeast's secretory pathway and becomes non-covalently and covalently attached to the yeast cell wall via a GPI anchor. These results demonstrate, for the first time, that it is feasible to expose the enzyme S-adenosylmethionine synthase on the cell wall surface of the yeast *S. cerevisiae*.

Keywords: surface display, hemagglutinin tag, S-adenosyl-methionine synthetase, cell wall, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 30 pages, 10 figures, 6 tables, 22 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 1st, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. Izlaganje heterolognih proteina na površini stanične stijenke.....	2
2.2.1. Građa stanične stijenke kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2.2. Proteini stanične stijenke kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.3. Izolacija proteina stanične stijenke.....	5
2.4. Proteinske oznake	5
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	8
3.1. MATERIJALI.....	8
3.1.1. Kemikalije	8
3.1.2. Uređaji.....	8
3.1.3. Laboratorijski sojevi.....	9
3.1.4. Hranjive podloge	9
3.1.5. Plazmidi.....	13
3.1.6. Početnice	15
3.2. METODE.....	15
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom.....	15
3.2.2. Agarozna elektroforeza DNA.....	16
3.2.3. Izolacija DNA iz agaroznog gela	16
3.2.4. Sastavljanje fragmenata DNA po Gibsonu	16
3.2.5. Transformacija bakterije <i>E. coli</i>	16
3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije <i>E. coli</i>	17
3.2.7. Sekvencioniranje plazmidne DNA po Sangeru.....	17
3.2.8. Transformacija kvasca <i>S. cerevisiae</i> pomoću litijevog acetata	17
3.2.9. Indukcija promotora <i>PHO5</i> u stanicama kvasca <i>S. cerevisiae</i>	18
3.2.10. Izolacija proteina stanične stijenke.....	18
3.2.11. Poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) proteina.....	19
3.2.12. Imunoblot.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Rezultati.....	21
4.1.1. Konstrukcija plazmida pRSII423-ccw12sam1-3ha.....	21
4.1.2. Konstrukcija sojeva kvasca <i>S. cerevisiae</i>	24

4.1.3. Detekcija fuzijskog proteina izloženog na staničnoj stijenci kvasca	24
4.2. Rasprava	25
5. ZAKLJUČCI	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kroz čitavu povijest ima važnu ulogu u proizvodnji dobara, počevši od vina i piva pa do vitamina i rekombinantnih proteina. U novije vrijeme sve se više istražuje i stanična stijenka kvasaca *S. cerevisiae* te mogućnost izlaganja heterolognih proteina na njezinoj površini. Izlaganje proteina na staničnoj stijenci kvasaca uvelike bi olakšalo proizvodne procese i procese pročišćavanja biokemikalija. Za razliku od stanica koje ekspimiraju enzim od interesa intracelularno, stanice kvasca koje odgovarajući enzim imaju imobiliziran na svojoj staničnoj stijenci mogu provoditi reakcije kod kojih supstrat ne može ući u stanicu ili je u prevelikoj količini toksičan za stanicu. Stoga metoda izlaganja heterolognih proteina na staničnoj površini pokazuje veliki potencijal za daljnji razvoj.

Ovaj rad istraživao je izlaganje na staničnu stijenu enzima S-adenozil-metionin sintetaze. U tu svrhu korišten je fuzijski protein Sam1-Ccw12 konstruiran umetanjem otvorenog okvira čitanja (engl. *open reading frame*, ORF) gena *SAM1* kvasca *S. cerevisiae* unutar ORF-a gena *CCW12*. Naime, gen *CCW12* kvasca *S. cerevisiae* kodira za nativni protein stanične stijenke koji doprinosi održavanju stabilnosti stijenke i koji se putem ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra kovalentno veže za β -1,6-glukan stanične stijenke.

Cilj ovoga rada bio je fuzijski protein Sam1-Ccw12 označiti hemaglutininskom (HA) oznakom te imunoblotom ispitati izlaže li se takav protein na staničnu stijenu kvasca. U tu svrhu, u gen koji kodira za protein Sam1-Ccw12 umetnuta je nukleotidna sekvenca koja kodira za HA-oznaku te je novokonstruirani gen ekspimiran je u stanicama kvasca *S. cerevisiae*. Iz ovakvih stanica izolirani su proteini stanične stijenke na kojima je zatim proveden imunoblot korištenjem anti-HA antitijela kako bi se kvalitativno istražilo vezanje enzima Sam1-Ccw12 na staničnu stijenu kvasca.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam koji se svrstava u carstvo gljiva (Fungi) i koji ima veliko značenje u tradicionalnoj prehrambenoj industriji i modernoj biotehnologiji. Naime, kvasac *S. cerevisiae* u prirodi postoji u dva oblika, diploidnom i haploidnom, te se kao diploid može razmnožavati spolnim putem, stvarajući askospore, ili nespolnim putem, pupanjem. S druge strane, haploidne stanice ovog kvasca mogu se dijeliti samo pupanjem. Ovaj mikroorganizam u optimalnim laboratorijskim uvjetima ima generacijsko vrijeme od 90 minuta pri temperaturi od 28 °C. Međutim, budući da ga je lako uzgojiti i van laboratorija te da vrlo efikasno fermentira jednostavne šećere u etanol i CO₂, ovaj kvasac se od davnina koristi u proizvodnji kruha, piva i vina. Kako se kvasac *S. cerevisiae* u posljednjih nekoliko desetljeća prometnuo u iznimno značajan modelni organizam, on je 1996. god. postao i prvi sekvencirani eukariot (Goffeau i sur., 1996.). Ulogu modelnog organizma u molekularnoj biologiji i genetičkom inženjerstvu kvasac *S. cerevisiae* zadržao je i do danas te se i dalje široko upotrebljava u proizvodnji rekombinantnih proteina, vitamina i hormona.

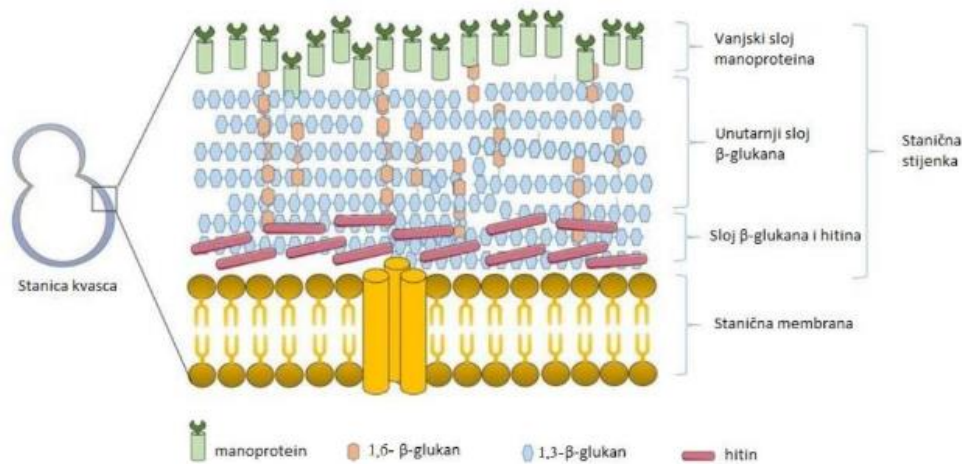
2.2. Izlaganje heterolognih proteina na površini stanične stijenke

Izlaganje heterolognih proteina na površini stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* moćna je strategija konstrukcije novih proizvodnih sojeva. Postoje brojni dizajnirani sustavi koji omogućavaju ovakvo izlaganje proteina ili peptida od interesa direktno na površini stanice, a obično se temelje na fuziji gena odgovornih za signalne peptide ili native proteine stanične stijenke s heterolognim proteinima od interesa, sve pod kontrolom snažnog promotora (Andreu i sur., 2018). Ova tehnika privlači pažnju istraživača iz raznih disciplina, uključujući biotehnologiju, energetiku, farmakologiju, medicinu te prehrambenu tehnologiju. Međutim, jedan od izazova ovog pristupa je njegova relativno niska učinkovitost (Lozančić i sur., 2019).

