

Zamjena signalne sekvence i njezin utjecaj na aktivnost rekombinantnog proteina Pir2bla izloženog na površini stanične stijenke

Duvnjak, Anita

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:814123>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Anita Duvnjak
0058217482**

**ZAMJENA SIGNALNE SEKVENCE I NJEZIN
UTJECAJ NA AKTIVNOST REKOMBINANTNOG
PROTEINA Pir2bla 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
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Zamjena signalne sekvence i njezin utjecaj na aktivnost rekombinantnog proteina Pir2bla izloženog na površini stanične stijenke

Anita Duvnjak, 0058217482

Sažetak:

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* može na svojoj staničnoj stijenci izložiti proteine, ukoliko posjeduju signalnu sekvencu koja ih usmjerava na površinu stanice. Međutim, slabo je istraženo kako zamjena izvorne signalne sekvence s drugom signalnom sekvencom utječe na efikasnost izlaganja proteina, kao i može li se takva strategija primijeniti za povećanu efikasnost izlaganja biotehnološki zanimljivih proteina na površinu stanične stijenke. U ovom radu istraženo je kako zamjena signalne sekvence nativnog proteina stanične stijenke Pir2 sa signalnom sekvencom proteina Ccw12 utječe na izlaganje fuzijskog proteina Pir2bla. U tu svrhu, nakon konstrukcije i uvođenja odgovarajućeg plazmida u soj kvasca BY 4741, kolorimetrijskim nitrocefinskim testom uspoređena je efikasnost izlaganja obiju inačica proteina. Rezultati testa pokazali su da kvasac *S. cerevisiae* na svojoj stijenci u prosjeku izlaže 17 % manje inačice proteina sa Ccw12 signalnom sekvencom, ali i da ova razlika u efikasnosti izlaganja nije statistički značajna ($p = 0,15$).

Ključne riječi: izlaganje heterolognih proteina, stanična stijenka, signalna sekvenca, *Saccharomyces cerevisiae*, β -laktamaza

Rad sadrži: 28 stranica, 11 slika, 4 tablice, 25 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

Komentor: -

Pomoć pri izradi: -

Datum obrane: 8. rujna 2023.

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

Replacement of signal sequence and its effect on the activity of Pir2bla recombinant protein exposed on the cell wall

Anita Duvnjak, 0058217482

Abstract:

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can display on its cell wall proteins whose signalling sequence directs them to the cell's surface. However, little is known about how exchanging the original signalling sequence for another such sequence affects protein display, as well as whether this strategy could enhance the surface display of biotechnologically relevant proteins. In this study, we investigated how replacing the signalling sequence of the cell surface protein Pir2 with that of Ccw12 affects the surface display of the fusion protein Pir2bla. After constructing and introducing the appropriate plasmid into yeast strain BY 4741, the surface display efficiency of both protein versions was compared using a colorimetric nitrocefin test. The results showed that, on average, *S. cerevisiae* displayed 17% fewer proteins with the Ccw12 signalling sequence, although this difference in efficiency was not statistically significant ($p = 0.15$).

Keywords: surface display, cell wall, signaling sequence, *Saccharomyces cerevisiae*, β -lactamase

Thesis contains: 28 pages, 11 figures, 4 tables, 25 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

Co-mentor: -

Technical support and assistance: -

Thesis defended: September 8, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. SEKRETORNI PUT I IZLUČIVANJE PROTEINA VAN STANICE.....	3
2.3. SIGNALNA SEKVENCA	6
2.4. UČINAK ZAMJENE SIGNALNE SEKVENCE NA IZLUČIVANJE PROTEINA..	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. MATERIJALI.....	9
3.1.1. Kemikalije.....	9
3.1.2. Uređaji.....	11
3.1.3. Laboratorijski sojevi	12
3.1.4. Hranjive podloge.....	12
3.1.5. Plazmidi	13
3.1.6. Početnice	14
3.2. METODE	15
3.2.1. Izolacija plazmida iz bakterije <i>E. coli</i>	15
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. <i>polymerase chain reaction</i>).....	15
3.2.3. Agarozna elektroforeza DNA	16
3.2.4. Izolacija DNA iz agaroznog gela	16
3.2.5. Sastavljanje fragmenata DNA po Gibsonu	17
3.2.6. Transformacija bakterije <i>E. coli</i>	17
3.2.7. Sekvenciranje 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. Mjerenje aktivnosti β -laktamaze vezane na površinu stanične stijenke.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19

4.1.	REZULTATI.....	19
4.1.1.	Serijski plazmid pRSII423-pir2bla	19
4.1.2.	Konstrukcija plazmida pRSII423-pir2bla_N	20
4.1.3.	Konstrukcija soja kvasca <i>S. cerevisiae</i>	22
4.1.4.	Usporedba aktivnosti β -laktamaze na površini stanice kvasca	22
4.2.	RASPRAVA.....	24
5.	ZAKLJUČCI.....	26
6.	POPIS LITERATURE	27

1. UVOD

U istraživanjima i industriji jedan od najvažnijih modelnih organizama je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Osim jednostavnosti njegova uzgoja i mikroskopske veličine, koja omogućuje uzgoj velike količine stanica u relativno malom volumenu hranjive podloge, značajke ovog eukariotskog organizma vrlo su slične značajkama humanih stanica. Stoga stanice kvasca *S. cerevisiae* pružaju mogućnost proizvodnje proteina i drugih staničnih sastojaka namijenjenih za ljudsku upotrebu. U biotehnološkoj proizvodnji kvasac *S. cerevisiae* značajan je u fermentacijskim procesima koji su bitan dio proizvodnje vina, piva, fermentirane hrane, etanola te finih kemikalija, a primjenu nalazi i u pekarstvu gdje se koristi za dizanje tijesta. U znanstvenim istraživanjima, kvasac *S. cerevisiae* značajan je zbog velikog potencijala genetičkih modifikacija kojima se može dobiti organizam s karakteristikama optimalnim za potrebe istraživanja. Nadalje, stanična stijenka ovog kvasca ima visoki potencijal izlaganja rekombinantnih proteina na svojoj površini koji i nakon izlaganja zadržavaju svoju aktivnost.

Kako bi se poboljšala efikasnost izlaganja proteina na staničnoj stijenci kvasca *S. cerevisiae* preko proteina Pir2, u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prethodno je razvijen fuzijski protein Pir2bla (Pir2- β -laktamaza). Ovaj protein izvjestitelj omogućuje mjerenje uspješnosti izlaganja i vezanja rekombinantnih proteina na površinu stanice pomoću nitrocefina, kromogenog supstrata β -laktamaze koji ne prolazi kroz staničnu membranu.

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati kako zamjena izvorne signalne sekvence proteina Pir2bla sa signalnom sekvencom proteina Ccw12 utječe na efikasnost izlaganja rekombinantnog proteina Pir2bla na staničnu stijenu. U tu svrhu konstruiran je i unesen u stanicu kvasca plazmid koji kodira za protein izvjestitelj Pir2bla s izmijenjenom signalnom sekvencom te je izmjerena aktivnost takvog rekombinantnog proteina izloženog na površinu stanične stijene.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KVASAC *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jedan je od najvažnijih modelnih mikroorganizama. Ovaj jednostanični organizam, promjera oko 5 μm , dio je carstva Fungi (Duina i sur., 2014) te kao eukariot sadrži organele, stanične odjeljke koji provode određene funkcije i koji su od citoplazme odijeljeni vlastitim membranama. Mikroskopski prikaz stanica kvasca *S. cerevisiae* prikazuje **Slika 1**.



Slika 1. Mikroskopski prikaz stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Cotoia, 2020)

Stanice kvasca *S. cerevisiae* mogu biti u diploidnom ili haploidnom obliku, ovisno o uvjetima okoline. U uvjetima nedostatka hranjivih tvari, diploidne stanice kvasca podliježu mejozi i sporulaciji, tvoreći četiri haploidne spore. Haploidne stanice kvasca mogu biti α i a tipa parenja te se, u povoljnim uvjetima, dvije stanice različitog tipa parenja spajaju i tvore diploid. Kvasac *S. cerevisiae* također se može nespolno razmnožavati pupanjem, u generacijskom vremenu od 90 min. U procesu pupanja, novonastala stanica kćer raste kao pup na stanici majci, a zatim se odvaja od stanice majke, ostavljajući joj ožiljak.

Kvasac *S. cerevisiae* značajan je u industriji jer je jeftin i jednostavan za uzgoj. Ovaj mikroorganizam tvori kolonije na agaroznim podlogama unutar nekoliko dana bez potrebe za posebnim uvjetima inkubacije. Dobro podnosi zamrzavanje i pohranu u glicerolu na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, kao i liofiliziranje, nakon čega ga je moguće čuvati na sobnoj temperaturi (N'Guessan i sur., 2016; Cabrera i sur., 2020). Kvasac *S. cerevisiae* često se upotrebljava za fermentacijske procese zbog velike sposobnosti pretvorbe šećera u etanol i ugljikov dioksid (CO_2), posebno u proizvodnji alkoholnih pića i u pekarstvu, za dizanje tijesta.