2.2.1. Građa stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca struktura je širine otprilike 200 nm koja čini 15-30 % suhe mase vegetativne stanice kvasca *S. cerevisiae*. Stanična stijenka održava oblik same stanice i njezin osmotski integritet. Ova struktura sastoji se od dva sloja (Slika 1): i) unutarnjeg sloja, koji je

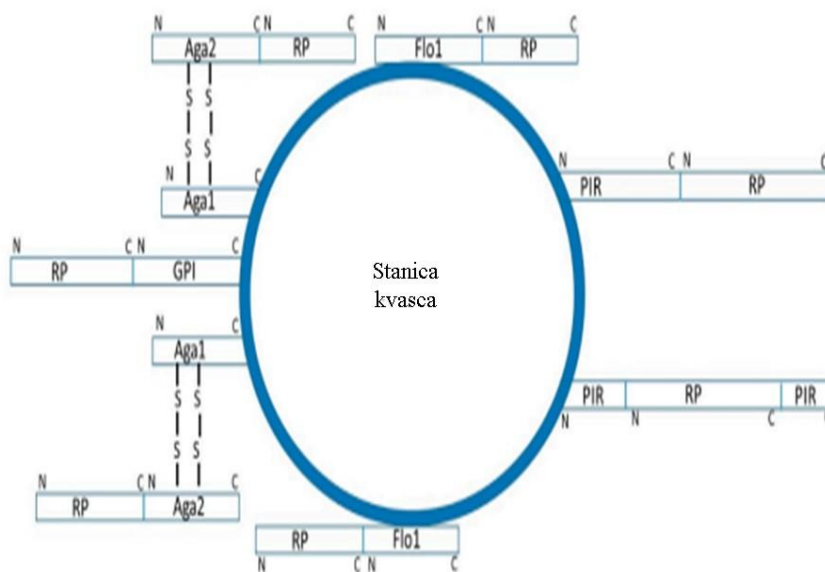
odgovoran za mehaničku čvrstoću stijenke, građenog od β -1,3-glukana i β -1,6-glukana (koji čine otprilike 50 % ukupne mase stijenke) te hitina (1-2 %), kao i ii) vanjskog sloja, koji sudjeluje u procesima međusobnog prepoznavanja stanica i drugim staničnim funkcijama te se sastoji od glikoliziranih manoproteina (30-50 %), većinom kovalentno povezanih s β -glukanom (Kapteyn i sur., 1999; Klis i sur., 2002; Orlean, 2012).



Slika 1. Shematski prikaz građe stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Slika je preuzeta i prilagođena iz Anwar i sur. (2017).

2.2.2. Proteini stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Izlaganje heterolognih proteina na staničnu stijenku kvasca postiže se fuzijom otvorenih okvira čitanja gena koji kodiraju za proteine od interesa s genima nativnih proteina stanične stijenke. Ovakva fuzija omogućava izlaganje heterolognih proteina direktno na staničnu stijenku kvasca (Andreu i sur., 2018). Nativni proteini stanične stijenke mogu biti kovalentno povezani s unutarnjim slojem stijenke na dva načina: i) putem esterske veze između odabranih glutamata u proteinima i β -1,3-glukana, kao u slučaju PIR proteina ili ii) povezivanjem ostataka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra s β -1,6-glukanima, kao u slučaju GPI proteina. Proteini treće skupine, tzv. SCW proteini (engl. *soluble cell wall proteins*), nekovalentno su adsorbirani na β -1,3-glukanske lance stanične stijenke. Ovisno o specifičnostima heterolognog proteina koji se želi imobilizirati, on se može smjestiti na N- ili C-terminalnom kraju, ili čak unutar sekvence nativnog proteina stanične stijenke. Neki od nativnih proteina stanične stijenke koji se koriste za kovalentno izlaganje proteina su α -aglutinin, protein Flo1, Pir proteini i protein Ccw12 (Slika 2).



Slika 2. Prikaz različitih načina izlaganja rekombinantnih proteina na staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae*: GPI – protein stanične stijenke iz grupe GPI proteina; PIR – protein stanične stijenke iz grupe PIR proteina; RP – rekombinantni protein; Aga1, Aga2, Flo1 – pojedinačni proteini stanične stijenke, N – N-terminalni kraj proteina, C – C-terminalni kraj proteina (Lozančić i sur; 2019)

A-aglutinin primjer je nativnog proteinskog kompleksa stanične stijenke kvasca koji se koristi za izlaganje proteina preko kovalentnog sidrenja. Ovaj kompleks sastoji se od dvije komponente: Aga1 i Aga2. Dok Aga1 služi kao sidreni podsustav vezan za staničnu stijenku putem GPI sidra, Aga2 se veže na Aga1 preko dvije disulfidne veze te služi kao prijanjajući element na koji se fuzioniraju peptidi ili proteini od interesa (Cappellaro i sur.; 1994).

Flo1 (protein flokulacije 1) je protein stanične stijenke koji prepoznaje manozne ugljikohidrate i igra ključnu ulogu u procesu flokulacije (Kobayashi i sur.;1998). N-terminalna domena ovog proteina, poznata kao funkcionalna domena flokulacije, nekovalentno prijanja na mananske polisaharide prisutne u staničnoj stijenci što stanicama omogućava da se agregiraju u flokule. S druge strane, C-terminalna regija Flo1 je hidrofobna i sadrži sekvence za sidrenje putem GPI sidra. Međutim, konkretni mehanizam sidrenja Flo1 za staničnu stijenku kroz ovu regiju do danas ostaje nejasan (Goossens i sur.; 2011).

Skupina Pir proteina obuhvaća pet članova: Pir1 (Ccw6), Pir2 (Hsp150, Ccw7), Pir3 (Ccw8), Pir4 (Cis3, Ccw5) i Pir5. Istraživanja ukazuju da se ovi proteini na staničnu stijenku kovalentno

vežu GPI-neovisnim putem, čime se otvaraju nove mogućnosti za kreiranje fuzijskih proteina (Andreu i sur., 2018).

S druge strane, protein Ccw12 dio je GPI skupine proteina stanične stijenke te, zajedno s proteinima Cwp2 i Sed1, ima ključnu funkciju u održavanju stabilnosti stanične stijenke i otpornosti prema stresnim uvjetima. Iz ovog razloga prekomjerna ekspresija ovog proteina može umanjiti stresove uzrokovane heterolognom sekrecijom proteina (Lozančić i sur.; 2019).

2.3. Izolacija proteina stanične stijenke

Kao što je napomenuto, stanična stijenka kvasca kompleksna je struktura koja se sastoji od β -1,3- i β -1,6-glukana, hitina i velikog broja manoproteina vezanih na glukani (Klis, 1994; Kollar i sur., 1997; Orlean, 1997; Lipke i Ovalle, 1998). S praktičnog gledišta izolacije proteina stanične stijenke, ovi manoproteini se prema mehanizmu sidrenja mogu se podijeliti u tri skupine.

Prva skupina proteina sadrži one koji su pričvršćeni na strukturne komponente stanične stijenke putem disulfidnih veza ili nekovalentnim interakcijama. Ovi proteini mogu se ekstrahirati iz stanične stijenke tretmanom s vrućim natrijevim dodecil-sulfatom (SDS) i β -merkaptetanolom (Valentin i sur., 1984; Mrša i sur., 1997).

Druga skupina vezanih proteina obuhvaća one koji se, nakon ekstrakcije sa SDS-om, mogu ekstrahirati samo lizom stanične stijenke s pripravcima glukanaza, npr. laminarinazom (Montijn i sur., 1994; Mrša i sur., 1997). Ovi proteini kovalentno su vezani za staničnu stijenku preko GPI-sidra (Lu i sur., 1994; Kapteyn i sur., 1996; Kollar i sur., 1997).

Treća skupina proteina uključuje proteine koji se nakon ekstrakcije sa SDS-om mogu iz stijenke izdvojiti tretmanom sa 30 mM natrijevom lužinom. Ova grupa proteina vezana je za staničnu stijenku esterskom vezom te u nju potpadaju Pir proteini (Mrša i sur., 1997).

2.4. Proteinske oznake

Afinitetne proteinske oznake omogućavaju identifikaciju i analizu rekombinantnih proteina proizvedenih putem prokariotskih ili eukariotskih ekspresijskih sustava. Ove oznake ne samo da olakšavaju istraživanje lokalizacije ciljnog proteina unutar stanice, već i omogućuju njegovo efikasno pročišćavanje te proučavanje njegovih interakcija s drugim proteinima. Među najčešće

korištene ovakve oznake ubrajaju se polihistidinska afinitetna oznaka, glutation-S-transferaza, maltoza-vezujući protein i hemaglutininska (HA) oznaka.

Polihistidinska afinitetna oznaka, poznata i kao His-oznaka, His-tag ili His₆, tipično se sastoji od šest, iako njezina duljina može varirati od dva do deset uzastopnih histidinskih aminokiselinskih ostataka. Prvi puta upotrijebljena 1991. god., za pročišćavanje rekombinantne galaktoza dehidrogenaze, ova oznaka vrlo je popularna zbog svoje jedinstvene sposobnosti da tvori koordinacijske veze s prijelaznim metalnim ionima poput Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ i Fe³⁺ iona. Međutim, u ovom kontekstu najčešće se koriste Ni²⁺ ioni, kao dio specijalizirane Ni(II)-nitrilotriacetatne (Ni-NTA) matrice. Ova matrica, koju proizvodi tvrtka Qiagen, omogućava pročišćavanje fuzijskih proteina izravno iz staničnih lizata bez da ih cijepaju native proteaze ili nukleaze. Elucija proteina s ovakvih matrica postiže se primjenom gradijenta koncentracije imidazola (Kimple i sur.; 2013).