Za razliku od drugih modelnih organizama, poput bakterije *Escherichia coli* i nematoda *Caenorhabditis elegans*, kvasac *S. cerevisiae* može živjeti na način „proizvodnja-akumulacija-konzumacija“, baziranom na Crabtree efektu (Parapouli i sur., 2020). Crabtree efekt naziv je za pojavu u kvascu *S. cerevisiae* da u aerobnim uvjetima i u prisustvu velike količine izvora ugljika ne koristi aerobne puteve razgradnje šećera i time potiče rast biomase, već iz piruvata proizvodi etanol i ostale spojeve s dva ugljikova atoma. Time kvasac eliminira druge mikrobnе vrste i svodi zahtjev za sterilnost proizvodnih procesa na prirodno zaštićeni proces jer toksičnost etanola zaustavlja rast drugih vrsta. Nakon eliminacije konkurentnih mikrobnih vrsta, kvasac ima mogućnost iskoristiti proizvedeni etanol za vlastiti rast.

Genom kvasca *S. cerevisiae* prvi je u cijelosti sekvencirani eukariotski genom (Duina i sur., 2014). Haploidni genom ove vrste veličine je oko 12.000 kb, raspoređen na 16 kromosoma te u prosjeku nosi jedan protein-kodirajući gen na svake 2 kb. Prema tome, u odnosu na ljudski genom, genom kvasca ima 50 puta veću gustoću kodirajućih gena, što se uvelike pripisuje manjem udjelu introna.

U usporedbi s drugim mikrobima i višestaničnim organizmima, genom kvasca *S. cerevisiae* djelomično je konzerviran (Karathia i sur., 2011). Naprimjer, 20 % proteina kvasca homologno je proteinima kodiranim u domeni *Archaea*. Nadalje, 27 % proteina kvasca ima svoje homologe u domeni *Bacteria*. U istraživanju provedenom na 59 vrsta iz domene *Eukaryotes*, zaključeno je kako 40-60 % svih kvašćevih proteina uključenih u MAPK signalne puteve, prijenos signala i helikaznu aktivnost ima ortologe u svim ispitanim eukariotskim vrstama. Nadalje, 60-80 % proteina uključenih u mikrotubularnu organizaciju također je pronađeno u svim ispitanim vrstama. Upravo ove sličnosti u sekvencama prisutnima u genomima različitih organizama omogućuju istraživanje bioloških procesa specifičnih organizama korištenjem kvasca *S. cerevisiae* kao modelnog organizma.

Iz prethodno navedenih razloga, kvasac *S. cerevisiae* nalazi značajnu primjenu u velikom broju istraživanja. Ova vrsta predstavlja izvor vrlo važnih informacija vezanih za organizaciju, evoluciju i funkciju genoma te pruža veliku mogućnost kreiranja genetski modificiranih sojeva, ovisno o potrebama istraživanja.

2.2. SEKRETORNI PUT I IZLUČIVANJE PROTEINA VAN STANICE

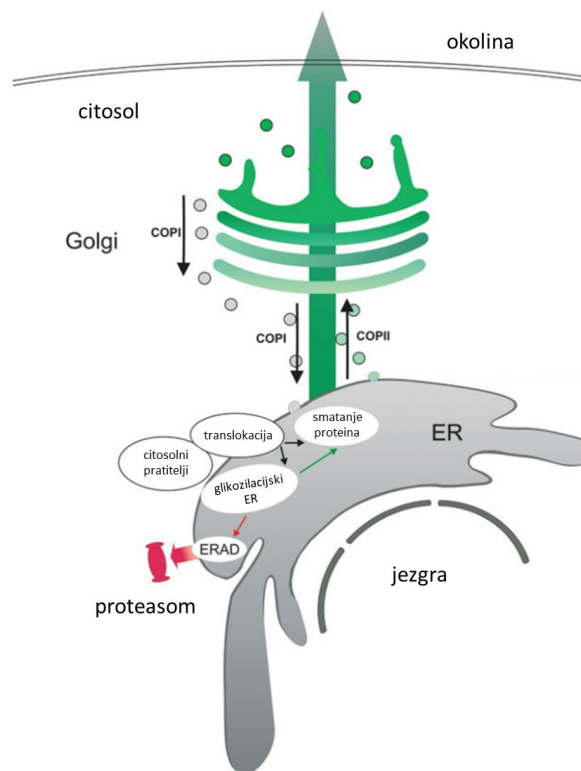
Izlučivanje proteina ključna je funkcija za život svih stanica i prisutna je u svim živim bićima. U jednostaničnim organizmima, izlučivanje proteina van stanice ujedno je i izlučivanje proteina van organizma, dok se u višestaničnim organizmima proteini mogu izlučivati u

međustanične prostore ili van organizma. Pritom se proteini do stanične membrane prenose sekretornim putem.

Razlikujemo neregulirani i regulirani sekretorni put. Neregulirani sekretorni put kontinuirano prenosi proteine do stanične membrane, ovisno o brzini njihove sinteze, ali neovisno o vanjskim utjecajima koji djeluju na stanicu. Pritom se proteini koji se izlučuju smataju u prikladnu konformaciju i pakiraju u transportne vezikule koje se usmjeravaju prema staničnoj membrani, s kojom se konačno i fuzioniraju (Gupta, 2022). Istovremeno s nereguliranim, stanica usmjerava proteine i u regulirani sekretorni put, u sklopu kojeg se proteini unutar stanice akumuliraju u posebnim odjeljcima koji se, pod utjecajem određenog stimulansa, spajaju sa staničnom membranom i ispuštaju svoj sadržaj u izvanstanični prostor. Regulirani sekretorni put iznimno je značajan u višestaničnim organizmima u kojima je ključan za hormonalnu regulaciju i živčanu komunikaciju (Stöckli i sur., 2016).

Eukariotske stanice proteine izlučuju u izvanstanični prostor pomoću endoplazmatskog retikuluma (ER) i Golgijevog aparata, kao i proteina nužnih za pravilno djelovanje ovih organela. Proteini koji sudjeluju u sekretornom putu osiguravaju pravilno smatanje i modifikaciju proteina, kao i njihovo razvrstavanje i transport u lizosome ili do stanične membrane. Da bi se protein mogao izlučiti iz stanice, on mora sadržavati signalni peptid na N-terminalnom kraju, kao i sekundarni signal koji ga lokalizira u pojedinu organelu sekretornog puta (Shikano i Colley, 2013). Značaj sekretornog puta posebno naglašava činjenica da preko 9 % ukupnog proteoma kvasca *S. cerevisiae*, tj. preko 540 proteina, nosi signalni peptid (Delic i sur., 2013).

Kada se izlučuju, proteini ulaze u interakciju s nekoliko specijaliziranih proteinskih kompleksa. Ovakvi proteini najprije se translociraju kroz membranu ER-a jednim od dva mehanizma: istovremeno kada se transliraju (kotranslacijski) ili nakon što je njihova translacija završena (posttranslacijski) (Pool, 2022). Proteini translocirani u lumen ER-a zatim se glikoziliraju i poprimaju funkcionalnu konformaciju uz pomoć proteina pratitelja i enzima koji ih posttranslacijski modificiraju, poput disulfid izomeraze, ER oksidaze Ero1 i enzima kodiranih genima *ALG*. Ukoliko se proteini ne uspiju smotati ili njihova konformacija bude neispravna, oni se vraćaju u ER gdje se razgrađuju. Ispravno smotani proteini se COPII vezikulama transportiraju u Golgijev aparat gdje se pakiraju u sekretorne vezikule i izlučuju van stanice. S druge strane, COPI vezikule služe za transport nazad u cis-Golgijev aparat i ER. Sekretorni put s COPII i COPI vezikulama shematski prikazuje **Slika 2**.



Slika 2. Shematski prikaz sekretornog puta proteina. ER – endoplazmatski retikulum, ERAD – degradacija vezana uz endoplazmatski retikulum. Preuzeto i prilagođeno iz Delic i sur., 2013

U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* proteini koji se izlučuju moraju proći kroz jednu od dvije translokonske pore. Translokonske pore su transmembranski proteinski kompleksi sastavljeni od proteinskih podjedinica različitih veličina, hidrofилnosti i funkcije, a njihove konformacijske promjene omogućuju translokaciju proteina kroz membranu ER-a. Kodirajuće sekvence ovih proteinskih podjedinica najčešće su visoko konzervirane, budući da su esencijalne za translokaciju proteina i preživljavanje stanice (Gemmer i Fo, 2020).

Za kotranslacijsku translokaciju bitna je interakcija između nesmotanog proteina, ribosoma, signalne receptorske čestice (SRP, engl. *signal receptor particle*), signalnog receptora (SR, engl. *signal receptor*) i translokonske pore Ssh1 ili translokonske pore Sec61. Signalna receptorska čestica kompleks je od šest proteina (Srp14, Srp21, Srp54, Srp68, Srp72 i Sec65) i 7S jednolančane RNA kodirane genom *SCR1*. Sve komponente kompleksa, osim podjedinice Srp54, spajaju se u jezgri. Nakon izlaska u citosol, u kompleks se veže i Srp54 podjedinica, bitna za prepoznavanje i vezanje kompleksa na novonastajući polipeptid. Vezanjem ovog kompleksa na novonastajući protein, proces translacije se zaustavlja sve dok se ribosom ne veže na translokonsku poru. Prijenos takvog proteina u ER regulira interakcija između tri GTP-aze, podjedinice Srp54 i dvije podjedinice signalnog receptora. Kada su sve tri

GTP-aze u GTP-veznom stanju, signalni peptid prenosi se na translokonsku poru te se nakon hidrolize GTP-a SRP-SR kompleks otpušta s ribosom-protein kompleksa, dok navedeni kompleks i dalje ostaje vezan na translokonsku poru.