Glutation-S-transferaza (GST) popularna je afinitetna oznaka koja se veže na glutation. Da bi se rekombinantni protein označio oznakom GST, gen proteina od interesa fuzionira se s genom za glutation-S-transferazu, nakon čega se eksprimirani GST fuzijski protein pročišćava afinitetnom kromatografijom na matricama na koje je kovalentno vezan glutation. Označavanje proteina od interesa oznakom GST najlakše je provesti plazmidima iz serije pGEX, koji kodiraju za N-terminalne GST proteine te koji su prvi puta primijenjeni 1988. god. kako bi se pročistio antigen iz parazitskog crva *Taenia ovis* (Smith i Johnson, 1988; Smith, 2000). Izvedenice ovih vektora danas kodiraju za mjesta cijepanja proteaza trombin ili faktor Xa koja omogućuju eluciju proteina od interesa odcjepljivanjem oznake GST još dok je fuzijski protein vezan na afinitetnu kolonu. Fuzijske GST proteine također je jednostavno vizualizirati kolorimetrijskim testom sa specifičnim GST supstratom, 1-kloro-2,4-dinitrobenzenom (CDNB), kao i detektirati anti-GST antitijelom (Kimple i sur., 2013).

Maltoza-vezujući proteini (MBP) djeluju na sličnom principu kao i oznake GST. Proteini od interesa fuzionirani s ovom oznakom konstruiraju se pomoću pMAL vektora, namijenjenih za ekspresiju u bakteriji *E. coli* i razvijenih 1988. god. Fuzijski MBP proteini pročišćavaju se afinitetnom kromatografijom na umreženim amiloznim smolama koje su komercijalno dostupne, ali i osjetljive na amilaze potencijalno prisutne u staničnim lizatima. Za razliku od GST afinitetne kromatografije, proteolitičko uklanjanje oznake MBP dok je fuzijski protein vezan za amiloznu smolu nije preporučljivo pa se protein često prvo eluira s kolone slobodnom maltozom prije nego se oznaka proteolitički ukloni. Fuzijski MBP protein mogu se detektirati komercijalno dostupnim specifičnim protutijelima (Kimple i sur., 2013).

Oznake temeljene na kratkim epitopima, kao što je hemaglutininska (HA) oznaka, popularne su za detekciju i praćenje proteina od interesa *in vitro* i u staničnoj kulturi. Glavna prednost HA oznake je što njezin kratki linearni motiv rijetko mijenja funkcionalne ili strukturalne karakteristike heterolognog proteina s kojim je fuzionirana. Međutim, iako je HA oznaka korisna za detekciju proteina od interesa, problematična je za njegovo pročišćavanje, za koje se koriste matrice s imobiliziranim anti-HA protutijelima. Naime, elucija s ovakvih matrica zahtjeva ekstremne pH vrijednosti, koje mogu destabilizirati i inaktivirati protein od interesa, a ujedno i ograničuju višekratnu upotrebu matrice. Stoga, iako je HA oznaka izuzetno korisna za detekciju, nije idealna za pročišćavanje fuzijskih proteina (Kimple i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- tripton, kvaščev ekstrat, pepton – Biolife (Milano, Italija)
- agar – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- agaroz – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- D(+)-glukoza, bezvodna – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- uracil, leucin, triptofan, asparagin – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- soli: natrijev klorid, kalijev dihidrogenfosfat, kalijev klorid, magnezijev sulfat heptahidrat, kalcijev klorid dihidrat, natrijev citrat – Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- vitamini: riboflavin i biotin – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- standard za DNA elektroforezu 1 kb DNA ladder – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- etidijev bromid – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- komplet kemikalija za izolaciju plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*: NucleoSpin Plasmid – Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)
- ECL otopine za razvijanje imunoblota – Bio-Rad (Hercules, SAD)
- LMW standardi za proteinsku elektroforezu, nitrocelulozna membrana – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- anti-HA antitijela konjugirana s peroksidazom – Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Njemačka)
- N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED), akrilamid, β -merkaptotanol, natrijev dodecilsulfat (SDS) – Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- amonijev persulfat (APS) – Fluka (Buch, Švedska)

3.1.2. Uređaji

- autoklav 2540M – Tuttnauer (Breda, Noord-Brabant, Nizozemska)
- centrifuga Centric 322 A – Tehnica (Podplat, Slovenija)
- centrifuga MiniSpin – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)

- kadice za elektroforezu Mini-Sub Cell GT – Bio-Rad (Hercules, California, SAD)
- spektrofotometar NanoDrop One – ThermoFischer Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- termostat – Memmert (Schwabach, Njemačka)
- transiluminator s UV svjetlom Uvidoc HD6 – Uvitec Ltd (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- vorteks VM-10 – Witeg (Wertheim, Njemačka)
- uređaj za PCR MultiGene Mini – Labnet (New Jersey, SAD)
- transiluminator s plavim svjetlom Skylight Super-Blue – Vilber (Collegien, Francuska)
- spektrofotometar Helios γ – ThermoElectric Corporation (West Chester, Philadelphia, SAD)
- skener za snimanje imunoblota C-DiGit Blot Scanner – LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, SAD)
- uređaj za razbijanje stanica BeadBugTM – Benchmark Scientific (New Jersey, SAD)
- uređaj za polusuhi prijenos Trans-Blot TurboTM Transfer System – BioRad (Hercules, SAD)

3.1.3. Laboratorijski sojevi

U ovom radu je za umnažanje i konstrukciju plazmida korišten soj NEB Stable bakterije *E. coli*, genotipa F' *proA*⁺*B*⁺ *lacIq* $\Delta(lacZ)M15$ *zzf::Tn10* (Tet^R)/ $\Delta(ara-leu)$ 7697 *araD139 fhuA* $\Delta lacX74 galK16 galE15 e14-$ $\Phi80dlacZ\Delta M15$ *recA1 relA1 endA1 nupG rpsL* (Str^R) *rph spoT1* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$.

Nadalje, imunoblotom su analizirani transformanti soja BY 4741 kvasca *S. cerevisiae*, genotipa MATa *leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*.

3.1.4. Hranjive podloge

Hranjive podloge korištene za uzgoj bakterije *E. coli* i kvasca *S. cerevisiae* pripremljene su vaganjem i otapanjem njihovih sastojaka u deioniziranoj vodi, nakon čega su podloge podvrgnute autoklaviranju u trajanju od 15 min pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1 bar.

Hranjive podloge za uzgoj bakterije *E. coli*

— Kruta hranjiva podloga LB

Sastojci: tripton (10 g/l), kvašćev ekstrakt (5 g/l), NaCl (10 g/l) i agar (15 g/l). Nakon autoklaviranja i prije nego se hranjiva podloga ohladi ispod 50 °C, u nju se dodaje se ampicilin (100 µg/ml) kako bi bila pogodna za selektivni uzgoj odgovarajućih transformanata bakterije *E. coli*.

— Tekuća hranjiva podloga 2xYT

Sastojci: tripton (16 g/l), kvašćev ekstrakt (10 g/l) i NaCl (5 g/l). Ampicilin (100 µg/ml) se dodaje u hranjivu podlogu netom prije naciepljivanja.

Hranjive podloge za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*

— Podloga YPD

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

— YNB His⁻ podloga

Sastojci: dušična suspenzija za kvasce s dodanim amonijevim sulfatom (6,7 g/l), glukoza (20 g/l), smjesa „drop-out“ (1,6 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), agar (15 g/l), uracil (0,04 g/l), leucin (0,08 g/l) i triptofan (0,04 g/l). Aminokiseline su u podlogu dodane kao krutine prije sterilizacije. Sastav smjese „drop-out“ prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav smjese „drop-out“.

adenin	3,0 g	L-metionin	2,0 g
L-arginin	2,0 g	L-fenilalanin	2,0 g
L-asparagin	2,0 g	L-prolin	2,0 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g	L-serin	6,0 g
L-cistein	2,0 g	L-treonin	2,0 g
L-glutamin	2,0 g	L-tirozin	2,0 g
L-glutaminska 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

- Wickerhamova sintetska podloga bez fosfata (podloga za indukciju promotora *PHO5*, YNBP⁻ His⁻)

Sastojci navedeni u Tablici 2 otopljeni su u deioniziranoj vodi te je pH podloge podešen pomoću koncentrirane klorovodične kiseline na vrijednost 5,5. Hranjiva je podloga sterilizirana te je prije naciepljivanja u nju sterilno dodana 250 puta koncentrirana otopina riboflavina i vitamina (Tablica 3), 1000 puta koncentrirana otopina biotina i vitamina (Tablica 4) te 50 %-tna otopina glukoze, tako da je konačna koncentracija glukoze iznosila 2 %. Otopine koje su sadržavale riboflavin i biotin sterilizirane su filtracijom, a ostali sastojci autoklaviranjem.