Posttranslacijska translokacija neovisna je o signalnoj receptorskoj čestici. Nakon otpuštanja s ribosoma, polipeptidi koje cilja ovaj proces moraju ostati nesmotani i nepovezani u agregate kako bi se translokacija mogla odviti, što se postiže vezanjem polipeptida na citoplazmatske proteine pratitelje Ssa1 i Ydj1. Za odvijanje posttranslacijske translokacije u ER bitan je SEC kompleks koji se sastoji od sedam proteina (Sec61, Sbh1, Sss1, Sec62, Sec63, Sec71 i Sec72). Unutar ovog kompleksa, signalne peptide ciljanih proteina prepoznaje podjedinica Sec62, dok ATP-azna aktivnost proteina pratitelja Kar2 najvjerojatnije potiče posttranslacijsku translokaciju ciljanog proteina, povlačeći ga u ER (Delic i sur., 2013).

2.3. SIGNALNA SEKVENCA

Signalna sekvenca je kratki hidrofobni peptid na kraju proteina nužan za njegovo usmjeravanje u ER i izlučivanje van stanice. Osim što usmjerava protein u određeni put izlučivanja, signalna sekvenca utječe na efikasnost translokacije, trenutak svojeg odcjepljenja od ostatka proteina te funkciju proteina nakon njegovog izlučivanja. Signalne sekvence dijele se na četiri tipa: odcjepljujuće signalne sekvence, signalne usidrene sekvence tipa II, signalne usidrene sekvence tipa III i repna sidra. Odcjepljujući signalni peptidi dio su nosivih lanaca inzulina i membranskih proteina tipa I. Signalne usidrene sekvence tipa II kodirane su u transmembranskim proteinima poput faktora nekroze tumora, dok su signalne usidrene sekvence tipa III kodirane na proteinima tipa Sec61 β . Konačno, repna sidra mogu se naći na nosivom proteinu Sec61 γ .

Odcjepljujući signalni peptidi su najzastupljeniji tip signalne sekvence. Oni obično čine prvih 30 aminokiselina kodirajuće sekvence, ali se mogu nalaziti i unutar kodirajuće sekvence proteina. Ove signalne sekvence nemaju univerzalnu primarnu strukturu već ona varira ovisno o vrsti proteina. Signalni peptidi karakterizirani su s tri specifične regije: nesmotana n-regija (često pozitivno nabijena), hidrofobna h-regija u obliku α -heliksa i polarna c-regija (**Slika 3**). N-regija nalazi se na N-terminalnom kraju peptida i određuje orijentaciju signalnog peptida u proteinskom kanalu Sec61, a time i topologiju membranskog proteina. H-regija je hidrofobna i najčešće sadrži 7-15 aminokiselina, ali ne više od 18-20 aminokiselina. C-regija obično sadrži 3-7 aminokiselina pri čemu na pozicijama -1 i -3, u odnosu na peptidnu vezu koja se cijepa u trenutku odcjepljivanja signalnog peptida, ima male nenabijene aminokiselinske skupine.

Signalni peptid ulazi u ER tako da je njegova c-regija okrenuta prema lumenu ER-a, a n-regija prema citosolu. U slučaju transmembranskih proteina tipa I, odcjepljenje signalnog peptida uzrokuje inverziju njegove topologije, čime se njegova n-regija okreće prema lumenu ER-a, a c-regija prema citosolu (Liaci i Förster, 2021).



Slika 3. Shema tipične odcjepljujuće signalne sekvence. Preuzeto i prilagođeno iz Zalucki i Jennings, 2017

Prije nego što se protein izluči iz stanice, signalni peptid se u ER-u uklanja pomoću enzimskog kompleksa signalne peptidaze (SPC, engl. *signal peptidase complex*) (Liaci i sur., 2021). Signalna peptidaza u aktivnom mjestu sadrži aminokiselinski ostatak histidina i katalizira reakciju cijepanja pomoću dijade histidina i serina ili trijade aspartata, histidina i serina. Ovaj enzim vrlo je selektivan za signalne peptide, ali je njegov točan mehanizam prepoznavanja signalne sekvence još uvijek neistražen.

2.4. UČINAK ZAMJENE SIGNALNE SEKVENCE NA IZLUČIVANJE PROTEINA

Izlučivanje proteina van stanice, kao i količina izlučenog proteina, određeni su signalnom sekvencom, koja može biti nativni ili naknadno dodani dio endogenog ili heterolognog proteina. Sukladno tome, zamjenom signalne sekvence može se utjecati na prinos željenog proteina.

Kako ne postoji univerzalna signalna sekvenca koja bi omogućila efikasno izlučivanje bilo kojeg proteina, danas se mogu koristiti hijerarhijske metode sastavljanja sekvenci kojima se izrađuju knjižnice signalnih peptida (engl. *secretion library*), tj. serije konstrukata koje sparuju ciljani protein s različitim signalnim sekvencama. Pomoću ovakvih knjižnica može se proučiti veliki broj konstrukata i odabrati ona kombinacija signalne sekvence i ciljanog proteina koja daje najbolje prinose izlučenog proteina.

Naprimjer, za kvasac *Pichia pastoris* generirana je knjižnica s deset signalnih peptida, pri čemu je kao protein izvjestitelj korišten enzim invertaza (Thak i sur., 2020). Modularni alat za generiranje takve knjižnice razvijen je primjenom standardiziranih regulatornih elemenata

karakterističnih za taj kvasac kojima je omogućena kontrola ekspresije gena preko šest različitih promotora i deset signalnih sekvenci. U navedenom primjeru, najveći prinos pokazao je signalni peptid SP23, analog signalnom peptidu α MF u kvascu *S. cerevisiae*, ali nije utvrđena povezanost efikasnosti izlučivanja i fizikalno-kemijskih svojstava signalnog peptida.

U budućim istraživanjima potrebno je ispitati kako ostali značajni faktori, npr. N-terminalni kraj proteina, duljina i sekundarna struktura signalne sekvence te njihove interakcije, utječu na efikasnost izlučivanja. Kako bi se povećao prinos izlučenog proteina, osim odabira optimalne signalne sekvence, razmatraju se i strategije za povećanje učinkovitosti translokona, kao što su prekomjerna ekspresija komponenti translokona te stabilizacija citoplazmatskih proteina pratitelja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- agar – Biolife (Milano, Italija)
- agarozna – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- aminokiseline:
 - asparagin, triptofan, uracil – Acros Organics (Geel, Belgija)
 - leucin – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- ampicilin – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- boja za nanošenje uzorka na gel za elektroforezu – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- deionizirana voda (sdH₂O)
- smjesa „drop-out“ (**Tablica 1**)
- 500 x koncentrirana otopina elemenata u tragovima (**Tablica 2**)
- 96 % etanol – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- etidijev bromid – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- glukoza – Lach-Ner d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- kemikalije za lančanu reakciju polimerazom: 5x koncentrirani Q5 reakcijski pufer, 10 mM dNTPs, Q5 visokopouzdana DNA polimeraza – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- kemikalije za sklapanje fragmenata DNA metodom po Gibsonu: NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- komplet kemikalija za izolaciju DNA iz agaroznog gela: NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit – Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)
- komplet kemikalija za izolaciju plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*: NucleoSpin[®] Plasmid Kit – Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)
- kvašćev ekstrakt – Biolife (Milano, Italija)
- 1,0 M litijev acetat (LiAc) – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- nitrocefim – Calbiochem (San Diego, SAD)
- jednolančana DNA „nosač“ (ssDNA carrier, 2,0 mg/mL) – Invitrogen (Waltham, Massachusetts, SAD)
- polietilen glikol PEG 3350 (50 % w/v) – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)

- soli:
 - kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – Merck (Darmstadt, Njemačka)
 - kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) – Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
 - kalijev klorid (KCl) – Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
 - kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4) – Acros Organics (Geel, Belgija)
 - magnezijev sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
 - natrijev citrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) – T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
 - natrijev klorid (NaCl) – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- standard za DNA elektroforezu – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- tripton – Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- YNB-AA – Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- vitamini: 1000x 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 ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g/L
borna kiselina (H_3BO_3)	0,25 g/L
bakrov sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,20 g/L
cinkov sulfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,20 g/L
kalijev jodid (KI)	0,05 g/L
magnezijev sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,20 g/L
željezov(III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g/L

Tablica 3. Sastav 1000x 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 pantotemat (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 322 A – Tehnica (Podplat, Slovenija)
- centrifuga MiniSpin – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- kadice za elektroforezu Mini-Sub Cell GT – Bio-Rad (Hercules, California, SAD)
- magnetna miješalica MMS-3000 – Biosan (Riga, Latvija)
- napajanje za elektroforezu Mighty Slim Sx250 – Hoefer (Kansas City, Missouri, SAD)
- pH metar FiveEasy – Mettler Toledo (Columbus, Ohio, SAD)
- spektrofotometar BioSpectrometer Basic – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- spektrofotometar Helios γ – ThermoElectric Corporation (West Chester, Philadelphia, SAD)
- spektrofotometar NanoDrop One – ThermoFischer Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- termostat – Memmert (Schwabach, Njemačka)
- transiluminator s plavim svjetlom Skylight Super-Blue (Vilber, Collégien, Francuska)
- transiluminator s UV svjetlom Uvidoc HD6 – Uvitec Ltd (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- tresilica Corning LSE – Corning (Corning, New York, SAD)
- tresilica New Brunswick Innova 40 – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- tresilica za grijaćom pločom TS-100C – Biosan (Riga, Latvija)

- uređaj za PCR Multigene Mini (Labnet, New Jersey, SAD)
- vorteks VM-10 – Witeg (Wertheim, Njemačka)

3.1.3. Laboratorijski sojevi

- umnažanje i kloniranje plazmida: NEB Stable kompetentne stanice bakterije *E. coli*, genotipa $F' proA^+B^+ lacIq \Delta(lacZ)M15 zzz::Tn10 (Tet^R)/\Delta(ara-leu) 7697 araD139 fhuA \Delta lacX74 galK16 galE15 e14- \Phi80dlacZ\Delta M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$
- mjerenje aktivnosti β -laktamaze: transformanti soja BY 4741 kvasca *S. cerevisiae*, genotipa MATa *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*

3.1.4. Hranjive podloge

U radu je korišteno pet različitih hranjivih podloga, koje su prije upotrebe sterilizirane u autoklavu pri temperaturi od 121 °C.

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), agar (15 g/L), ampicilin (100 μ g/mL)
- tekuća hranjiva podloga 2xYT
sastojci: tripton (16 g/L), kvašćev ekstrakt (10 g/L), NaCl (5 g/L), ampicilin (100 μ g/mL; dodan neposredno prije upotrebe hranjive podloge)

Hranjive podloge za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*:

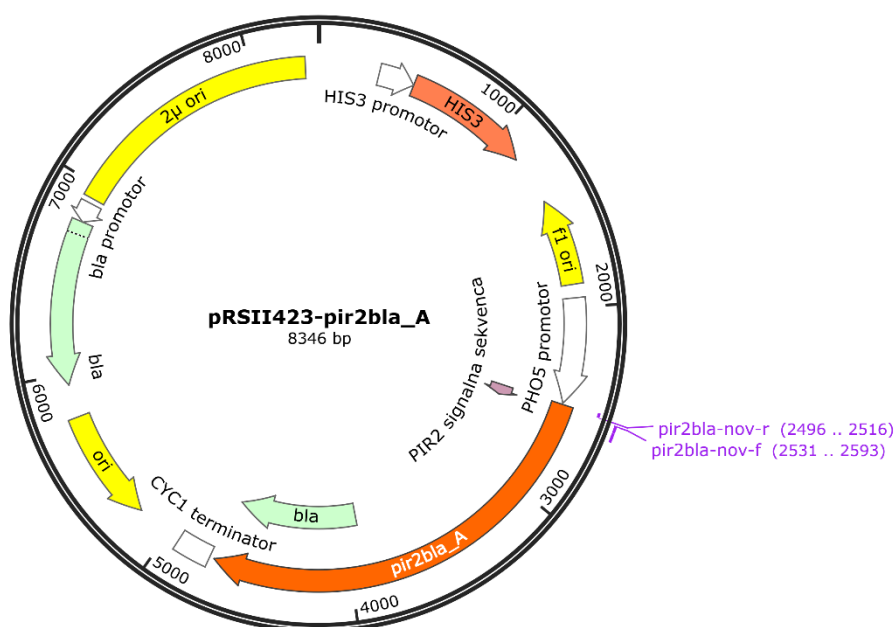
- YPD (kompleksna podloga za uzgoj kvasca)
sastojci: kvašćev ekstrakt (10 g/L), pepton (20 g/L), glukoza (20 g/L)
- YNBP⁺ His⁻ (tekuća hranjiva podloga s fosfatom)
sastojci: YNB bez dodanih aminokiselina (6,7 g/L), smjesa „drop-out“ (1,6 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), uracil (0,08 g/L), leucin (0,16 g/L), triptofan (0,08 g/L), 50 %-tna otopine glukoze (20 mL/L, dodana neposredno prije upotrebe hranjive podloge)
- YNBP⁻ His⁻ (tekuća hranjiva podloga bez fosfata)
sastojci: KCl (1 g/L), asparagin (2 g/L), MgSO₄·7H₂O (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 koncentrirana otopina elemenata u tragovima (1 mL/L), uracil (0,08 g/L), leucin (0,16 g/L), triptofan (0,08 g/L).

Prije sterilizacije pH podloge podesi se na 5,5. Nakon sterilizacije u podlogu se dodaje 250x koncentrirana otopina riboflavina i vitamina (2 mL/L), 1000x koncentrirana otopina biotina i vitamina (500 µL/L) i 50 %-tna otopina glukoze (20 mL/L, dodana neposredno prije upotrebe hranjive podloge).

3.1.5. Plazmidi

Plazmid pRSII423-pir2bla_A

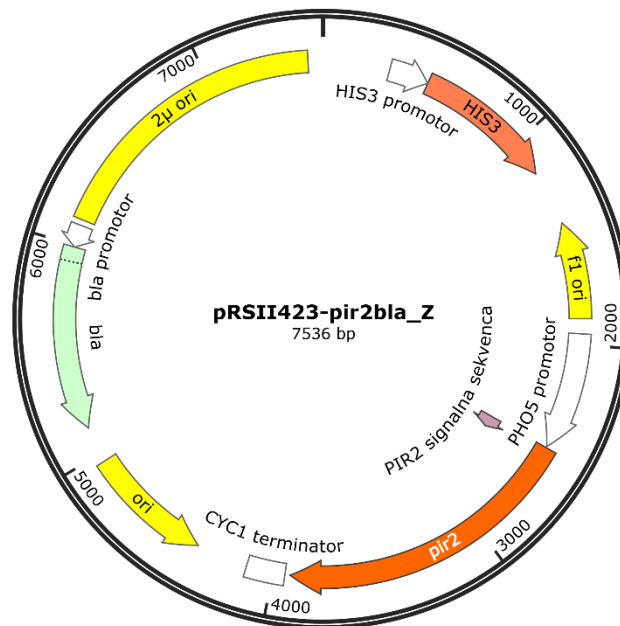
Plazmid pRSII423-pir2bla_A (Slika 4) sadrži gen *pir2bla_A*. Ovaj gen kodira za fuzijski protein Pir2-β-laktamazu koji se izlučuje iz stanica kvasca *S. cerevisiae* i veže za njihovu staničnu stijenku preko proteina Pir2, za koji kodira N-terminalna polovica fuzijskog proteina. Ovaj plazmid korišten je za konstrukciju ciljnog plazmida pRSII423-pir2bla_N.



Slika 4. Plazmidna mapa plazmida pRSII423-pir2bla_A. Oznake: *ori* – plazmidno ishodište replikacije iz bakterije *E. coli*, *bla* – gen koji kodira za β-laktamazu, *bla* promotor – promotor gena *bla*, *pir2bla_A* – fuzijski protein koji se, redom, sastoji od signalne sekvence gena *PIR2*, ORF-a gena *PIR2*, 3x uzastopce ponovljene hemaglutininske oznake i ORF-a gena *bla*, *PHO5* promotor – promotor kvasca *S. cerevisiae* aktivan kada u podlozi nedostaje fosfata, *fl ori* – ishodište replikacije filamentoznog bakteriofaga M13, *HIS3* – funkcionalni kvašćev gen koji služi kao selektivni biljeg, omogućavajući kvascu rast na podlozi bez histidina, promotor *HIS3* – promotor gena *HIS3*, *2µ ori* – ishodište replikacije u kvascu *S. cerevisiae*, terminator *CYC1* – terminator gena *CYC1* kvasca *S. cerevisiae*.

Plazmid pRSII423-pir2bla_Z

Plazmid pRSII423-pir2bla_Z sadrži identične sekvence kao i plazmid pRSII423-pir2bla_A, osim što umjesto gena *PIR2BLA_A* nosi gen *PIR2*, koji kodira za proteina Pir2, ali ne i enzim β -laktamazu. Posljedično, stanice transformirane ovim plazmidom izlučuju protein koji nema β -laktamaznu aktivnost te služe kao negativna kontrola pri mjerenju aktivnosti β -laktamaze vezane na površinu stanične stijenke kvasca.



Slika 5. Plazmidna mapa plazmida pRSII423-pir2bla_Z. Navedene oznake identične su kao na Slici 4.

3.1.6. Početnice

- pir2bla-nov-f
 - TTTTCTACTGTCGCTTCTATCGCCGCTGTCGCCGCTGTCGCTTCTGC
CGCTGCTTCCGAACCATGGTCCACT
- pir2bla-nov-r
 - ATAGAAGCGACAGTAGAAAATTGCATGAGCTCTGGTAATC
- b-pho5-seq
 - TGATGTTTTGCTAAGTCG

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija plazmida iz bakterije *E. coli*

U sterilnu mikrokivetu izdvoji se 5 mL kulture bakterije *E. coli* uzgojene u 2xYT tekućoj podlozi s ampicilinom te se kulturu centrifugira 30 s na 11.000 g. Dobiveni supernatant se ukloni, a talog resuspendira u 250 µL pufera A1. Nakon toga doda se 250 µL pufera A2 te se suspenzija promiješa okretanjem mikrokivete (pufer A2 prije upotrebe treba homogenizirati okretanjem boce zbog moguće prisutnosti istaloženog SDS-a, što može nepovoljno utjecati na reakciju). Suspenzija se inkubira 5 min na sobnoj temperaturi tijekom kojih se odvija liza stanica.