Tablica 2. Sastav podloge YNBP⁻ His⁻.

KCl	0,5 g
asparagin	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
NaCl	0,05 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05 g
natrijev citrat	2,941 g
smjesa „drop out“	1,0 g
elementi u tragovima (500 puta koncentrirani)*	1 mL
uracil	0,04 g
leucin	0,08 g
triptofan	0,04 g
deionizirana voda	480 mL

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

Tablica 3. Sastav 250 puta koncentrirane otopine riboflavina i vitamina.

riboflavin	8 mg
p-aminobenzojeva kiselina	8 mg
inozitol	80 mg
deionizirana voda	160 mL

Tablica 4. Sastav 1000 puta koncentrirane otopine biotina i vitamina.

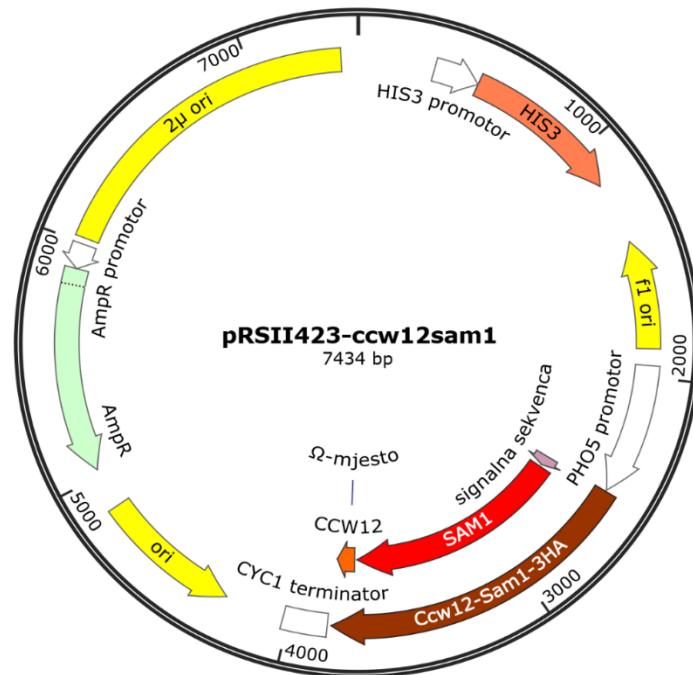
biotin	2 mg
kalcijev pantotenat	400 mg
niacin	400 mg
piridoksal-HCl	400 mg
tiamin-HCl	400 mg
folna kiselina	2 mg
deionizirana voda	100 mL

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

borna kiselina	50 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4 mg
KI	10 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 mg
deionizirana voda	200 ml

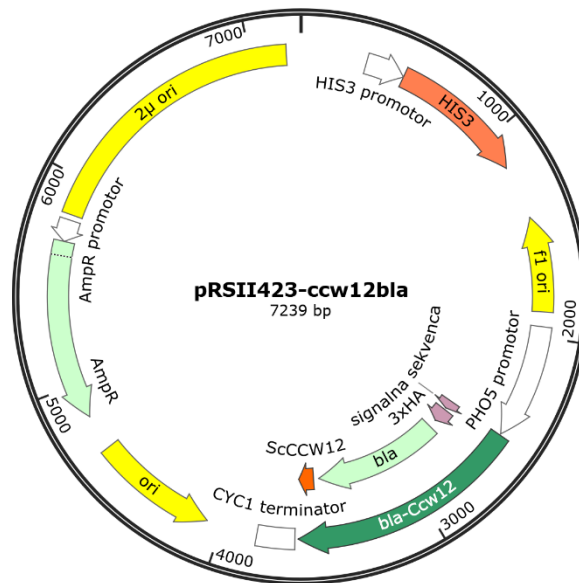
3.1.5. Plazmidi

Plazmid pRSII423-ccw12sam1 (Slika 3) kodira za fuzijski protein Sam1-Ccw12, koji se u plazmidu nalazi pod regulacijom promotora *PHO5*. Ovaj gen kodira za enzim S-adenozil-metionin sintetazu koja se preko GPI-sidra može kovalentno vezati na staničnu stijenku kvasca.



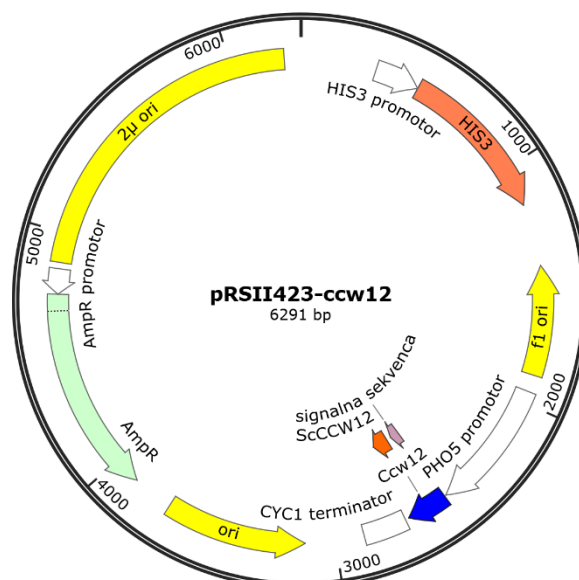
Slika 3. Mapa plazmida pRSII423-ccw12sam1. Oznake: *fl ori* – ishodište replikacije filamentnog bakteriofaga M13, *PHO5 promotor* – inducibilni kvašćev promotor *PHO5*, *SAM1* – otvoreni okvir čitanja koji kodira za enzim S-adenozil-metionin sintetazu kvasca *S. cerevisiae*, *CCW12* – slijed nukleotida koji kodira za C-terminalni dio GPI proteina Ccw12, *CYC1 terminator* – kvašćev terminator *CYC1*, *ori* – plazmidno ishodište replikacije bakterije *E. coli*, *AmpR* – selektivni biljeg koji bakteriji *E. coli* joj omogućava rast na podlozi s ampicilinom, *2μ ori* – ishodište replikacije kvašćevog plazmida *2μ*, *HIS3* – selektivni biljeg za kvasac koji omogućava kvašćevim auksotrofima za histidin rast na podlozi bez histidina.

Plazmid pRSII423-ccw12bla (Slika 4) kodira za fuzijski protein bla-Ccw12 koji se kovalentno veže na staničnu stijenku kvasca preko GPI sidra. Kao takav, soj kvasca koji nosi ovaj protein služi kao pozitivna kontrola tijekom provedbe imunoblota.



Slika 4. Mapa plazmida pRSII423-ccw12bla. Oznake: *bla-Ccw12* – otvoreni okvir čitanja koji kodira za fuzijski protein bla-Ccw12, *3xHA* – slijed nukleotida koji kodira za tri puta uzastopce ponovljenu HA-oznaku, *bla* – otvoreni okvir čitanja koji kodira za β-laktamazu. Preostale oznake identične su onima na Slici 3.

Plazmid pRSII423-ccw12 (Slika 5) kodira za C-terminalni dio proteina Ccw12. Kako ovaj gen ne kodira za HA-oznaku, soj kvasca koji ga sadrži korišten je kao negativna kontrola tijekom provedbe imunoblota.



Slika 5. Mapa plazmida pRSII423-ccw12. Oznake su identične onima na Slici 3.

3.1.6. Početnice

— sam1-3ha-f

TACCCATACGATGTTCCCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGAC
TATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTCTGCAGATGGCC
GGTACA

— sam1-3ha-r

TCAGGAACATCGTATGGGTAAGCAGCGGCAGAAGCGAC

— b-pho5-seq

TGATGTTTTGCTAAGTCG

3.2. METODE

3.2.1. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) provedena je pomoću visokotočne i termostabilne DNA polimeraze Q5 (New England Biolabs, Ipswich, SAD), prema protokolu proizvođača. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 50 µL, a u smjesu redom je dodano: 32,5 µL sterilne deionizirane vode (sdH₂O), 10 µL 5 puta koncentriranog Q5 pufera, 1 µL otopine dNTP-ova (10 mM), 2,5 µL otopine početnice sam-1-3ha-f (10 µM) i 2,5 µL otopine početnice sam-1-3ha-r (10 µM). Smjesa je zatim dobro promiješana te je u nju dodan 1 µL DNA kalupa, tj. plazmidne DNA, i 0,5 µL DNA polimeraze Q5. U smjesu za kontrolnu reakciju umjesto 1 µL kalupa dodan je 1 µL sdH₂O. Reakcija se odvijala u uređaju MultiGene Mini (Labnet, New Jersey, SAD) prema uvjetima navedenim u Tablici 6. Nakon završetka reakcije, otopina je čuvana na 4 °C do daljnje upotrebe.