Nakon dodatka 300 µL pufera A3, suspenzija se ponovo promiješa okretanjem mikrokivete sve dok se suspenzija ne obezboji. Sadržaj mikrokivete centrifugira se 5 min na 11.000 g pri sobnoj temperaturi, a supernatant prebaci u NucleoSpin® Plasmid kolonu s kolekcijskom tubicom i centrifugira 1 min na 11.000 g. Kolekcijska tubica se isprazni, a u kolonu se doda 500 µL pufera AW, nakon čega se kolona centrifugira 1 min na 11.000 g. Kolekcijska tubica se isprazni i u kolonu se doda 600 µL pufera A4. Kolona se centrifugira 1 min na 11.000 g, nakon čega se kolekcijska tubica ponovno isprazni.

Kako bi se osiguralo potpuno uklanjanje etanolnog pufera A4 te sušenje ionskog izmjenjivača, kolonica se dodatno centrifugira 2 min na 11.000 g. Kolekcijska tubica se odbaci, a kolona se premjesti u čistu sterilnu mikrokivetu od 1,5 mL. Zatim se na ionski izmjenjivač doda 50 µL pufera AE te se provede inkubacija od 1 min na sobnoj temperaturi, nakon čega se kolonica centrifugira 1 min na 11.000 g. Dobiveni eluat sadrži izoliranu plazmidnu DNA iz bakterije *E. coli*, što se potvrdi mjerenjem na spektrofotometru NanoDrop One (Macherey-Nagel, 2023).

3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*)

Na ledu se priredi reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 µL koja sadrži:

- 10,0 µL 5 x koncentriranog reakcijskog pufera Q5
- 1,0 µL 10 mM dNTP-ova
- 2,5 µL 10 µM uzvodne početnice
- 2,5 µL 10 µM nizvodne početnice
- 0,5 µL izolirane plazmidne DNA
- 0,5 µL DNA polimeraze Q5
- 33,0 µL sterilne deionizirane vode

Reakcijska smjesa stavi se u uređaj za PCR. Početna denaturacija provede se kroz 30 s, nakon čega uslijedi 30 ciklusa reakcije PCR, od kojih se svaki sastoji od denaturacije od 10 s na 98 °C, komplementarnog sparivanja početnica (engl. *annealing*) od 20 s na 65 °C te koraka sinteze u trajanju od 7,5 min na 72 °C. Završna sinteza provede se kroz 20 min na 72 °C (New England Biolabs).

3.2.3. Agarozna elektroforeza DNA

U tikvicu se doda 30 mL 1 x TAE pufera te se u njemu, zagrijavanjem do vrenja, otopi 0,21 g agaroze kako bi se dobilo 30 mL 0,7%-tnog agaroznog gela za elektroforezu. Gel se ohladi približno do 50 °C, izlije u kalup s prethodno postavljenim češljicom za formiranje jažica i jednokratnim trakama koje sprječavaju istjecanje gela te ohladi na sobnu temperaturu kako bi se polimerizirao.

Kalup s ohlađenim gelom uroni se u kadnicu za elektroforezu ispunjenu 1 x TAE puferom te se ukloni češljic. U prvu jažicu na gelu nanese se 4 µL standarda za DNA elektroforezu, a u preostale jažice 2 µL uzorka DNA prethodno pomiješanog s bojom za nanošenje uzorka. Elektroforeza se provede na 140 V u trajanju od 45 min.

Po završetku elektroforeze, gel se uroni u otopinu etidijeva bromida i inkubira 20 min. Pomoću transiluminatora s UV svjetlom vizualiziraju se vrpce prisutne u gelu.

3.2.4. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Obojani agarozni gel s razdvojenim fragmentima DNA postavi se na transiluminator s plavim svjetlom te se izrežu vrpce koje sadrže željene fragmente DNA. Na svakih 100 mg izrezanog gela doda se 200 µL pufera NTI te se uzorak inkubira 5-10 min na 50 °C, uz povremeno preokretanje mikrokivete, kako bi se gel u potpunosti otopio. Kolona iz NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kompleta kemikalija postavi se u pripadajuću kolekcijsku tubicu te se u nju doda do 700 µL otopljenog uzorka, nakon čega se kolona centrifugira 30 s na 11.000 g. Kolekcijska tubica se isprazni, u kolonu se doda 700 µL pufera NT3, kolona se ponovo centrifugira 30 s na 11.000 g te se kolekcijska tubica ponovno isprazni. Ovaj korak ispiranja ponovi se još jednom.

Kako bi se pufer NT3 u potpunosti uklonio, kolona se centrifugira 1 min na 11.000 g, kolekcijska tubica isprazni te kolona dodatno inkubira 2-5 min na 70 °C. Zatim se kolona prebaci u čistu sterilnu mikrokivetu, u nju se doda 15-30 µL pufera NE te je se inkubira na

sobnoj temperaturi 1 min. Nakon inkubacije, kolona se centrifugira 1 min na 11.000 g kako bi se prikupila eluirana DNA izolirana iz gela (Macherey-Nagel, 2023).

3.2.5. Sastavljanje fragmenata DNA po Gibsonu

Na ledu se priredi reakcijska smjesa ukupnog volumena 6 μL koja sadrži 3 μL uzorka DNA izoliranog iz agaroznog gela koncentracije 10 ng/ μL i 3 μL otopine NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix. Smjesa se inkubira u uređaju za PCR 15 min na 50°C, a zatim pohrani na -20 °C (New England Biolabs, 2021).

3.2.6. Transformacija bakterije *E. coli*

Zamrznute kompetentne stanice soja NEB Stable bakterije *E. coli* odmrznu se na ledu, u njih se doda 2 μL uzorka plazmidne DNA te se smjesa promiješa lupkanjem. Smjesa se inkubira na ledu 30 min, a zatim u termobloku na 42 °C u trajanju od 30 s kako bi došlo do toplinskog šoka. Smjesa se zatim inkubira na ledu 5 min, nakon čega joj se doda 950 μL medija SOC ugrijanog na sobnu temperaturu. Ovakva suspenzija inkubira se 1 h na 37 °C uz protresanje od 200 okr/min, nakon čega se nacijepi na selektivnu hranjivu podlogu LB s ampicilinom na kojoj, nakon prekonoćne inkubacije na 37 °C, porastu kolonije transformanata (New England Biolabs).

3.2.7. Sekvenciranje plazmidne DNA po Sangeru

U čiste mikrokivete od 1,5 mL odmjeri se po 12 μL uzorka pročišćene plazmidne DNA koncentracije 100 ng/ μL , pomiješa je se s 3 μL početnice za sekvenciranje (20 μM) te se poštom dostavi tvrtki Microsynth (Beč, Austrija) koja provodi sekvenciranje po Sangeru.

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

Jedna kolonija kvasca *S. cerevisiae* nacijepi se u 5 mL tekuće hranjive podloge YPD te se inkubira preko noći na tresilici pri 200 okr/min i 30 °C. Iduće jutro odredi se optička gustoća suspenzije mjerenjem spektrofotometrom na 600 nm. Zatim se u 50 mL tekuće hranjive podloge YPD doda $2,5 \cdot 10^8$ stanica kako bi početna koncentracija stanica u podlozi bila $5 \cdot 10^6$ stanica/mL. Kvasac se uzgaja na 200 okr/min pri 30 °C oko 4 h, dok koncentracija stanica ne dosegne $2 \cdot 10^7$ stanica/mL. Zatim se centrifugiranjem od 5 min na 3.000 g izdvoje stanice kvasca iz suspenzije te se resuspendiraju u 25 mL sterilne vode i centrifugiraju 5 min na 3.000 g i 20 °C. Korak ispiranja ponovi se još jednom. Talog stanica resuspendira se u 1 mL sterilne vode. Dobivena suspenzija prebaci se u mikrokivetu od 1,5 mL i centrifugira 30 s na 13.000 g. Dobiveni talog resuspendira se u 1 mL sterilne vode te se 100 μL uzorka prebaci u mikrokivetu

od 1,5 mL. Suspenzija se centrifugira 30 s na 13.000 g te se supernatant ukloni, a na talog stanica nadoda se 60 μ L PEG 3350 (50 %), 9 μ L LiAc (1,0 M), 12,5 μ L jednolančanog DNA „nosača“ (2 mg/mL), 6 μ L sterilne deionizirane vode (sdH₂O) i 2,5 μ L plazmidne DNA, čime se dobije smjesa ukupnog volumena 90 μ L. Talog stanica se vorteksiranjem u trajanju od 30 s pomiješa sa supernatantom te se smjesa inkubira u vodenoj kupelji 40 min na 42 °C, a zatim centrifugira 30 s na 13.000 g. Supernatant se potpuno ukloni te se talog resuspendira u 100 μ L sdH₂O, nacijepi na odgovarajuću krutu kemijski definiranu podlogu i inkubira do porasta pojedinačnih kolonija, tj. 3-4 dana na 30 °C (Gietz i Schiestl, 2007).