Tablica 6. Uvjeti odvijanja lančane reakcije polimerazom.

Korak	Temperatura	Vrijeme trajanja
Početna denaturacija	98°C	30 s
Denaturacija	98°C	10 s
Sparivanje početnica	72°C	20 s
Sinteza	72°C	4 min i 40 s
Završna sinteza	72°C	10 min

3.2.2. Agarozna elektroforeza DNA

Elektroforeza je provedena u 0,7 %-tnom agaroznom gelu pripremljenom tako da je 0,21 g agaroze otopljen u 30 ml pufera TAE. Agarozna je zagrijavana u mikrovalnoj pećnici dok se nije u potpunosti otopila te je zatim ohlađena na 50 °C i izlivena u kalup za agarozni gel. Nakon što se gel ohladio na sobnu temperaturu, gel je prenesen u kadu za elektroforezu i uronjen u 0,5 puta koncentrirani pufer TAE. Uzorci plazmida, standarda i PCR produkta promiješani su sa 6 puta koncentriranim puferom za nanošenje uzorka. Elektroforeza je provedena na 140 V tijekom 45 min te je zatim gel inkubiran 20 min u otopini etidijeva bromida. Vrpce DNA vizualizirane su uređajem UviDoc HD6 (Uvitech, Cambridge, Velika Britanija).

3.2.3. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Uzorak PCR produkta i standard razdvojeni su na 0,7 %-tnom agaroznom gelu. Nakon provedene elektroforeze, agarozni gel inkubiran je u etidijevom bromidu. DNA je vizualizirana pomoću plavog svjetla (480 nm) na Skylight Super-Blue transiluminatoru (Vilber, Collegien, Francuska) te je željeni fragment DNA špatulom izrezan iz gela. DNA je zatim izolirana iz gela kompletno kemikalijom Nucleo-Spin Gel and PCR Clean Up (Machery-Nagel, Düren, Njemačka) prema protokolu proizvođača. Prvo je dodatkom pufera NTI otopljen izrezani komadić agaroze, nakon čega je DNA vezana na kolonu koja je sastavni dio kompleta kemikalija. Kolona je zatim dva puta ispirana puferom NT3 i osušena centrifugiranjem. DNA je zatim eluirana s kolone dodatkom pufera za eluciju. Izolirana DNA kvantificirana je spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop One (ThermoFischer Scientific, Waltham, SAD).

3.2.4. Sastavljanje fragmenata DNA po Gibsonu

Volumen od 3 µl uzorka DNA izoliranog iz gela pomiješan je s 3 µl otopine NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, SAD). Smjesa je inkubirana u uređaju za provođenje lančane reakcije polimerazom 15 min na 50 °C, a zatim je do daljnje upotrebe pohranjena na -20 °C.

3.2.5. Transformacija bakterije *E. coli*

Soj NEB Stable bakterije *E. coli* (New England Biolabs, Ipswich, SAD) transformiran je prema protokolu proizvođača. Prvo je 2 µl plazmidne DNA promiješano s 50 µl kompetentnih stanica preokretanjem kivete za mikrocentrifugiranje 4-5 puta. Transformacijska smjesa zatim je

inkubirana na ledu 30 min, potom 30 s na 42 °C i konačno 5 min na ledu. U smjesu je potom dodano 950 µl otopine SOC zagrijane na sobnu temperaturu te je smjesa inkubirana na tresilici 60 min na 37 °C i 200 okr/min. Transformacijska smjesa nacijepljena je na LB ploče s ampicilinom, prethodno zagrijane na 37 °C. Nacijepljene ploče preko noći su inkubirane na 37 °C.

3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*

Izabrane kolonije bakterije *E. coli* uzgojene su u tekućoj hranjivoj podlozi. Izolacija plazmidne DNA napravljena je kompletno kemikalija Nucleo-Spin Plasmid (Machery-Nagel, Düren, Njemačka) prema protokolu proizvođača. Najprije su po 3 ml kulture stanica bakterije *E. coli* centrifugirane te je iz njih izdvojen supernatant. Na talog stanica dodano je 250 µl pufera A1 te su stanice resuspendirane vorteksiranjem. Zatim je dodano 250 µl pufera A2 te je smjesa promiješana okretanjem kivete, nakon čega je smjesa inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim je u smjesu dodano 300 µl pufera A3 te je smjesa promiješana okretanjem kivete. Smjesa je centrifugirana 10 min na 13.000 rpm, nakon čega je supernatant nanesen na kolonu za pročišćavanje DNA. Plazmidna DNA vezala se matricu kolone, dok je ostatak nečistoća ispran dodatkom 500 µl pufera AW i 600 µl pufera A4. Matrica kolone osušena je centrifugiranjem te je zatim DNA s nje eluirana dodatkom 50 µl pufera AE.

3.2.7. Sekvencioniranje plazmidne DNA po Sangeru

Izoliranoj plazmidnoj DNA spektrofotometrijski je određena koncentracija pomoću uređaja NanoDrop One (ThermoFischer Scientific, Waltham, SAD). Uzorci DNA zatim su razrijeđeni da koncentracija plazmidne DNA bude 100 ng/µl te je 12 µl takve otopine DNA pomiješano s 3 µl otopine početnice b-pho5-seq (20 µM). Uzorci su u mikrokivetama od 1,5 ml otpremljeni na sobnoj temperaturi na sekvencioniranje u tvrtku Microsynth Austrija (GmbH), gdje je sekvencioniranje provedeno metodom po Sangeru prema protokolu Economy Run.

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

Stanice kvasca *S. cerevisiae* uzgojene su u 15 ml tekuće hranjive podloge YPD do gustoće od približno 2 OD₆₀₀/ml. Suspenzija stanica zatim je centrifugirana 4 min na 3.000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen. Talog stanica resuspendiran je u 10 ml sterilne deionizirane vode te je suspenzija opet centrifugirana 4 min na 3.000 rpm. Supernatant stanica ponovno je odbačen, a talog stanica resuspendiran u 5 ml sterilne deionizirane vode. Nakon toga ponovljen je postupak centrifugiranja suspenzije stanica kao u prijašnjim koracima.

Supernatant je odbačen, a talog stanica resuspendiran je u 500 μ l sterilne deionizirane vode. Iz takve suspenzije stanica izdvojeno je po 100 μ l suspenzije u nove mikrokivete koje su zatim napunjene sterilnom deioniziranom vodom do 1 ml. Mikrokivete su centrifugirane 30 s na 13.000 rpm te je supernatant odbačen. Na talog stanica dodano je redom: 60 μ l PEG-a 3350 (50 % w/v), 9 μ l litijevog acetata (1 M), 12 μ l nespecifičnog jednolančanog DNA nosača (2 mg/ml), 6,5 μ l sterilne deionizirane vode i 2 μ l plazmida. Pripremljene transformacijske smjese vorteksirane su 30 s i zatim inkubirane 40 min na 42 °C. Nakon inkubacije, transformacijske smjese centrifugirane su 30 s na 13.000 rpm. Supernatant transformacijske smjese je odbačen, a talog stanica resuspendiran u 50 μ l dsH₂O. Dobivene suspenzije naciepljene su na krute YPB His⁻ podloge te inkubirane na 30 °C do porasta kolonija.

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

Kvasac *S. cerevisiae* uzgojen je u 5 ml tekuće YNBP⁺ His⁻ kemijski definirane hranjive podloge koja ne sadrži histidin, ali sadrži fosfat, na 30 °C i 180 rpm, do rane stacionarne faze. Iduće jutro, stanice su precijepljene u 15 ml iste hranjive podloge i inkubirane 5 h na 30 °C i 180 rpm kako bi ušle u eksponencijalnu fazu rasta. Stanice su zatim isprane s 15 ml sdH₂O centrifugiranjem (5 min na 3.000 rpm) i resuspendirane u 15 ml tekuće hranjive podloge bez fosfata i histidina (YNBP⁻ His⁻) tako da je konačna gustoća stanica iznosila 0,3 OD₆₀₀/ml. Takve kulture inkubirane su preko noći na tresilici na 30 °C.