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

Transformanti kvasca *S. cerevisiae* uzgajaju se preko noći u tekućoj podlozi YNBP⁺ His⁻ na tresilici na 180 okr/min i 30 °C do stacionarne faze rasta. Uzgojena kultura stanica precijepi se u 15 mL svježje YNBP⁺ His⁻ tekuće hranjive podloge i inkubira na tresilici 5 h na 180 okr/min i 30 °C do ulaska u eksponencijalnu fazu rasta. Stanice kvasca izdvoje se iz podloge centrifugiranjem u trajanju od 5 min na 3.000 g te se isperu, tj. talog stanica se resuspendira u 15 mL deionizirane vode te se suspenzija centrifugira 5 min na 3.000 g. Postupak ispiranja se ponovi još jednom. Stanice se nacijepu u 15 mL selektivne tekuće podloge bez fosfata (YNBP⁻ His⁻), tako da konačna koncentracija stanica u podlozi bude 0,3 OD/mL, a zatim se inkubiraju preko noći na tresilici na 180 okr/min i 30 °C.

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

Mjerenje aktivnosti β -laktamaze provede se u tri paralele za svaki uzorak. Svakom uzorku izmjeri se OD₆₀₀ te se stanice kvasca iz hranjive podloge izdvoje centrifugiranjem 5 min na 3.000 okr/min. Talog se ispere u 15 mL deionizirane vode, a zatim u 15 mL prethodno pripremljenog kalijevog fosfatnog pufera, pH 7. Isprani talog resuspendira se u kalijevom fosfatnom puferu tako da je konačna koncentracija stanica u suspenziji 100 OD₆₀₀/mL. Priredi se prvo decimalno razrjeđenje suspenzije stanice od kojeg se 7,5 μ L suspenzije pomiješa s 467,5 μ L kalijevog fosfatnog pufera. Odgovarajuća slijepa proba sadrži samo 475 μ L kalijevog fosfatnog pufera. Suspenzija se inkubira na tresilici s kontrolom temperature 2 min pri 1.200 okr/min i 30 °C, a zatim se u nju doda 25 μ L nitrocefina. Suspenzija se vrati na tresilicu s kontrolom temperature i inkubira 5 min na 1.200 okr/min i 30 °C. Reakcija se zaustavi centrifugiranjem u trajanju od 30 s na 8.000 okr/min nakon čega se iz suspenzije izdvoji alikvot od 450 μ L koji se koristi za mjerenje apsorbancije pri 482 nm. Dobiveni podaci obrade se u računalnom programu Microsoft Office Excel.

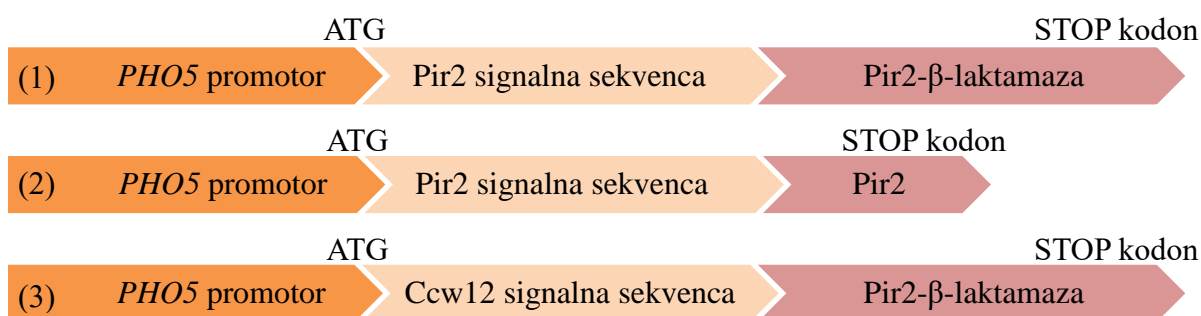
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

U ovom radu istraživano je kako zamjena izvorne Pir2 signalne sekvence proteina Pir2bla sa signalnom sekvencom proteina Ccw12 utječe na izlaganje navedenog proteina na površinu stanične stijenke. U tu svrhu konstruiran je novi plazmid, pRSII423-pir2bla_N, njime je transformiran soj BY 4741 kvasca *S. cerevisiae* te je primjenom nitrocefinskog testa uspoređena efikasnost izlaganja novokonstruiranog proteina s efikasnošću izlaganja izvornog proteina Pir2bla koji nosi Pir2 signalnu sekvencu.

4.1.1. Serija plazmida pRSII423-pir2bla

U istraživanjima provedenim u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu korištena je serija plazmida pRSII423-pir2bla. Svi plazmidi iz navedene serije sadrže bakterijsko plazmidno ishodište replikacije *ori*, koje omogućuje umnažanje plazmida u bakterijskoj stanici *E. coli*, te ishodište replikacije 2μ *ori*, koje omogućuje umnažanje plazmida u kvascu *S. cerevisiae*. Plazmid pRSII423-pir2bla_A izvorni je plazmid ove serije. Ovaj plazmid kodira za fuzijski protein Pir2bla (**Slika 6**). Navedeni protein na svojem N-kraju kodira za signalnu sekvencu proteina Pir2, nakon koje slijede ostatak proteina Pir2 i enzim β -laktamaza. Plazmid pRSII423-pir2bla_Z u eksperimentima služi kao negativna kontrola i kodira za signalnu sekvencu proteina Pir2 kao i ostatak proteina Pir2, ali ne i za enzim β -laktamazu. Konačno, cilj ovog rada bio je konstruirati plazmid pRSII423-pir2bla_N, koji kodira za signalnu sekvencu proteina Ccw12, protein Pir2, kojemu nedostaje njegova izvorna signalna sekvenca, i enzim β -laktamazu, te ispitati kako je zamjena signalne sekvence utjecala na efikasnost izlaganja novokonstruiranog proteina na staničnu stijenku.

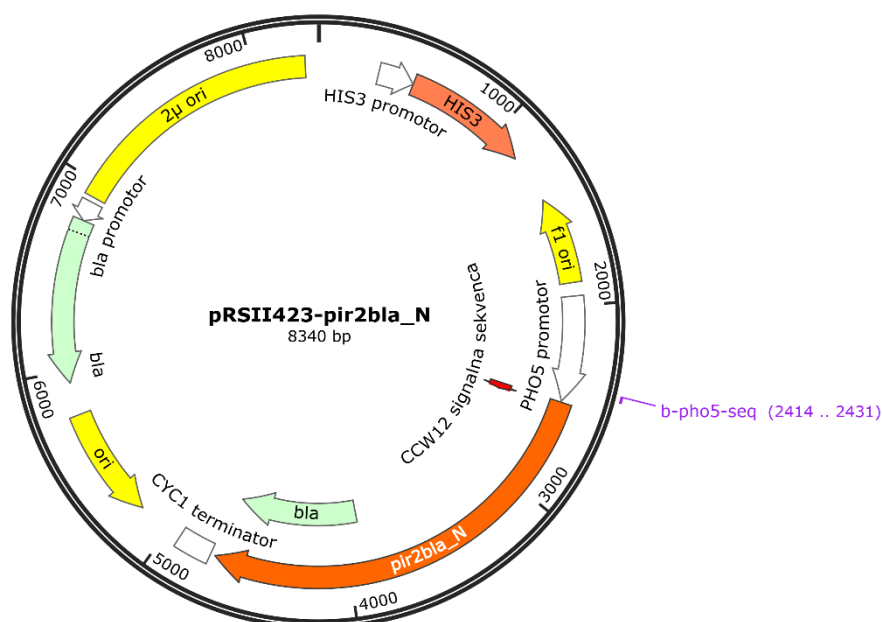


Slika 6. Shematski prikaz gena *pir2bla_A* (1), *pir2bla_Z* (2) i *pir2blaN* (3). Prikazani geni kontrolirani su inducibilnim promotorom *PHO5* te kodiraju za različite signalne sekvence i/ili fuzijske proteine.

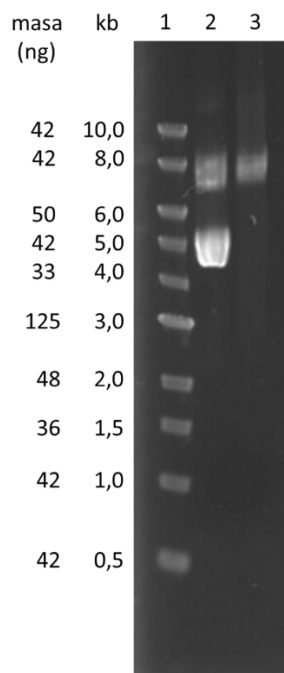
4.1.2. Konstrukcija plazmida pRSII423-pir2bla_N

Plazmid pRSII423-pir2bla_N konstruiran je na temelju plazmida pRSII423-pir2bla_A (Slika 4), izoliranog iz bakterije *E. coli* (poglavlje 3.2.1). Za razliku od plazmida pRSII423-pir2bla_A, novokonstruirani plazmid kodira za fuzijski protein koji nosi signalnu sekvencu proteina Ccw12 umjesto signalne sekvence proteina Pir2.

Plazmid pRSII423-pir2bla_N (Slika 7) konstruiran je umnažanjem okosnice cjelokupnog plazmida pRSII423-pir2bla_A, uz iznimku regije koja kodira za izvornu signalnu sekvencu fuzijskog proteina Pir2. Umnažanje je provedeno reakcijom PCR (poglavlje 3.2.2), korištenjem visokotočne polimeraze Q5 i početnica pir2bla-nov-f i pir2bla-nov-r (poglavlje 3.1.6) koje su na svojim 5'-krajevima kodirale za signalnu sekvencu proteina Ccw12. Nakon provedene PCR reakcije, umnoženi PCR produkt izoliran je iz gela (poglavlje 3.2.4) te je uspješnost izolacije provjerena agaroznom DNA elektroforezom (poglavlje 3.2.3, Slika 8). Pritom je veličina izoliranog linearnog PCR produkta uspoređena s veličinom plazmida pRSII423-pir2bla_A koji je korišten kao kalup u reakciji PCR.