3.2.10. Izolacija proteina stanične stijenke

Stanice kvasca uzgojene su preko noći do koncentracije od približno 2 OD₆₀₀/ml te su izdvojene iz podloge centrifugiranjem 5 min na 3.000 okr/min. Talog stanica zatim je ispran dva puta s po 30 ml deionizirane vode i dva puta s 50 mM kalijevim fosfatnim puferom (pH 8). Stanice su zatim resuspendirane u 1 ml 50 mM kalijevog fosfatnog pufera (pH 8) i centrifugirane na 8.000 rpm. Supernatant je uklonjen pipetiranjem, a talog stanica resuspendiran u približno 100 μ l istog pufera. U suspenziju stanica dodane su staklene kuglice u volumenu od otprilike 75-100 % volumena suspenzije stanica. Stanice su zatim razbijene na uređaju BeadBugTM pri brzini od 4.000 rpm tijekom 3 min, u dva ciklusa, uz inkubaciju stanica na ledu u trajanju od minimalno 1 min između ciklusa razbijanja. Staklene kuglice odvojene su centrifugiranjem. Stanične stijenke odvojene su od unutarstaničnog sadržaja centrifugiranjem 1 min na 8.000 rpm. Supernatant je uklonjen, a talog stanica u kojem su se nalazile stijenke ispran 4 puta s 50 mM kalijevim fosfatnim puferom (pH 8). Nekovalentno vezani proteini izolirani su kuhanjem taloga stijenki s 1 ml Laemmli pufera u kipućoj vodenoj kupelji. Dobivena suspenzija je nakon

kuhanja centrifugirana 2-3 min na 8.000 rpm te je supernatant, u kojem se nalaze nekovalentno vezani proteini, prenesen u novu mikrokivetu i pohranjen na -20 °C. Zaostali talog, u kojem su se nalazili kovalentno vezani proteini, resuspendiran je u 1 ml Laemmli pufera i kuhan 10 min u mikrokiveti uronjenoj u kipuću vodenu kupelj. Dobivena suspenzija centrifugirana je 2-3 min na 8.000 rpm, nakon čega je supernatant odbačen. Talog stijenki ispran je četiri puta s 50 mM kalijevim fosfatnim puferom (pH 8). Talog je zatim ispran 50 mM kalijevim fosfatnim puferom (pH 6) i resuspendiran u približno 50 µl 50 mM kalijevog fosfatnog pufera (pH 6). U suspenziju je dodano 2 µl β-glukanaze (9 U) te je suspenzija inkubirana 2 h na 55 °C. Nakon inkubacije suspenzija je do daljnjeg korištenja spremljena na -20 °C.

3.2.11. Poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) proteina

Izolirani proteini stanične stijenke razdvojeni su elektroforezom u 10 %-tnom poliakrilamidnom gelu pri denaturirajućim uvjetima (raspon razdvajanja: 14-205 kDa). Prije nanošenja, uzorci za elektroforezu pomiješani su s Laemmli puferom koji sadrži 10%-tni glicerol. Elektroforeza je provedena u diskontinuiranom sustavu s gornjim gelom za sabijanje (pH 6,8) i donjim gelom za razdvajanje (pH 8,8). Donji gel pripremljen je dodavanjem 7,5 ml deionizirane vode, 7,5 ml Tris-HCl pufera (pH 8,8) i 7,5 ml 30 %-tnog akrilamida. Zatim je u ovu otopinu brzo i uzastopce dodano 12 µl TEMED-a i 85 µl amonijeva persulfata. Otopina je zatim odmah nanescena između prethodno pripremljenih stakala za izlijevanje gela, korištenjem automatske pipete. Nakon izlijevanja donjeg gela na granicu faza nanescen je izopropanol, kako bi gornji rub gela polimerizirao ravno. Nakon što je gel polimerizirao kroz 45 min, izopropanol je maknut pomoću filter papira. Gornji gel je pripremljen miješanjem 6,9 ml Tris-HCl pufera (pH 6,8) i 900 µl 30 %-tnog akrilamida. Zatim je u ovu otopinu brzo i uzastopce dodano 7 µl TEMED-a i 55 µl amonijeva persulfata. Gornji gel nanescen je jednakim postupkom kao i donji. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-glicinski pufer, pH 6,8, 0,1 % SDS) pri naponu od 180 V.

3.2.12. Imunoblot

Nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze, proteini su preneseni na nitroceluloznu membranu polusuhim transferom, na kojoj je zatim detektirana proteinska vrpca koja nosi HA-oznaku. Transfer je proveden u uređaju Trans-Blot Turbo™ Transfer System (BioRad, Hercules, California) uz korištenje Tris-glicinskog pufera. Pufer je pripremljen otapanjem 3,03 g Tris-a i 14,4 g glicina u 200 ml metanola i 800 ml deionizirane vode. Transfer je trajao 20 min pri jakosti struje od 1,0 A i naponu od 25 V. Nakon transfera preneseni proteini su na

nitroceluloznoj membrani vizualizirani bojom Ponceau S. Membrana je zatim odbojana deioniziranom vodom i blokirana inkubacijom u trajanju od 30-60 min u 10 ml pufera za blokiranje (50 mM Tris-HCl pufer, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, 1 % obranog mlijeka). Pufer za blokiranje zatim je odličen te je na membranu dodano svježih 5 ml pufera za blokiranje i 3 μ l anti-HA antitijela. U ovoj otopini, membrana je preko noći inkubirana na 4 °C. Nakon inkubacije membrana je tri puta isprana puferom za blokiranje, nakon čega su na njoj kemiluminiscentnom olovkom (WesternSure Pen) označeni standardi. Za razvijanje imunoblota korištene su otopine iz kompleta kemikalija BioRad Clarity Western tako da je pomiješana otopina kemiluminiscentnog supstrata (800 μ l otopine A i 800 μ l otopine B) prelijevana preko membrane tijekom 5 min. Zatim su vrpce koje sadrže HA-oznaku vizualizirane su pomoću kemiluminiscentnog skenera C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Nebraska, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

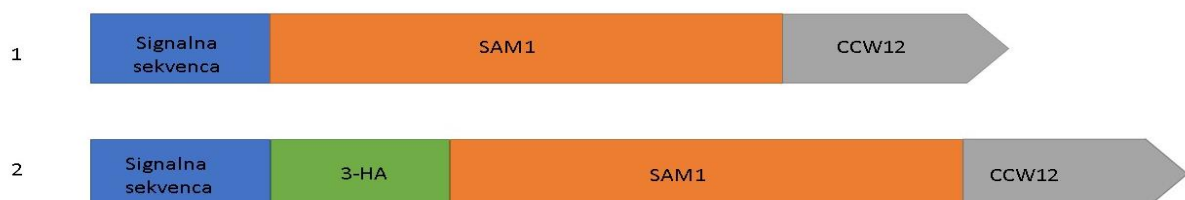
4.1. Rezultati

Cilj ovog rada bio je označiti HA-oznakom fuzijski protein Sam1-Ccw12, inducirati njegovu ekspresiju u kvascu *S. cerevisiae* i, koristeći imunoblot, analizirati njegovu prisutnost i kovalentno vezanje na staničnoj stijenci. U tu svrhu, najprije je konstruiran novi plazmid pRSII423-ccw12sam1-3ha, koji kodira za fuzijski protein Sam1-Ccw12 označen trostrukom uzastopnom HA-oznakom (poglavlje 4.1.1). Ovaj plazmid potom je transformiran u soj kvasca BY 4741 (poglavlje 4.1.2). U novokonstruiranom soju kvasca zatim je inducirana ekspresija HA-označenog fuzijskog proteina Sam1-Ccw12 te su njegovi proteini stanične stijenke analizirani imunoblotom (poglavlje 4.1.3) kako bi se istražilo je li među njima prisutan označeni fuzijski protein i je li on preko svojeg GPI sidra kovalentno vezan na β -1,6-glukan stanične stijenke.

4.1.1. Konstrukcija plazmida pRSII423-ccw12sam1-3ha

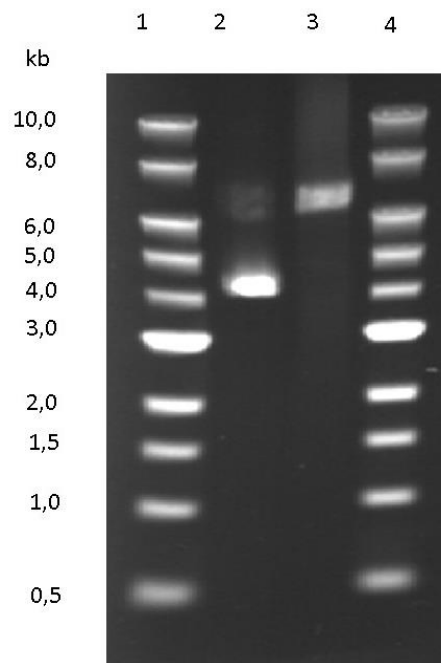
U prethodnim istraživanjima provedenima u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu konstruiran je kvašćev replikativni plazmid pRSII423-ccw12sam1 (poglavlje 3.1.5). Konstruirani plazmid kodira za fuzijski protein Sam1-Ccw12, spoj kvašćevog enzima S-adenozil-metionin sintetaze i proteina stanične stijenke Ccw12, te se njegova ekspresija inducira uzgojem kvasca u podlozi bez fosfata.

Kako bi se istražila lokalizacija i kovalentno vezanje ovog fuzijskog proteina na staničnu stijenkku, u ovom radu najprije je unutar otvorenog okvira čitanja gena *SAMI-CCW12* unesena sekvenca koja kodira za tri puta uzastopno ponovljenu HA-oznaku, čime je konstruiran gen *SAMI-CCW12-3xHA* (Slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz otvorenog okvira čitanja 1) izvornog gena *SAMI-CCW12* i 2) novokonstruiranog gena *SAMI-CCW12-3xHA*.

Kako bi se konstruirao plazmid koji kodira za gen *SAMI-CCW12-3xHA*, provedena je lančana reakcija polimerazom (PCR, poglavlje 3.2.1). Pritom je korištena visokotočna termostabilna polimeraza Q5, početnice *sam1-3ha-f* i *sam1-3ha-r* (poglavlje 3.1.6) te plazmid *pRSII423-ccw12sam1* (poglavlje 3.1.5), koji je služio kao kalup. Uspješnost reakcije PCR provjerena je agaroznom gel elektroforezom (poglavlje 3.2.2), pri čemu je duljina nastalog amplikona uspoređena s prikladnim DNA standardima i kružnim plazmidom *pRSII423-ccw12sam1*. Umnoženi PCR fragment zatim je izoliran iz agaroznog gela (poglavlje 3.2.3, Slika 7) i cirkulariziran metodom za sastavljanje DNA fragmenata po Gibsonu (poglavlje 3.2.4). Produkti ove enzimske reakcije potom u korišteni za transformaciju soja NEB Stable bakterije *E. coli* (poglavlje 3.2.5). Nakon prekonoćne inkubacije na 37 °C, na LB ploči s ampicilinom na koju je nacijepljena transformacijska smjesa poraslo je stotinjak transformanata.



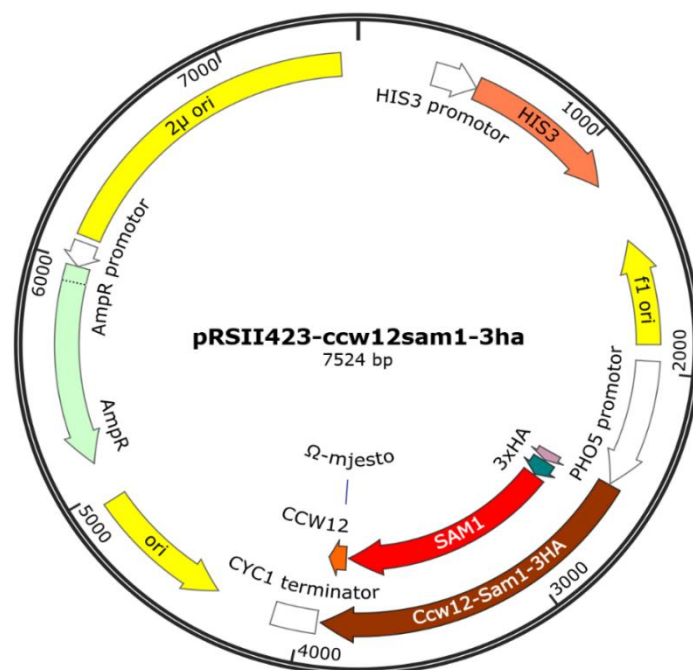
Slika 7. Rezultat agarozne gel elektroforeze plazmida *pRSII423-ccw12sam1*, koji je poslužio kao kalup za reakciju PCR, i PCR produkta izoliranog iz gela. Uzorci: 1) standard za DNA elektroforezu 1 kb DNA ladder, 2) kružni plazmid *pRSII423-ccw12sam1*, 3) PCR produkt pročišćen iz gela, 4) standard za DNA elektroforezu 1 kb DNA ladder (New England Biolabs).

Kako bi se između stotinjak dobivenih transformanata identificirao barem jedan koji nosi željeni plazmid *pRSII423-ccw12sam1-3ha*, pet nasumično izabranih transformanata uzgojeno je u tekućoj hranjivoj podlozi 2xYT s ampicilinom te je iz njih izolirana plazmidna DNA setom kemikalija Nucleo-Spin Plasmid (poglavlje 3.2.6), koja je potom i sekvencirana metodom po Sangeru (poglavlje 3.2.7). Rezultati sekvenciranja pokazali su da je od pet sekvenciranih

plazmida samo jedan nosio potpuno ispravnu sekvencu gena *SAM1-CCW12-3xHA* (Slika 8). Taj plazmid označen je kao pRSII423-ccw12sam1-3ha (Slika 9) te je korišten u daljnjim eksperimentima.



Slika 8. Rezultati sekvenciranja plazmida pRSII423-ccw12sam1-3ha metodom po Sangeru. Oznake određenih regija plazmida i njihova očekivana sekvenca prikazane su u gornjem dijelu slike, dok su sekvenca očitana metodom po Sangeru i pripadajući joj poravnani kromatogram prikazani u donjem dijelu slike.



Slika 9. Mapa plazmida pRSII423-ccw12sam1-3ha. *3xHA* – slijed nukleotida koji kodira za tri puta uzastopce ponovljenu HA-oznaku. Preostale oznake identične su onima na Slici 3.

4.1.2. Konstrukcija sojeva kvasca *S. cerevisiae*

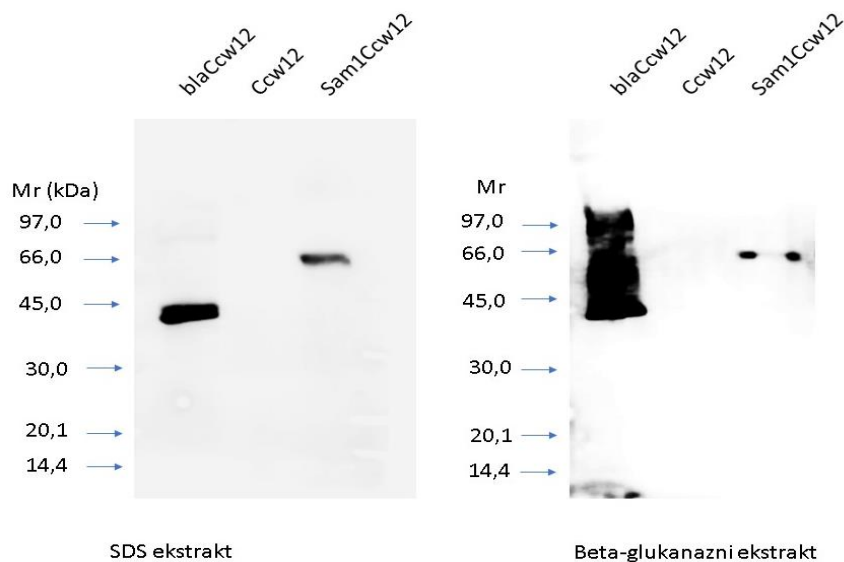
Kako bi se utvrdilo izlaže li se i kovalentno veže fuzijski protein Sam1-Ccw12-3xHA na površinu stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*, u idućem koraku je plazmid pRSII423-ccw12sam1-3ha transformiran u soj BY 4741. U tu svrhu korišten je postupak transformacije kvasca temeljen na uporabi litijevog acetata (poglavlje 3.2.8). Nakon transformacije, selekcija transformanata provedena je na krutim hranjivim podlogama bez histidina (YNB His⁻).

4.1.3. Detekcija fuzijskog proteina izloženog na staničnoj stijenci kvasca

Kako bi se utvrdilo izlučuje li se i kovalentno veže fuzijski protein Sam1-Ccw12-3xHA na površinu stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*, soj kvasca koji nosi plazmid pRSII423-ccw12sam1-3ha uzgajan je na podlozi bez fosfata, nakon čega su njegovi proteini stanične stijenke izolirani, razdvojeni elektroforezom SDS-PAGE i podvrgnuti imunoblotu tijekom kojeg je korišteno anti-HA protutijelo.

Kako bi se inducirala ekspresija fuzijskog proteina Sam1-Ccw12-3xHA, koji je na plazmidu pRSII423-ccw12sam1-3ha kodiran pod kontrolom kvašćevog promotora *PHO5*, transformant kvasca uzgajan je u fosfatom-bogatoj YNBP⁺ His⁻ podlozi do eksponencijalne faze rasta i zatim precijepljen u podlogu bez fosfata YNBP⁻ His⁻ (poglavlje 3.2.9). Uz novokonstruirani soj kvasca, na ovaj način su uzgajani i soj kvasca koji nosi plazmid pRSII423-ccw12bla te stoga služi kao pozitivna kontrola, kao i soj kvasca koji nosi plazmid pRSII423-ccw12 te stoga služi kao negativna kontrola tijekom imunoblota (poglavlje 3.1.5).