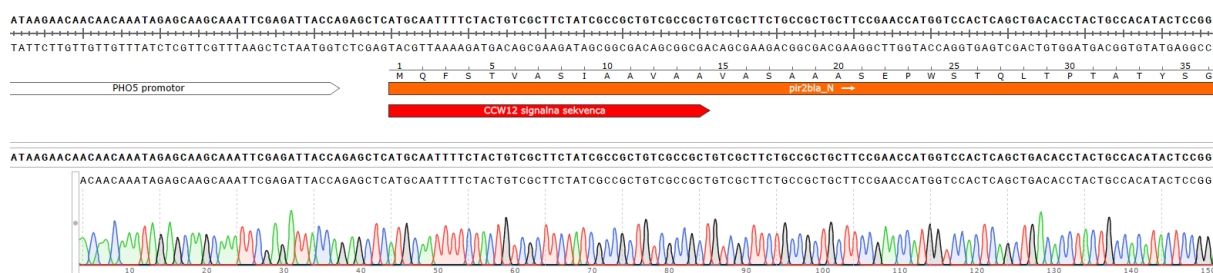


Slika 7. Plazmidna mapa plazmida pRSII423-pir2bla_N. Navedene oznake identične su kao na Slici 4.



Slika 8. Rezultat agarozne gel elektroforeze plazmida pRSII423-pir2bla_A, koji je poslužio kao kalup za reakciju PCR, i PCR produkta pročišćenog iz agaroznog gela. Uzorci: 1) standard za DNA elektroforezu 1 kb ladder (NEB), 2) nepocijepani plazmid pRSII423-pir2bla_A, 3) PCR produkt pročišćen iz gela.

Konstrukcija plazmida pRSII423-pir2bla_N zatim je nastavljena cirkularizacijom PCR produkta metodom po Gibsonu pomoću kompleta kemikalija NEB HiFi Assembly (poglavlje 3.2.5) te korištenjem dobivene reakcijske smjese za transformaciju kompetentnih stanica bakterije *E. coli* (poglavlje 3.2.6). Pritom je transformacijska smjesa nacijepljena na selektivne LB ploče s ampicilinom na kojima je, nakon prekonoćne inkubacije, poraslo stotinjak transformanata. Iz jednog od poraslih transformanata izoliran je plazmid koji je zatim pomoću početnice b-pho5-seq (poglavlje 3.1.6) sekvenciran po Sangeru (poglavlje 3.2.7). Analiza kromatograma dobivenog ovakvim sekvenciranjem (**Slika 9**) potvrdila je da je Pir2 signalna sekvenca uspješno zamijenjena Ccw12 signalnom sekvencom dok je ostatak nukleotidnog slijeda gena ostao nepromijenjen, tj. da je plazmid pRSII423-pir2bla_N uspješno konstruiran.



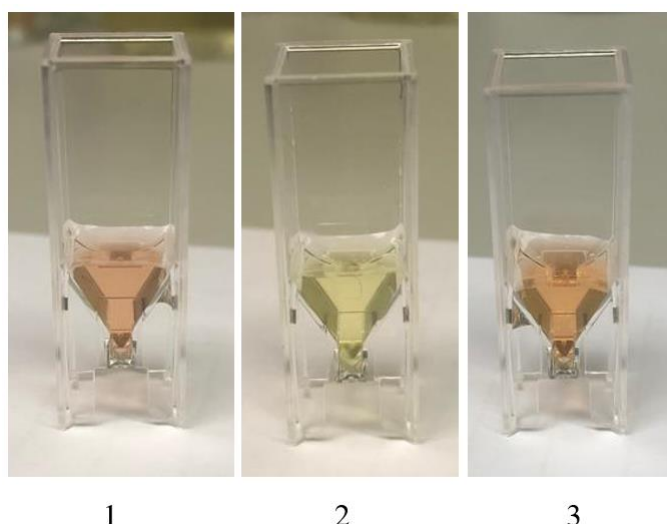
Slika 9. Rezultati sekvenciranja plazmida pRSII423-pir2bla_N po Sangeru. Očekivana sekvenca plazmida, zajedno s oznakama određenih regija plazmida, prikazana je u gornjoj polovici slike, dok su poravnani kromatogram dobiven sekvenciranjem i iz njega očitana sekvenca prikazani u donjoj polovici slike.

4.1.3. Konstrukcija soja kvasca *S. cerevisiae*

Nakon što je plazmid pRSII423-pir2bla_N uspješno konstruiran, isti plazmid zatim je unesen u stanice kvasca *S. cerevisiae*. U tu svrhu, soj BY 4741 transformiran je metodom temeljenoj na uporabi litijeveg acetata (poglavlje 3.2.8) nakon čega su transformanti kvasca selekcionirani na pločama s fosfatom koje ne sadrže histidin (YNBP⁺ His).

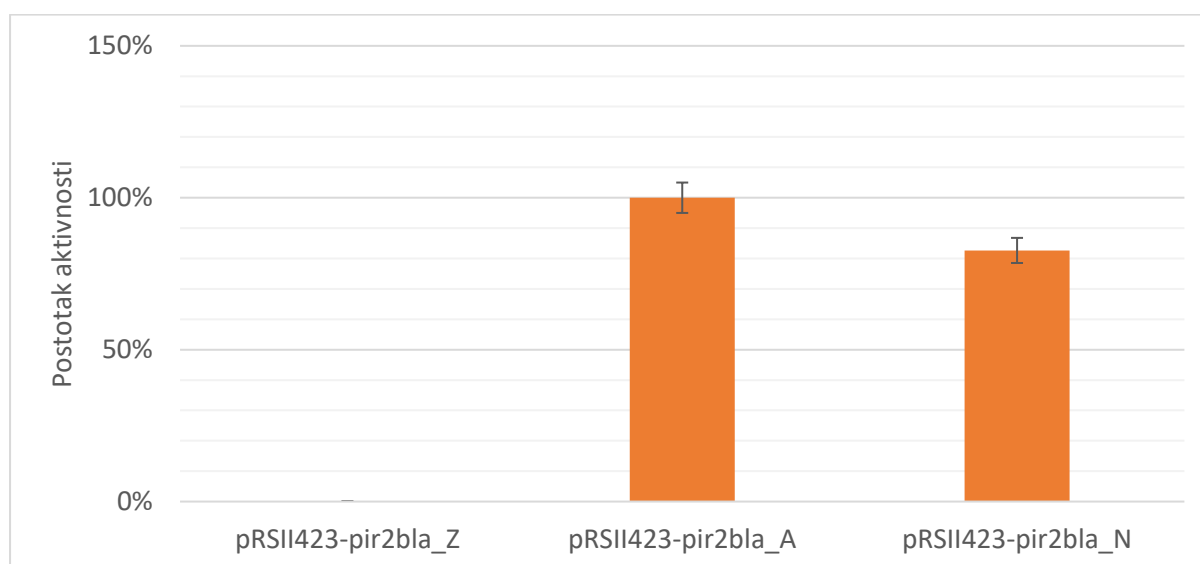
4.1.4. Usporedba aktivnosti β-laktamaze na površini stanica kvasca

U posljednjem setu eksperimenata ispitano je kako na izlaganje rekombinantnog proteina Pir2bla na površinu stanične stijenke kvasca utječe zamjena njegove izvorne Pir2 signalne sekvence sa signalnom sekvencom proteina Ccw12. Kako bi se usporedila efikasnost izlaganja različitih Pir2bla fuzijskih proteina na staničnoj stijenci kvasca, određena je koncentracija β-laktamaze na površini tri derivata soja BY 4741 koji su nosili plazmide pRSII423-pir2bla_A, pRSII423-pir2bla_Z i pRSII423-pir2bla_N. Pritom je tijekom mjerenja soj s plazmidom pRSII423-pir2bla_Z služio kao negativna kontrola. Tijekom ovih eksperimenata inducirana je ekspresija gena pod kontrolom promotora *PHO5* (poglavlje 3.2.9), nakon čega je korišten nitrocefinski test koji prati cijepanje β-laktamskog prstena nitrocefina čime nastaje crveno obojeni produkt (poglavlje 3.2.10) čijom se spektrofotometrijskom kvantifikacijom određuje količina β-laktamaze prisutne na staničnoj stijenci kvasca. Kao što prikazuje **Slika 10**, nitrocefinski test potvrdio je da soj koji nosi plazmid pRSII423-pir2bla_Z ne izlaže β-laktamazu na svojoj staničnoj stijenci, tj. da ne cijepa nitrocefim u crveno obojani produkt. S druge strane, sojevi koji nose plazmide pRSII423-pir2bla_A i pRSII423-pir2bla_N preveli su nitrocefim u njegov crveno obojani produkt, čime je potvrđeno da ovi sojevi izlažu β-laktamazu na svojoj staničnoj stijenci.