Nakon induciranja promotora *PHO5* u tri navedena soja kvasca, proteini njihovih staničnih stijenki su izolirani (poglavlje 3.2.10), razdvojeni elektroforezom SDS-PAGE (poglavlje 3.2.11) te analizirani imunoblotom (poglavlje 3.2.12, Slika 10). Na ovaj način detektirana je prisutnost fuzijskog proteina Sam1-Ccw12-3xHA u SDS ekstraktu, što ukazuje da je ovaj protein prisutan na staničnoj stijenci kvasca i da je barem jedna njegova frakcija na staničnu stijenkku vezana nekovalentnim vezama. Dodatno, fuzijski protein identificiran je i u β -glukanaznom ekstraktu, potvrđujući da se dio proteina Sam1-Ccw12-3xHA kovalentno veže na staničnu stijenkku kvasca, specifično na β -1,6-glukan putem GPI sidra. Konačno, uzimajući u obzir da je predviđena masa fuzijskog proteina 50 kDa, dok detektirana vrpca sugerira masu veću od 60 kDa, fuzijski protein vjerojatno je glikoziliran tijekom svojeg prolaska kroz sekretorni put stanice.



Slika 10. Rezultati imunoblota proteina stanične stijenke prisutnih u SDS ekstraktu i u β -glukanaznom ekstraktu. Lijevo od membrana naznačene su veličine vrpca korištenog proteinskog standarda. *blaCcw12* – fuzijski protein kodiran plazmidom pRSII423-ccw12bla (pozitivna kontrola), *Ccw12* – protein kodiran plazmidom pRSII423-ccw12 (negativna kontrola), *Sam1Ccw12* – fuzijski protein Sam1-Ccw12-3xHA kodiran plazmidom pRSII423-ccw12sam1-3ha.

4.2. Rasprava

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam iz carstava Fungi koji se od davnina koristi u pekarstvu i proizvodnji piva i vina, a u novije vrijeme i kao modelni eukariotski mikroorganizam za proučavanje metaboličkih puteva. Ovaj mikroorganizam odlikuje kratko generacijsko vrijeme, jednostavan uzgoj i visoka učinkovitost fermentacije. Sukladno tome, danas kvasac *S. cerevisiae* ima sve veću ulogu u proizvodnji finih kemikalija kao što su vitamini i hormoni.

U svrhu razvoja novih bioprocasa, danas se razvijaju sojevi kvasaca koji biotehnološki zanimljive enzime izlažu na površini svoje stanične stijenke. Ova metoda ne samo da pojednostavljuje postupak pročišćavanja produkta bioprocasa, već i povećava kapacitet za provođenje različitih enzimskih reakcija. Konstrukcija ovakvih sojeva uključuje fuziju otvorenog okvira čitanja gena željenog proteina s onim koji kodira za nativni protein stanične stijenke. Na taj način, protein od interesa može biti vezan na staničnu stijenku bilo spajanjem s

N- ili C-terminalnom regijom nativnog proteina, ili čak integracijom unutar samog nativnog proteina stanične stijenke.

Cilj ovog rada bio je odrediti izlaže li se i kovalentno veže na staničnu stijenku, preko GPI sidra, fuzijski protein Sam1-Ccw12, koji se sastoji od S-adenozil-metionin sintetaze i C-terminalnog dijela proteina stanične stijenke Ccw12. U tu svrhu je najprije konstruiran novi plazmid koji kodira za Sam1-Ccw12 fuzijski protein koji nosi tri puta uzastopce ponovljenu HA-oznaku. Ovaj plazmid zatim je unesen u standardni laboratorijski soj BY 4741 kvasca *S. cerevisiae* u kojemu je potom inducirana ekspresija fuzijskog proteina. Konačno, imunoblotom je ispitano je li novokonstruirani fuzijski protein prisutan u nekovalentno i kovalentno vezanim frakcijama proteina stanične stijenke.

Rezultati imunoblota potvrdili su prisutnost fuzijskog proteina u obje, kovalentno i nekovalentno vezanoj frakciji proteina stanične stijenke. Na ovaj način prvi put je potvrđeno da se fuzijski protein koji sadrži enzim S-adenozil-metionin sintetazu može efikasno izložiti na površini stanične stijenke kvasca i na nju kovalentno vezati preko GPI sidra. Važno je za istaknuti da izlaganje proteina na površinu stanice kvasca nije moguće ostvariti s bilo kojim proteinom, budući da kontrolni mehanizmi sekretornog puta neke od njih vrlo efikasno razgrađuju. Stoga rezultati imunoblota ujedno potvrđuju da S-adenozil-metionin sintetaza može uspješno proći kroz sekretorni put kvasca *S. cerevisiae*, kao i da je unutar tog sekretornog puta podložna glikozilaciji, što je vidljivo na temelju njezinog sporijeg-od-očekivanog putovanja tijekom elektroforeze SDS-PAGE.

Budući da je ovdje prikazanim imunoblotom kvalitativno dokazano da se opisani fuzijski protein izlaže na staničnu stijenku kvasca, u budućim eksperimentima u Laboratoriju za biokemiju će se pristupiti kvantifikaciji izloženog fuzijskog proteina, kao i odrediti je li izložena S-adenozil-metionin sintetaza enzimski aktivna.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju ovog eksperimentalnog rada možemo zaključiti:

1. Uspješno je konstruiran plazmid pRSII423-ccw12sam1-3ha, koji kodira za fuzijski protein Sam1-Ccw12-3xHA.
2. Fuzijski protein Sam1-Ccw12-3xHA, koji sadrži S-adenozil-metionin sintetazu, uspješno je izložen na površinu stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*.
3. Fuzijski protein Sam1-Ccw12-3xHA veže se kovalentno, preko GPI sidra, i nekovalentno na staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae*.
4. Fuzijski protein Sam1-Ccw12-3xHA uspješno prolazi kroz sekretorni put kvasca *S. cerevisiae*.

6. LITERATURA

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

Anwar I, Muhammad F, Awais MM, Akhtar M (2017). A review of β -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *Worlds Poult Sci J* **73**, 1-11. doi:10.1017/S0043933917000241

Cappellaro C, Baldermann C, Rachel R, Tanner W (1994). Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J* **13**, 4737–4744. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06799.x>

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>

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

Goossens K, Stassen C, Stals I, Donohue DS, Devreese B, De Greve H, Willaert RG (2010). The N-Terminal Domain of the Flo1 Flocculation Protein from *Saccharomyces cerevisiae* Binds Specifically to Mannose Carbohydrates. *ASM Sci J*, **10**, 110 - 117. <https://doi.org/10.1128/ec.00185-10>

Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**:373–383. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00137-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00137-8)

Kimple ME, Brill AL, Pasker RL (2013) Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci* **73**, 9.9.1–9.9.23. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>

Klis FM (1994) Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**, 851–869. <https://doi.org/10.1002/yea.320100702>

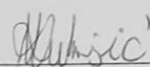
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 239–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x>
- Kobayashi O, Hayashi N, Kuroki R, Sone H (1998) Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. *Int. J. Bacteriol* **180**, 6503–6510. <https://doi.org/10.1128/JB.180.24.6503-6510.1998>
- Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis F, Cabib E (1997) Architecture of the Yeast Cell Wall. *J Biol Chem* **272**, 17762 - 17775. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17762>
- Lipke PN, Ovalle R (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Int. J. Bacteriol* **180**, 3735–3740. <https://doi.org/10.1128/JB.180.15.3735-3740.1998>
- Lozančić M, Hossain SA, Mrša V, Teparić R (2018) Surface Display—An Alternative to Classic Enzyme Immobilization. *Catalysts* **9**, 728. <https://doi.org/10.3390/catal9090728>
- Lu CF, Kurjan J, Lipke PN (1994) A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol Cell Biol* **14**, 4825–4833. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.7.4825-4833.1994>
- Montijn RC, Van Rinsum J, Van Schoger FA, Klis FM (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side-chain. *J. Biol. Chem.* **269**, 19338–19342
- Mrša V, Tanner W, (1999) Role of NaOH-Extractable Cell Wall Proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (Members of the Pir Protein Family) in Stability of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Yeast* **15**, 813–820. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199907\)15:10A<813::AID-YEA421>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199907)15:10A<813::AID-YEA421>3.0.CO;2-Y)
- Orlean P (2012) Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**, 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Orlean PA (1997) Biogenesis of Yeast Wall and Surface Components. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* **21**, 229-362. <http://dx.doi.org/10.1101/0.229-362>
- Smith DB (2000) Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies. *Meth Enzymol* **326**, 254–270. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26059-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26059-x)

Smith DB, Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31–40.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90005-4)

Valentin E, Herrero E, Sentandreu R (1986) Incorporation of mannoproteins into the walls of aculeacin A-treated yeast cells. *Arch Microbiol* **146**, 214-220.
<https://doi.org/10.1007/BF00403219>

Izjava o izvornosti

Ja Andela Vukšić 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