Slika 10. Supernatant zaostao nakon nitrocefinskog testa provedenog sa sojevima kvasca koji nose plazmide (1) pRSII423-pir2bla_A, (2) pRSII423-pir2bla_Z i (3) pRSII423-pir2bla_N.

U zadnjem eksperimentu provedena je i spektrofotometrijska kvantifikacija rezultata nitrocefinskog testa. Rezultati mjerenja aktivnosti β -laktamaze u tri paralele (**Slika 11**) pokazali su da stanice koje nose plazmid pRSII423-pir2bla_N iskazuju 83 % β -laktamazne aktivnosti u usporedbi sa stanicama koje nose izvoran plazmid pRSII423-pir2bla_A. Međutim, statistička obrada rezultata dvostranim Welchvim t-testom utvrdila je da dobivena razlika nije statistički značajna ($p = 0,1474$). Dakle, zamjena izvorne Pir2 signalne sekvence s Ccw12 signalnom sekvencom nije značajno utjecala na izlaganje fuzijskog proteina Pir2bla na površinu stanične stijenke.



Slika 11. Rezultati mjerenja aktivnosti β -laktamaze u stanicama koje sadrže plazmide pRSII423-pir2bla_Z, pRSII423-pir2bla_A i pRSII423-pir2bla_N. Prikazane su srednje vrijednosti tri biološke paralele i pripadajuće standardne devijacije.

4.2. RASPRAVA

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* eukariotski je mikroorganizam kojeg je lako genetički modificirati da izlučuje proteine iz stanice, ali i da ih veže na svoju staničnu stijenkku. Kao takav, ovaj organizam ima veliki potencijal u proizvodnji rekombinantnih proteina i razvoju novih bioprocasa temeljenih na proteinima vezanima na staničnu stijenkku.

U prethodnim istraživanjima u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu razvijen je fuzijski protein Pir2bla koji služi kao protein izvjestitelj za mjerenje efikasnosti izlaganja proteina na površini stanične stijenkke. U ovom radu zamijenjena je izvorna signalna sekvenca proteina Pir2bla sa signalnom sekvencom proteina stanične stijenkke Ccw12 te je ispitano kako ova zamjena utječe na efikasnost njegovog izlaganja na površini stanične stijenkke kvasca *S. cerevisiae*. Ovi eksperimenti daju uvid u efikasnost signalnih sekvenci proteina stanične stijenkke, ali i ispituju mogućnost poboljšavanja biotehnoloških procesa temeljenih na sojevima koji na staničnoj stijenci izlažu rekombinantne proteine.

U ovom radu, efikasnost izlaganja proteina na površini stanične stijenkke mjerena je nitrocefinskim testom. Ovaj test zasniva se na aktivnosti enzima β -laktamaze (Tooke i sur., 2019) koja je dio fuzijskog proteina Pir2bla i koja cijepa amidnu vezu četveročlanog β -laktamskog prstena nitrocefina (Kahlmeter i Brown, 2010), čime nastaje kolorimetrijski lako mjerljiv crveni produkt reakcije visokog apsorpcijskog koeficijenta ($\epsilon_{386} = 17.000$) (Eun, 1996). Ova metoda jedinstveno je prikladna za određivanje isključivo količine proteina izvjestitelja izloženog na površini stanične stijenkke jer nitrocefim ne prolazi kroz staničnu membranu te ga stoga ne može hidrolizirati neizloženi protein izvjestitelj, zaostao unutar stanice.

Rezultati mjerenja aktivnosti β -laktamaze pokazali su da zamjena izvorne signalne sekvence proteina Pir2bla sa signalnom sekvencom proteina stanične stijenkke Ccw12 nema značajan utjecaj na efikasnost izlučivanja rekombinantnog proteina Pir2bla. Na temelju navedenih rezultata ne možemo zaključiti da je u korištenim eksperimentalnim uvjetima ikoja od dvije signalne sekvence pogodnija od druge za izlaganje proteina Pir2bla na površinu stanične stijenkke, a time vjerojatno ni za izlaganje drugih biotehnološki zanimljivih proteina. Stoga je za povećanje efikasnosti izlaganja proteina potrebno ispitati utjecaj drugih signalnih sekvenci, kao i primijeniti komplementarne strategije, npr. konstruirati sojeve s većim

kapacitetom sekretornog puta ili staničnom stijjenkom koja na sebi može izložiti veću količinu rekombinantnih proteina.

5. ZAKLJUČCI

1. Konstruiran je novi plazmid pRSII423-pir2bla_N koji kodira za protein Pir2bla u kojem je Pir2 signalna sekvenca zamijenjena sa signalnom sekvencom proteina stanične stijenke Ccw12.
2. Konstruiran je soj kvasca *S. cerevisiae* BY 4741 koji u podlozi bez fosfata eksprimira protein Pir2bla sa signalnom sekvencom proteina Ccw12 te ga kroz sekretorni put izlučuje na površinu stanice.
3. Primjenom nitrocefinskog testa utvrđeno je da kvasac *S. cerevisiae* u prosjeku na svojoj stijenci izlaže 17 % manje Pir2bla inačice sa Ccw12 signalnom sekvencom u usporedbi s izvornom Pir2bla inačicom koja sadrži Pir2 signalnu sekvencu ($p = 0,15$).

6. POPIS LITERATURE

- Cabrera E, Welch LC, Robinson MR, Sturgeon CM, Crow MM, Segarra VA (2020) Cryopreservation and the Freeze-Thaw Stress Response in Yeast. *Genes (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/genes11080835>
- Cotoia A (2020) Saccharomyces Cerevisiae - The Definitive Guide | Biology Dictionary. Biology Dictionary. <https://biologydictionary.net/saccharomyces-cerevisiae/>. Pristupljeno 19. kolovoz 2023.
- Delic M, Valli M, Graf AB, Pfeffer M, Mattanovich D, Gasser B (2013) The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev* 37 872–914. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12020>
- 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>
- Eun H-M (1996) Marker/Reporter Enzymes. *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology* 567–645. <https://doi.org/10.1016/B978-012243740-3/50011-9>
- Gemmer M, Fo F (2020) A clearer picture of the ER translocon complex. *J Cell Sci* 133 1-11. <https://doi.org/10.1242/jcs.231340>
- Gietz RD, Schiestl RH (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2, 31–34. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2007.13>
- Gupta A (2022) Biosynthesis, intracellular-trafficking, and exocytosis of insulin granules. *Understanding Insulin and Insulin Resistance* 135–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820234-0.00006-8>
- Kahlmeter G, Brown D (2010) Laboratory control of antimicrobial therapy. In: Antibiotic and Chemotherapy. p 115–122.
- Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R (2011) Saccharomyces cerevisiae as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>

- Liaci AM, Förster F (2021) Molecular Sciences Take Me Home, Protein Roads: Structural Insights into Signal Peptide Interactions during ER Translocation. *Int J Mol Sci* **22**, 11871. <https://doi.org/10.3390/ijms222111871>
- Liaci AM, Steigenberger B, Telles De Souza PC, Marrink SJ, Scheltema RA, Tamara S, i sur. (2021) In brief Structure of the human signal peptidase complex reveals the determinants for signal peptide cleavage. *Mol Cell* **81**, 3934-3948.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.031>
- N'Guessan FK, Coulibaly HW, Alloue-Boraud MWA, Cot M, Djè KM (2016) Production of freeze-dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo. *Food Sci Nutr* **4**, 34. <https://doi.org/10.1002/FSN3.256>
- Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra A-S, Hatziloukas E (2020) Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications. *AIMS Microbiol* **6**, 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Pool MR (2022) Targeting of Proteins for Translocation at the Endoplasmic Reticulum. *Int J Mol Sci* **16**. <https://doi.org/10.3390/ijms23073773>
- Shikano S, Colley KJ (2013) Secretory Pathway. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* 203–209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00507-7>
- Stöckli J, Piper RC, James DE (2016) Regulated versus Constitutive Secretion – A Major Form of Intercellular Communication. *Encyclopedia of Cell Biology* **2**, 376–383. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20037-0>
- Thak EJ, Yoo SJ, Moon HY, Kang HA (2020) Yeast synthetic biology for designed cell factories producing secretory recombinant proteins. *FEMS Yeast Res* **20**, 9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa009>
- Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, i sur. (2019) β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol* **431**, 3472. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.04.002>
- Zalucki YM, Jennings MP (2017) Signal peptidase I processed secretory signal sequences: Selection for and against specific amino acids at the second position of mature protein. *Biochem Biophys Res Commun* **483**, 972–977. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.01.044>

Macherey-Nagel (2023) Bioanalysis Plasmid DNA purification. Macherey-Nagel

New England Biolabs PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491) | NEB. New England Biolabs. <https://international.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>. Pristupljeno 19. kolovoz 2023.

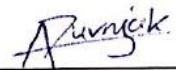
Macherey-Nagel (2023) Bioanalysis n NucleoSpin ® Gel and PCR Clean-up PCR clean-up and Gel extraction. Macherey-Nagel

New England Biolabs (2021) INSTRUCTION MANUAL NEBuilder ® HiFi DNA Assembly Master Mix/ NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit. New England Biolabs

New England Biolabs High Efficiency Transformation Protocol (C2987H/C2987I) | NEB. New England Biolabs. <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/high-efficiency-transformation-protocol-c2987>. Pristupljeno 19. kolovoz 2023.

Izjava o izvornosti

Ja, Anita Duvnjak, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis