

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Irena POHAR

**PRIPRAVA KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*
KOT MODELNEGA ORGANIZMA ZA ŠTUDIJ
DEREGULIRANE GLIKOLIZE, KI JE ZNAČILNA
ZA HUMANE RAKASTE CELICE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Irena POHAR

**PRIPRAVA KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* KOT
MODELNEGA ORGANIZMA ZA ŠTUDIJ DEREGULIRANE
GLIKOLIZE, KI JE ZNAČILNA ZA HUMANE RAKASTE CELICE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AS A
MODEL ORGANISM FOR STUDIES OF DEREGULATED
GLYCOLYSIS, WHICH IS CHARACTERISTIC FOR HUMAN
CANCER CELLS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 26. 1. 2016 za mentorico imenovala prof. dr. Darjo Žgur-Bertok, somentorja prof. dr. Matica Legišo in recenzenta prof. dr. Uroša Petroviča.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Somentor: prof. dr. Matic Legiša

Recenzent: prof. dr. Uroš Petrovič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: izr. prof. dr. Barbara JERŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Matic LEGIŠA

Kemijski inštitut, Oddelek za biotehnologijo

Član: prof. dr. Uroš PETROVIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Irena Pohar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 616-006.03:582.282.23(043)=163.6
KG	rak/humane rakaste celice/deregulirana glikoliza/fruktoza-6-fosfat-1-kinaza/kratek visokoaktiven fragment/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /heterologna ekspresija
AV	POHAR, Irena
SA	ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/ LEGIŠA, Matic (somentor)/ PETROVIČ, Uroš (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2016
IN	PRIPRAVA KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNEGA ORGANIZMA ZA ŠTUDIJ DEREGULIRANE GLIKOLIZE, KI JE ZNAČILNA ZA HUMANE RAKASTE CELICE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 51 str., 31 pregl., 13 sl., 59 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Značilno za rakaste celice je, da lahko v procesu glikolize zaradi njene deregulacije v bistveno večji meri porabljajo glukozo od nerakastih celic. V rakastih celicah namreč pride do posttranslacijske spremembe encima fruktoza-6-fosfat-1-kinaza (PFK1), glavnega regulatornega encima glikolize. Po proteolitični cepitvi nativnega encima PFK1 (85 kDa) na C-terminalnem delu nastane kratek fragment (47 kDa), ki izkazuje zmanjšano občutljivost na inhibicijo s citratom in ATP-jem. Rekombinanten visokoaktiven kratek fragment lahko umetno pripravimo z ekspresijo skrajšanega nativnega gena <i>PFK1</i> . Tako lahko z vnosom skrajšanega gena <i>PFKM</i> (mišičnega tipa) v kvasovko <i>S. cerevisiae</i> z izbitimi lastnimi geni za fruktoza-6-fosfat-1-kinazo pripravimo modelni organizem za študije deregulirane glikolize. Za nastanek aktivnega holoencima je kritična koncentracija sintetiziranih monomerov, zato smo izbrali dva ekspresijska vektorja, ki se razlikujeta v številu kopij na celico. Da bi preverili, ali se je sintetiziran fragment encima aktivno vključil v metabolizem kvasovke, smo testirali rast transformant na gojiščih z različnimi sladkorji (glukozo, fruktozo in maltozo). Transformante z vnešenim skrajšanim <i>PFKM</i> genom so rasle le na gojišču z maltozo. Sklepamo, da zaradi močnega izražanja kratkega fragmenta pride do prevelikega metabolnega stresa v celicah kvasovk na gojišču z monosaharidi, kar jim onemogoča rast na teh gojiščih.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Dn
DC	UDC 616-006.03:582.282.23(043)=163.6
CX	cancer/human cancer cells/deregulated glycolysis/6-phosphofructo-1-kinase/highly active shorter fragment / <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /heterologous expression
AU	POHAR, Irena
AA	ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/ LEGIŠA, Matic (co-advisor)/ PETROVIČ, Uroš (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2016
TI	PREPARATION OF THE YEAST <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AS A MODEL ORGANISM FOR STUDIES OF Deregulated GLYCOLYSIS, WHICH IS CHARACTERISTIC FOR HUMAN CANCER CELLS
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XII, 51 p., 31 tab., 13 fig., 59 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	A consistent characteristic of malignant cells is the consumption of a large amount of glucose compared to that of normal human cells. Deregulated glycolytic flux seems to be at the root of this event. The native 85 kDa 6-phosphofructo-1-kinase, a key regulatory enzyme of glycolysis, is normally under the control of feedback inhibition. In cancer cells posttranslational modifications of the native enzyme take place; proteolytic cleavage on the C-terminal position leads to the formation of an active shorter fragment (47 kDa), which is less sensitive to ATP and citrate inhibition. A recombinant, highly active short fragment can be prepared by the expression of the truncated native <i>PFK1</i> gene. By inserting the truncated <i>PFKM</i> (human muscle type) gene into the <i>S. cerevisiae</i> strain with its 6-phosphofructo-1-kinase genes knocked out, a model organism for the studies of deregulated glycolysis could be prepared. For the formation of an active holoenzyme, the concentration of the synthesized monomers is critical, so two different expression vectors (low and high copy number plasmids) were chosen. In order to check whether the synthesized enzyme fragment was actively involved in the metabolism of the yeast, growth of transformants was tested on culture media with different sugars: glucose, fructose or maltose. The transformants with the shortened <i>PFKM</i> gene grew only on the medium with maltose. We can conclude that due to the strong expression of the short fragment the high metabolic stress in the yeast cells in the media with fast fermentable sugars (glucose and fructose) prevents the growth on these media.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG.....	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJ RAZISKOVANJA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 RAK KOT BOLEZEN	2
2.2 GLIKOLIZA.....	3
2.2.1 Alternativne poti razgradnje glukoze – pot pentoze fosfata.....	4
2.2.2 Uravnavanje glikolize.....	5
2.3 ENCIM FRUKTOZA-6-FOSFAT-1-KINAZA	5
2.3.1 Kinetika encima	5
2.3.2 Evolucija encima.....	6
2.3.3 Humani PFK1	7
2.3.4 Kratek visokoaktiven fragment PFK1.....	7
2.3.4.1 Priprava kratkega sesalskega fragmenta PFKM <i>in vitro</i>	8
2.3.4.2 Visokoaktiven kratek fragment humanega PFKM (Fragment 9)	9
2.3.4.3 Kinetika Fragmenta 9	9
2.4 KVASOVKE KOT MODELNI ORGANIZEM	10
2.5 PRIMERJAVA METABOLIZMA OGLJIKOVIH HIDRATOV RAKASTIH CELIC IN KVASOVK <i>S. cerevisiae</i>	11
2.5.1 Zunanji dejavniki, ki vplivajo na rast	11
2.5.2 Primarni metabolizem.....	13
2.5.2.1 Prenašalci sladkorjev	13
2.5.2.2 Vzdrževanje NADH/NADPH razmerja.....	14

2.5.2.3 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	15
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 SEV KVASOVKE <i>S. cerevisiae</i> HD114-8D	17
3.2 PLAZMIDNA VEKTORJA p416GPD in p426GPD	17
3.3. VKLJUČKA nhPFKM IN sfPFKM	19
3.4 SESTAVA GOJIŠČ	19
3.4.1 Gojišče Sc – ura GE (z glicerolom in etanolom)	19
3.4.2 Gojišče Sc – ura s sladkorji (1 %)	19
3.4.3 Gojišče YEPGE	20
3.5 TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH CELIC <i>E. coli</i> SEV DH5λ S PLAZMIDNIMA VEKTORJEMA p416GPD IN p426GPD	20
3.5.1 Namnožitev transformiranih celic za izolacijo plazmidne DNA	20
3.6 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA p416GPD IN p426GPD IZ BAKTERIJSKIH CELIC <i>E. coli</i> SEV DH5λ	20
3.7 NAMNOŽITEV VKLJUČKA sfPFKM IN NATIVNEGA nhPFKM Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)	21
3.7.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov	21
3.7.2 Namnožitev vključka sfPFKM	22
3.7.3 Namnožitev vključka nhPFKM	23
3.8 AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA PRODUKTOV PCR	24
3.9 ČIŠČENJE PRODUKTOV PCR	25
3.10 PRIPRAVA VKLJUČKOV IN VEKTORJEV ZA LIGACIJO	25
3.10.1 Rezanje vključkov sfPFKM, nhPFKM in vektorja p416GPD	25
3.10.2 Rezanje vključkov sfPFKM, nhPFKM in vektorja p426GPD	26
3.11 AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA REZANIH VKLJUČKOV IN VEKTORJEV	27
3.12 ČIŠČENJE REZANIH VKLJUČKOV IN VEKTORJEV	27
3.13 LIGACIJA VKLJUČKOV V VEKTORJA	27
3.14 TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH CELIC <i>E. coli</i> SEV DH5λ S KONSTRUKTI	29
3.15 POTRDITEV KONSTRUKTOV	30
3.15.1 PCR in agarozna gelska elektroforeza	30
3.15.2 Priprava vzorcev za določitev nukleotidnega zaporedja rekombinantnih vključkov	32

3.16 TRANSFORMACIJA KVASOVKE <i>S. cerevisiae</i> sev HD114-8D S KONSTRUKTI.....	33
3.16.1 Priprava raztopin za transformacijsko mešanico.....	33
3.16.2 Sestava transformacijske mešanice.....	34
3.16.3 Trasformacija	34
3.17 ANALIZA TRANSFORMANT S PCR NA OSNOVI KOLONIJE.....	35
3.18 GOJENJE TRANSFORMIRANIH KVASOVK S KONSTRUKTI NA SELEKCIJSKIH GOJIŠČIH	36
4 REZULTATI.....	37
4.1 NAČRTOVANJE ZAČETNIH NUKLEOTIDOV	37
4.2 AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA NAMNOŽENIH VKLJUČKOV	38
4.3 REZANJE VKLJUČKOV <i>sfPFKM</i> IN <i>nhPFKM</i> TER VEKTORJEV <i>p416GPD</i> IN <i>p426GPD</i>	38
4.4 TRANSFORMACIJA KVASOVKE <i>S. cerevisiae</i> SEV HD114-8D S KONSTRUKTI.....	40
4.5 ANALIZA TRANSFORMANT S PCR NA OSNOVI KOLONIJE.....	40
4.6 RAST TRANSFORMIRANIH KVASOVK NA GOJIŠČIH Z RAZLIČNIMI SLADKORJI	41
5 RAZPRAVA.....	43
6 SKLEPI	45
7 POVZETEK.....	46
8 VIRI	48
 ZAHVALA	
 PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Recept za pripravo gojišča Sc – ura GE	19
Preglednica 2:	Recept za pripravo gojišča Sc – ura s sladkorji (1 %)	19
Preglednica 3:	Recept za pripravo gojišča YEPGE	20
Preglednica 4:	Nukleotidna zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov	22
Preglednica 5:	Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka <i>sfPFKM</i> za ligacijo v plazmidni vektor p416GPD	22
Preglednica 6:	Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka <i>sfPFKM</i> za ligacijo v plazmidni vektor p426GPD	23
Preglednica 7:	Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka <i>nhPFKM</i> v plazmidni vektor p416GPD	23
Preglednica 8:	Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka <i>nhPFKM</i> v plazmidni vektor p426GPD	24
Preglednica 9:	Sestava restrikcijske mešanice pomnožka <i>sfPFKM</i> za ligacijo v plazmidni vektor p416GPD	25
Preglednica 10:	Sestava restrikcijske mešanice pomnožka <i>nhPFKM</i> za ligacijo v plazmidni vektor p416GPD	26
Preglednica 11:	Sestava restrikcijske mešanice za odpiranje plazmidnega vektorja p416GPD za ligacijo	26
Preglednica 12:	Sestava restrikcijske mešanice pomnožka <i>shPFKM</i> za ligacijo v plazmidni vektor p426GPD	26
Preglednica 13:	Sestava restrikcijske mešanice pomnožka <i>nhPFKM</i> za ligacijo v plazmidni vektor p426GPD	27
Preglednica 14:	Sestava restrikcijske mešanice za odpiranje plazmidnega vektorja p426GPD za ligacijo	27
Preglednica 15:	Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka <i>sfPFKM</i> v plazmidni vektor p416GPD	28

Preglednica 16: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka <i>nhPFKM</i> v plazmidni vektor p416GPD.....	28
Preglednica 17: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka <i>sfPFKM</i> v plazmidni vektor p426GPD.....	29
Preglednica 18: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka <i>nhPFKM</i> v plazmidni vektor p426GPD.....	29
Preglednica 19: Sestava reakcijske mešanice za PCR za potrditev vsebnosti plazmidnega vektorja p416GPD z vključkom <i>sfPFKM</i>	30
Preglednica 20: Sestava reakcijske mešanice za PCR za potrditev vsebnosti plazmidnega vektorja p426GPD z vključkom <i>sfPFKM</i>	31
Preglednica 21: Sestava reakcijske mešanice za PCR za potrditev vsebnosti plazmidnega vektorja p416GPD z vključkom <i>nhPFKM</i>	31
Preglednica 22: Sestava reakcijske mešanice za PCR za potrditev vsebnosti plazmidnega vektorja p426GPD z vključkom <i>nhPFKM</i>	32
Preglednica 23: Zaporedje notranjega smernega začetnega oligonukleotida za določitev nukleotidnega zaporedja nativnega <i>nhPFKM</i>	33
Preglednica 24: Sestava transformacijske mešanice	34
Preglednica 25: Sestava mešanice za PCR na osnovi kolonije	35
Preglednica 26: Uporabljeni začetni nukleotidi za pomnoževanje konstruktov	35
Preglednica 27: Nukleotidni zaporedji začetnih oligonukleotidov za pomnožitev <i>sfPFKM</i> in ligacijo v plazmidni vektor p416GPD	37
Preglednica 28: Nukleotidni zaporedji začetnih oligonukleotidov za pomnožitev <i>sfPFKM</i> in ligacijo v plazmidni vektor p426GPD	37
Preglednica 29: Nukleotidni zaporedji začetnih oligonukleotidov za pomnožitev <i>nhPFKM</i> in ligacijo v plazmidni vektor p416GPD	37
Preglednica 30: Nukleotidni zaporedji začetnih oligonukleotidov za pomnožitev <i>nhPFKM</i> in ligacijo v plazmidni vektor p426GPD	37
Preglednica 31: Število transformant <i>S. cerevisiae</i> s posameznimi konstrukti na gojitveni plošči Sc – ura GE.....	40

KAZALO SLIK

Slika 1:	Pripravljalna faza glikolize (Nelson in Cox, 2005).....	3
Slika 2:	Donosna faza glikolize (Nelson in Cox, 2005)	4
Slika 3:	Modelni prikaz evolucije encima PFK1 (Kemp in Gunasekera, 2002)	7
Slika 4:	Shematični prikaz metabolizma rakastih celic z ojačanim tokom glikolize (Legiša, 2004)	15
Slika 5:	Restriksijska mapa plazmida p416GPD (Addgene, 2004a).....	18
Slika 6:	Restriksijska mapa plazmida p426GPD (Addgene, 2004b)	18
Slika 7:	Agarozni gel; oznake: 1- nhPFKM po izvedenem PCR za ligacijo v p416GPD; 2- nhPFKM po PCR za ligacijo v p426GPD; 3- sfPFKM po PCR za ligacijo v p416 GPD; 4- sfPFKM po PCR za ligacijo v p426GPD	38
Slika 8:	Agarozni gel; p416GPD po rezanju z <i>Bam</i> HI in <i>Xba</i> I	39
Slika 9:	Agarozni gel; p426GPD po rezanju z <i>Bam</i> HI in <i>Xho</i> I	39
Slika 10:	Agarozni gel; sfPFKM in nhPFKM po rezanju z <i>Bam</i> HI in <i>Xba</i> I ter z <i>Bam</i> HI in <i>Xho</i> I.....	39
Slika 11:	Agarozni gel po izvedenem PCR na osnovi kolonije transformiranih kvasovk s konstrukti s sfPFKM	41
Slika 12:	Agarozni gel po izvedenem PCR na osnovi kolonije transformiranih kvasovk s konstrukti z nhPFKM	41
Slika 13:	Rast transformant <i>S. cerevisiae</i> sev HD114-8D s konstrukti na gojišču Sc – ura s sladkorji.....	42

KAZALO PRILOG

Priloga A1: Nukleotidno zaporedje nhPFKM v FASTA formatu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

amp	ampicilin
ATP	adenozin trifosfat (ang. adenosine triphosphate)
bp	bazni par
CCK	cikel citronske kisline
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
Glc	glukoza (ang. glucose)
GLUT1	glukozni transportni protein
kbp	kilo baznih parov
kDa	kilo Dalton
M	molarnost (mol/l)
MQ	filtrirana in deionizirana voda
NAD ⁺	oksidirana oblika nikotinamid adenindinukleotida
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenindinukleotida
nhPFKM	nativni humani encim fruktoza-6-fosfat-1-kinaza mišičnega tipa
nt	nukleotid
obr./min	obrati na minuto
OD	optična gostota (ang. optical density)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PFK1	fruktoza-6-fosfat-1-kinaza
PPP	pot pentoze fosfata (ang. pentose phosphate pathway)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species)
sfPFKM	kratek fragment encima fruktoza-6-fosfat-1-kinaze mišičnega tipa
TAE	pufer iz mešanice TRIS, očetne kisline in EDTA
TE	pufer iz mešanice TRIS in EDTA
TRIS	tris hidroksimetil aminometan
ura	uracil
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

Ena od temeljnih značilnosti rakastih celic je ta, da se hitro in nenadzorovano delijo. To jim omogoča njihov spremenjen metabolizem, saj glukozo porabljajo mnogo hitreje kot normalne celice. Večinski del glukoze (okrog 85 %) kljub razpoložljivemu kisiku rakaste celice pretvorijo v laktat, tega pa izločijo iz celic. Pojav se po odkritelju imenuje Warburgov efekt. Deregulirana glikoliza je najverjetneje posledica posttranslacijskih modifikacij glavnega regulatornega encima glikolize, fruktoza-6-fosfat-1-kinaze (PFK1). V normalnih celicah je encim inhibiran ob povečanih koncentracijah citrata in adenosin trifosfata (ATP). Ob posttranslacijski proteolitični cepitvi nativnega encima v rakastih celicah proteaze odcepijo velik del encima na C-terminalnem koncu in nastane visokoaktiven kratek fragment PFK1. Aktivno mesto, ki se nahaja na N-terminalnem delu, se ohrani, encim pa izkazuje spremenjeno kinetiko. ATP in citrat imata nanj zmanjšan inhibitorni učinek, nekateri aktivatorji, kot na primer fruktoza-2,6-bisfosfat (F-2,6-BP), pa povečajo njegovo aktivnost bolj kot pri nativnem encimu. Spremenjen visokoaktiven fragment omogoči neoviran pretok metabolitov skozi pot glikolize, kar privede do Warburgovega efekta. Istočasno dvig koncentracije intermediatov glikolize celicam omogoči hitrejšo rast in delitev (Šmerc in sod., 2011).

Tudi pri kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* kljub razpoložljivemu kisiku v mediju z visoko koncentracijo glukoze pride do represije respiracije, namesto nje poteka fermentacija in nastaja etanol (Crabtreejev efekt), podobno kot pri rakastih celicah v aerobnih pogojih nastaja laktat (Warburgov efekt) (Legiša, 2014).. Poleg te metabolne podobnosti smo za pripravo modelnega organizma za študij deregulirane glikolize pri raku izbrali kvasovko *S. cerevisiae*, saj je eden bolje preučenih evkariontskih modelnih organizmov, podrobno pa je pozan tudi njen primarni metabolizem in regulacija (Guaragnella in sod., 2014).

Rekombinanten visokoaktiven kratek fragment, značilen za rakaste celice, lahko pripravimo tudi z ekspresijo skrajšanega nativnega gena v gostiteljskih celicah, ki imajo izbite lastne gene za encim fruktoza-6-fosfat-1-kinazo, kot na primer *S. cerevisiae* sev HD114-8D.

1.1 CILJ RAZISKOVANJA

V kvasovko *S. cerevisiae* z izbitimi lastnimi geni za encim fruktoza-6-fosfat-1-kinazo smo vnesli nativni in skrajšani humani gen, ki kodirata nativni in visokoaktiven kratek fragment encima PFK1 mišičnega tipa, PFKM. Rast transformant smo nato testirali na gojiščih z

različnimi sladkorji. Cilj diplomskega dela je bil pripraviti transformante, ki bi lahko služile kot model za nadaljnje proučevanje deregulirane glikolize.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bomo z ustrezno izbiro plazmida in promotorja dosegli sintezo visokoaktivnega kratkega fragmenta PFKM. Pričakovali smo, da modificiran encim povzroči deregulacijo glikolize, podobno kot pri rakastih celicah. Posledično bi transformante z vnešenim modificiranim *PFKM* genom intenzivneje izrabljale glukozo iz gojišča in zato rasle bolje kot transformante z nativnim *PFKM* genom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK KOT BOLEZEN

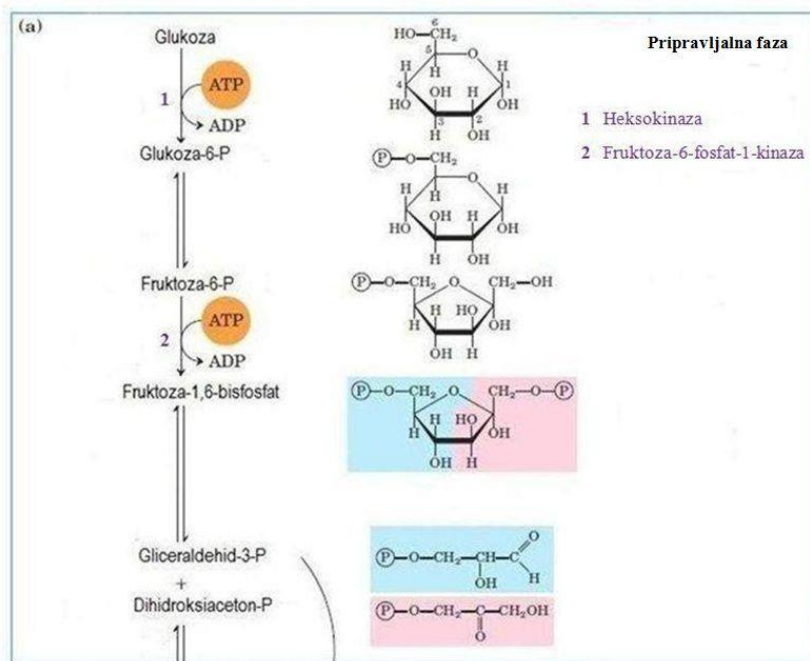
Človeško telo je grajeno iz različnih tipov celic, ki rasejo in se delijo le takrat, ko organizem to potrebuje. Življenjska doba večine celic je omejena, zato je celična delitev, s katero nastajajo nove celice, nujna za obnavljanje tkiv in za ohranitev zdravega organizma. Zaradi različnih vzrokov lahko pride do prekomerne delitve in kopičenja celic, kar vodi k nastanku tumorja. Rak je splošno ime za obsežno skupino bolezni, za katere je značilen nenadzorovan razrast spremenjenih, rakastih celic. Celice malignega (rakotvornega) tumorja se vraščajo v okolna tkiva in jih okvarjajo, lahko pa jih limfni in krvni obtok razneseta v oddaljene organe, kjer se tvorijo novi tumorji (zasevki ali metastaze). Čeprav se v sodobnem času incidenca raka veča (v Sloveniji letno za rakom zboli več kot 10.000 oseb), pa se smrtnost zaradi osveščanja ljudi, preventivnih testov in uspešnejšega zdravljenja manjša (Globocan, 2012).

Kljub kompleksnosti bolezni imajo rakaste celice nekatere skupne biološke značilnosti: vzdrževanje kronične proliferacije in zmožnost neomejenega podvojevanja, izogibanje supresorjem rasti in premagovanje celične smrti, induciranje angiogeneze (tvorjenja novih krvnih žil iz obstoječih) ter aktivacija invazije in metastaziranja (Hanahan in Weinberg, 2000). Z napredkom raziskav v zadnjem desetletju sta bili predlagani dve novi značilnosti, in sicer možnost izogibanja imunskemu sistemu ter, nenazadnje, spremenjen energijski metabolizem, ki hitro rast in delitev takšnih celic sploh omogoča (Hanahan in Weinberg, 2011).

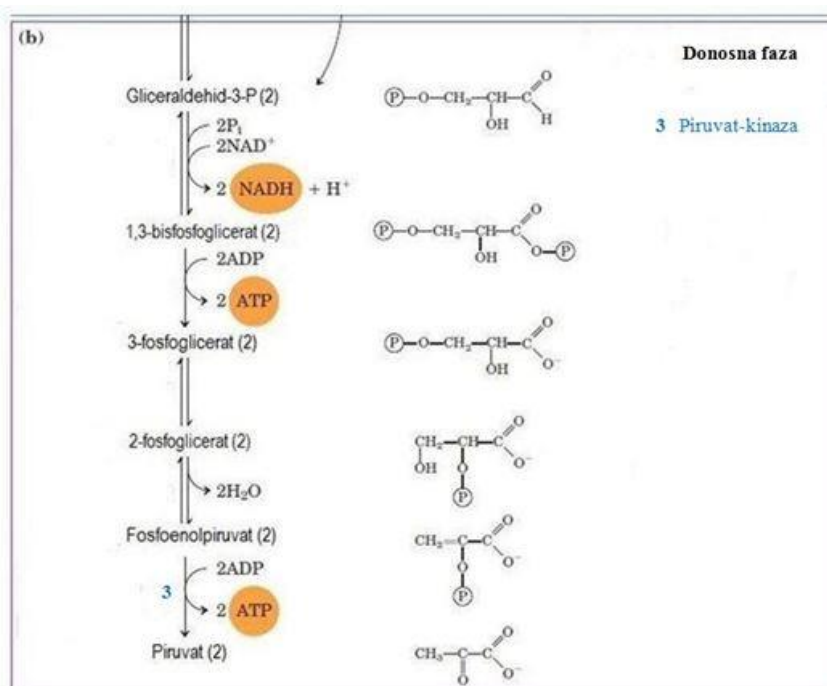
2.2 GLIKOLIZA

Med biokemijske reakcije, ki so nujno potrebne za preživetje organizma, prištevamo reakcije glikolize, cikla citronske kisline (CCK) in oksidativne fosforilacije ter jih pogosto imenujemo primarni metabolizem. Organizmu zagotavljajo energijo v obliki ATP, njihovi intermediati pa so vir prekursorskih molekul, ki omogočajo celično rast in delitev (Boyer, 2002).

Glikoliza je univerzalna metabolna pot razgradnje ogljikovih hidratov, ki preko niza encimsko kataliziranih reakcij vodi do nastanka piruvata. V desetih zaporednih korakih se iz ene molekule glukoze tvorita dve molekuli piruvata. V grobem lahko glikolizo razdelimo na dva dela; prvih pet reakcij predstavlja pripravljalna faza, drugih pet reakcij pa donosno fazo. V pripravljalni fazi se za fosforilacijo glukoze porabita dve molekuli ATP. Iz heksoze nato nastaneta triozi, dve molekuli gliceraldehid-3-fosfata (G-3-P). V donosni fazi se vsaka molekula G-3-P oksidira in fosforilira z anorganskim fosfatom. Energija se sprosti, ko se vsaka od dveh molekul 1,3-bifosfoglicerata pretvori v piruvat. Sproščena energija se shrani v obliki štirih molekul ATP, del energije pa se shrani tudi v obliki dveh molekul NADH. Pri večini organizmov poteka glikoliza na ta način, ki se po odkriteljih imenuje Embden-Mayerhof-Parnasova pot (EMP pot). Poteka v citosolu, neodvisno od prisotnosti kisika (Nelson in Cox, 2005). Pri nekaterih mikroorganizmih poteka glikoliza nekoliko drugače, po Entner-Doudoroffovi poti, ki je energijsko manj učinkovita (Madigan in Martinko, 2006).



Slika 1: Pripravljalna faza glikolize: aktivacija glukoze s fosforilacijo in nastanek gliceraldehid-3-fosfata; s števkami sta označena encima dveh od treh ireverzibilnih reakcij glikolize (Nelson in Cox, 2005)



Slika 2: Donosna faza glikolize; neto izkupiček glikolize sta dve molekuli ATP in dve molekuli NADH na eno molekulo glukoze, končni produkt donosne faze je piruvat; s številko je označen encim tretje ireverzibilne reakcije glikolize (Nelson in Cox, 2005)

Piruvat, ki nastane z glikolizo, se v anaerobnih pogojih lahko pretvori v laktat (mlečnokislinsko vrenje, ki poteka v določenih mikroorganizmih ter tkivih in kot je primer tudi pri rakastih celicah) ali pa v etanol in CO₂ (alkoholno vrenje, kot je primer pri *S. cerevisiae*). Pri aerobnih organizmih, kamor sodijo številne bakterije in večina evkariontov, pa poteče oksidacija piruvata do CO₂ in H₂O preko CCK in oksidativne fosforilacije. Aerobni organizmi pridobijo največ energije s celičnim dihanjem v mitohondrijih v procesu oksidativne fosforilacije, glikoliza pa predstavlja le del te poti (Nelson in Cox, 2005).

2.2.1 Alternativne poti razgradnje glukoze – pot pentoze fosfata

EMP pot je najbolj pogosta pot razgradnje glukoze v organizmih, obstajajo pa tudi alternativne poti. Ena od njih je pot pentoze fosfata (PPP), ki jo srečamo tako pri evkariontih kot pri prokariontih. V tej poti nastajajo reducirani nukleotidni koencimi NADPH, ki se vključujejo v različne biosintetske poti, saj predstavljajo redukcijsko moč za anabolne reakcije, in ribeza-5-fosfat, ki je potreben za sintezo nukleotidov. V hitro rastočih tkivih in tkivih s povečano biosintezo maščobnih kislin, holesterola ali steroidnih hormonov, gre v normalnih celicah več glukoza-6-fosfata (G-6-P) v PPP kot pa v glikolitično pot razgradnje (Nelson in Cox, 2005).

2.2.2 Uravnavanje glikolize

Glikoliza je natančno uravnavan proces, kar je izredno pomembno za ohranjanje ustrezne celične ravni ATP in intermediatov za različne biosintezne poti. Večina reakcij v EMP poti glikolize je reverzibilnih, nekaj pa je močno eksergonih in so zato pod celičnimi pogoji ireverzibilne. Potek glikolize je odvisen od uravnavanja teh reakcij. Gre za reakcije, ki jih katalizirajo encimi heksokinaza, fruktoza-6-fosfat-kinaza in piruvat-kinaza. Heksokinaza katalizira prvo reakcijo glikolize, fosforilacijo glukoze do G-6-P, pri čemer je ATP donor fosfata. Fosforilacijo fruktoze-6-fosfata (F-6-P) do fruktoze-1,6-bisfosfata (F-1,6-BP) katalizira fruktoza-6-fosfat-kinaza (PFK1), pri tem se porabi molekula ATP. To je prva ireverzibilna stopnja, ki je edinstvena za glikolizo, in s tem pomembna kontrolna točka njenega pretoka. G-6-P je namreč intermediat tudi drugih poti, denimo metabolizma glikogena in poti pentoze fosfata. Zadnjo, tretjo ireverzibilno reakcijo glikolize katalizira piruvat-kinaza. Gre za prenos fosfatne skupine iz fosfoenol piruvata (PEP) na ADP, pri čemer nastane ATP in piruvat. Najkompleksnejšo kontrolo glikolitičnega pretoka ima encim PFK1, ki nadvlada regulatorni vlogi ostalih dveh alosteričnih encimov (Šmerc in sod., 2011).

2.3 ENCIM FRUKTOZA-6-FOSFAT-1-KINAZA

2.3.1 Kinetika encima

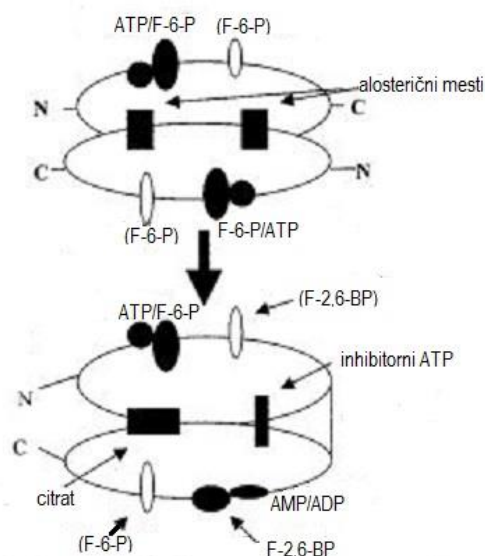
Stopnja glikolize, ki jo katalizira encim PFK1, je ireverzibilna pretvorba F-6-P v F-1,6-BP. Za pretvorbo sta potrebna energija in fosfatna skupina, ki se sprostita ob hidrolizi ATP. ATP ni le substrat za encim PFK1, temveč tudi alosterični inhibitor encima. Kadar namreč količina ATP presega potrebo v celici, presežek ATP z vezavo na alosterično mesto inhibira encim, kar povzroči znižanje afinitete encima za F-6-P. ADP in AMP, katerih koncentracija se poveča, kadar celica porablja več ATP, kot ga proizvaja, zmanjšata učinek inhibicije z ATP, kar znova zažene glikolizo. Citrat, intermediat cikla citronske kisline (CCK), je prav tako alosterični regulator PFK1; visoke koncentracije citrata povečajo inhibitorni učinek ATP. Ko se potreba celice po ATP zmanjša, se njegova koncentracija poveča; CCK se upočasni pri koraku z izocitrat dehidrogenazo (aktivirana z ADP) in α -ketoglutarat dehidrogenazo (inhibirana z ATP). Koncentracija citrata se poveča, preide v citosol in inhibira PFK1 ter s tem omeji nadaljnjo razgradnjo ogljikovih hidratov (Voet D. in Voet J.G., 2004). Najmočnejši regulator encima je F-2,6-BP. Ko se F-2,6-BP veže na alosterično mesto, močno poveča afiniteto encima za njegov substrat, F-6-P, in omili inhibitorni učinek ATP in citrata (Dunaway in sod., 1988).

Alosterična narava encima je verjetno posledica dveh kvartarnih oblik encima, aktivnejše R (ang. relaxed, sproščena oblika) in manj aktivne T (ang. tense, napeta oblika). Vezava ATP na alosterično mesto povzroči konformacijsko spremembo, katere posledica je rotacija položajev specifičnega argininskega ostanka in ostanka glutaminske kisline. Pozitiven naboj argininskega ostanka stabilizira negativen naboj fosfata F-6-P, kar olajša njeno vezavo, K_m pa je nizek. V nizkoafinitetnem stanju negativen naboj glutaminske kisline odbija F-6-P in K_m je zato višji (Banaszak in sod., 2011). Z natančnim alosteričnim uavnavanjem z različnimi aktivatorji oziroma inhibitorji je PFK1 ključni encim pri uravnavanju glikolize (Heinisch, 1993).

2.3.2 Evolucija encima

PFK1 je ključni regulatorni encim glikolize tako v prokariontskih kot v evkariontskih celicah (Heinisch, 1993). Ker je glikoliza centralna metabolna pot večine živečih organizmov, je PFK1 predmet več biokemijskih in genetskih raziskav. Raziskave s kristalografijo in poravnami aminokislinskih zaporedij so pokazale, da so se evkariontske PFK1 podenote najverjetneje razvile s podvojitvijo in tandemsko fuzijo genov prokariontskih prednikov, tekom evolucije pa so se z mutacijami v evkariontskih encimih razvila nova vezavna mesta za različne efektorje (Poorman in sod., 1984).

Zaradi ohranjenosti aminokislinskih ostankov aktivnega mesta v N-terminalnem delu evkariontskega in bakterijskega PFK1 encima Poorman in sod. (1984) predvidevajo, da je aktivno mesto evkariontskega PFK1 encima zgolj na njegovem N-terminalnem delu. Na tem delu je tudi katalitično mesto evkariontske PFK1 za vezavo F-6-P in ATP. Pri evkariontih so se tekom evolucije za natančnejšo uravnavo encimske aktivnosti razvila še alosterična mesta za vezavo aktivatorjev F-2,6-BP in AMP/ADP ter alosterični mesti za vezavo inhibitorjev, ATP in citrata. Ti dve vezavni mesti sta razporejeni na N- in C-končnih delih encima (Kemp in Gunasakera, 2002).



Slika 3: Modelni prikaz evolucije encima PFK1: zgoraj prokariontski dimer; spodaj evkariontski monomer, ki se je razvil s podvojitvijo in mutacijami genov prokariontskih prednikov; vezavna mesta ligandov v oklepajih so v ravnini za prikazano sliko (Kemp in Gunasekera, 2002)

2.3.3 Humani PFK1

Pri človeku je PFK1 tetramerni encim. V genomu sesalcev so trije različni zapisi za *PFK1* gene, in so različno izraženi v posameznih tkivih. Pri človeku so to encimi: PFKM (mišični tip, z molekulsko maso 85,051 Da) (Yamasaki in sod., 1991); PFKL (jetni tip, z molekulsko maso 84,917 Da) (Elson in sod., 1990); in PFKP (trombocitni tip, z molekulsko maso 85,596 Da) (Eto in sod., 1994). Izmed teh ima PFKM največjo afiniteto za F-6-P (Dunaway in sod, 1988). Vse tri človeške izoencime pa močno inhibira citrat. ATP v koncentraciji, večji od 0,05 mM, prav tako deluje inhibitorno, vendar lahko F-2,6-BP do neke mere omili efekt te inhibicije (Dunaway in sod, 1988). V rakastih celicah z izgubo funkcije tumorskega supresorja p53 naraste izražanje PFK1 encima, kar ima za posledico zmanjšano izražanje TIGAR (ang. TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator) proteina, ki deluje kot fruktoza-2,6-bisfosfataza. Koncentracija F-2,6-BP ostaja visoka in deluje kot močan aktivator PFK1. Ekspresija *PFK1* genov je v rakastih celicah povečana tudi zaradi povišane aktivnosti HIF-1 α in c-Myc transkripcijskih faktorjev, kar poveča sintezo večine glikolitičnih encimov (Huang, 2008).

2.3.4 Kratek visokoaktiven fragment PFK1

Pri evkariontskih organizmih je metabolni pretok skozi glikolizo močno reguliran preko inhibicije s povratno zvezo alosteričnih encimov, tako da samo povečana ekspresija le-teh

ni vzrok povečanega pretoka. To trditev so potrdili eksperimenti s *S. cerevisiae*, kjer povišana raven aktivnosti glikolitičnih encimov ni vplivala na stopnjo privzema glukoze in/ali na produkcijo etanola (Hauf in sod., 2000). Zato so znanstveniki predvidevali, da so v metabolne spremembe, ki se zgodijo s prehodom normalnih celic v rakaste, vključene pomembne modifikacije kinetike regulatornih encimov (Šmerc in sod., 2011).

Obliko skrajšanega Pfk1 encima s povečano aktivnostjo so najprej odkrili pri komercialno pomembni glivi *Aspergillus niger*. Kratek fragment encima je omogočal povišano proizvodnjo citrata. Citrat je intermediat CCK in njegova povišana koncentracija je posledica pospešenega glikolitičnega pretoka. Povečan pretok skozi glikolizo pa je mogoč zaradi spremenjenih kinetičnih lastnosti visokoaktivnega, 49 kDa velikega fragmenta, ki je izkazoval zmanjšano inhibicijo s citratom. Raziskave so potrdile, da fragment nastane z dvostopenjsko posttranslacijsko modifikacijo nativnega, 85 kDa encima (Mlakar in Legiša, 2006). Študije posttranslacijske modifikacije Pfk1 pri *A. niger* so pokazale, da nativni encim najprej cepijo serinske proteaze v krajši, sprva neaktiven protein, ki postane aktiven ob fosforilaciji specifičnega treoninskega ostanka v aktivnem centru encima (Capuder in sod., 2009). Proteze odcepijo del C-terminalnega konca, kjer se nahajajo vezavna mesta za citrat, zato ta ne more učinkovito inhibirati encima. Legiša in sod. (2010) so pripravili mutirani skrajšani gen *mt-pfkA*, kjer dvostopenjska posttranslacijska modifikacija ni potrebna, in je zaradi komercialne uporabnosti tudi patentno zaščiten, saj mikroorganizmi z vstavljenim *mt-pfkA* genom hitreje sintetizirajo želen biotehnološki produkt (Legiša in sod., 2010).

Nadaljnje raziskave so pokazale, da se podobne posttranslacijske modifikacije nativnega PFK1 encima mišičnega tipa verjetno zgodijo tudi v sesalskih rakastih celicah. Formacija aktivnega kratkega humanega fragmenta PFKM s spremenjenimi kinetičnimi parametri bi lahko pojasnila dereguliran glikolitičnih tok v rakastih celicah (Šmerc in sod., 2011).

2.3.4.1 Priprava kratkega sesalskega fragmenta PFKM *in vitro*

S poravnavo zaporedij aminokislinskih ostankov humanih izoencimov PFKM, PFKL in PFKP ter aminokislinskih ostankov encima *A. niger*, so negativni aminokislinski ostanek na mestu, ki sovpada s treoninskim ostankom v proteinu *A. niger*, našli zgolj v zaporedju za PFKM (Šmerc in sod., 2011). Pri drugih dveh je bil na tem mestu nepolarni alaninski ostanek. Prisotnost kratkih, približno 47 kDa velikih fragmentov PFKM so zaznali z analizo prenosa western tudi v homogenatih različnih trajnih celičnih linij rakavih celic (HeLa, B16-F10 in TF-1). Te celične linije po vnosu v testne živali povzročijo nastanek tumorskih metastaz. V nastalem tumorju po vnosu B16-F10 celic v miši genetske linije C57BL/6 so zaznali 45 kDa velike PFKM fragmente. Zato je postal PFKM najprimernejši kandidat za nastanek aktivnih kratkih PFK1 fragmentov *in vitro*. Da bi to preverili, so

izolirali PFK1 iz zajčje mišice. Očiščen encim so inkubirali z različnimi komercialno dostopnimi proteazami. Nato so testirali prisotnost aktivnih kratkih PFK1 fragmentov, ki bi izkazovali odpornost na inhibicijo s citratom, v pufru, ki je vseboval 5 mM citrat. Po razrezu nativnega Pfk1 encima s proteinazami K so z SDS-PAGE elektroforezo potrdili prisotnost krajših, približno 45 kDa velikih aktivnih fragmentov. Eksperiment je pokazal, da se lahko z enostopnejsko posttranslacijsko modifikacijo sesalskega PFK1 doseže nastanek visokoaktivnih kratkih PFK1 fragmentov (Šmerc in sod., 2011).

2.3.4.2 Visokoaktiven kratek fragment humanega PFKM (Fragment 9)

Učinkovitost aktivnih humanih skrajšanih PFKM fragmentov so testirali v sevu *E. coli* sev RL257, ki nima lastnih Pfk1 proteinov (Šmerc in sod., 2011). Pripravili so serijo skrajšanih genov humane mišične Pfk1 cDNA, ki so jih po namnožitvi vnesli v *E. coli* sev RL257. Takšni fragmenti naj bi teoretično nastali po proteolitični cepitvi nativnega humanega PFKM. Za opazovanje spremenjenih karakteristik rasti so transformante nanesti na gojišče z glukozo. Ene od transformant, ki so rasle na minimalnem gojišču z glukozo, so sintetizirale 47.835 Da velik fragment s 443 aminokislinskimi ostanki, in so ga poimenovali Fragment 9. Celice so se v približno 24 urah namnožile do optične gostote 2, kar nakazuje, da so bili rekombinantni proteini aktivni in so se uspešno vključili v bakterijski metabolizem (Šmerc in sod., 2011).

2.3.4.3 Kinetika Fragmenta 9

Šmerc in sod. (2011) so primerjali kinetiko kratkega Fragmenta 9 in nativnega encima PFKM, izoliranega iz seva *E. coli* RL257. Aktivnost rekombinantnega nativnega humanega encima je ob naraščajoči koncentraciji ATP dosegla vrh pri 0,6 mM, nato pa je sledil strm padec aktivnosti, in le malo aktivnost so zaznali pri 1 mM ATP. V nasprotju z nativnim encimom je kratek fragment ob nižjih koncentracijah izkazoval večjo afiniteto do ATP, vendar pa pri koncentracijah, višjih od 0,2 mM, inhibicija z ATP ni bila zaznana. Za razliko od nativnega encima 5 mM laktat ali citrat nista inhibirala aktivnosti kratkega fragmenta. Zmanjšano inhibicijo z ATP ali citratom so ugotovili pri 0,5 mM F-6-P, kar je blizu fiziološki koncentraciji (Šmerc in sod., 2011).

Dodatek aktivatorja F-2,6-BP je močno zvišal afiniteto do substrata (F-6-P) tako pri nativnem encimu kot pri kratkem fragmentu, kar se kaže v strmem vzponu satutracijske krivulje Michaelis Mentenovega grafa z naraščujočo koncentracijo substrata. Poleg tega je, za razliko od nativnega encima, dodatek 4 μ M F-2,6-BP znatno povečal $v_{\max}$ kratkega fragmenta (Šmerc in sod., 2011).

Ekspresija kratkega fragmenta v netumorigenih HEK 293 celicah je pospešila celično rast, porabo glukoze in produkcijo laktata. Glede na spremenjene kinetične lastnosti bi kratek fragment PFKM encima lahko imel velik vpliv pri ojačanju glikolitičnega toka rakastih celic (Šmerc in sod., 2011).

2.4 KVASOVKE KOT MODELNI ORGANIZEM

Kvasovke *S. cerevisiae* so eden najbolj raziskanih organizmov in so pogosto uporabljene kot modelni organizem za proučevanje primarnega metabolizma in drugih bioloških sistemov, vključno z rakom (Guaragnella in sod., 2014). Uvrščamo jih v deblo Ascomycota in so fakultativno anaerobni enocelični organizmi, ki spadajo med najenostavnejše evkarionte. Genom teh kvasovk je bil prvi evkariontski sekvenciran genom, javno objavljen leta 1996 (Goffeau, 1996). Dobro poznavanje njenih molekularnih in biokemijskih lastnosti ter razvoj rekombinantne tehnologije DNA je omogočil tudi razvoj različnih klasičnih in rekombinantnih genskih tehnik. Kot enostaven evkariontski organizem združuje primerne bolj tipično prokariotske (hitra rast, sposobnost rasti na enostavnih gojiščih ter enostavna genska manipulacija) in evkariontske lastnosti (znotrajcelična struktura kot pri višjih evkariontih, zmožnost posttranslacijskih modifikacij - zvijanje proteinov, tvorba disulfidnih vezi in glikozilacije), zaradi česar spada med pogosto uporabljane ekspresijske sisteme (Romanos in sod., 1992). Uspevajo v aerobnih in anaerobnih pogojih in imajo približno dve uri kratek generacijski čas (Lord in Wheals, 1981). Prednost *S. cerevisiae* je tudi v tem, da ima zaradi dolgoletne uporabe v živilske namene po uvrstitvi FDA (ang. Food and Drug Administration) status GRAS (ang. Generally Recognized as Safe) organizma. Zaradi netoksičnosti so pomembno orodje za proučevanje in ekspresijo različnih proteinov v industrijske in medicinske namene (Romanos in sod., 1992).

Kvasovko *S. cerevisiae* smo v tej študiji, poleg naštetih lastnosti, kot modelni organizem izbrali zaradi določenih podobnosti v metabolizmu humanih rakastih celic (Warburgov efekt) in kvasnih celic (Crabtreejev efekt) (Legiša, 2014). Z vnosom skrajšanega nativnega PFKM gena v kvasovko *S. cerevisiae*, ki ima izbite lastne gene za encim fruktoza-6-fosfat-1-kinazo, smo želeli doseči izražanje visokoaktivnega kratkega fragmenta mišičnega tipa in preveriti njegov vpliv na fiziologijo in metabolizem celic. Ob zaznanem pospešenem metabolizmu in boljši rasti v primerjavi z izhodnim sevom bi takšne transformante lahko služile za nadaljni študij deregulirane glikolize.

2.5 PRIMERJAVA METABOLIZMA OGLJIKOVIH HIDRATOV RAKASTIH CELIC IN KVASOVK *S. cerevisiae*

Primarni metabolizem je močno ohranjen med vsemi živečimi organizmi, tekom evolucije pa so se razvile številne različice, ki so značilne za posamezne organizme ali celične tipe (Legiša, 2014). Genom haploidnih *S. cerevisiae* celic vsebuje približno 12 milijonov baznih parov in 6.275 genov (Goffeau in sod., 1996), medtem ko genom haploidnih človeških celic vsebuje 3 milijarde baznih parov ter približno 21.000 protein-kodirajočih genov; to prispeva h kompleksnejši fiziologiji človeškega organizma, metabolno pa sta si ta dva tipa celic v marsičem podobna. V splošnem človeške tumorske in kvasne celice ob specifičnih pogojih izkazujejo pospešen metabolni pretok v aerobnih razmerah; večji del ATP pridobivajo s fosforilacijo na nivoju substrata, NADH/NAD⁺ razmerje se ohranja z disimilativno produkcijo laktata ali etanola, razmerje NADPH/NADH pa se vzdržuje prek glutaminolize ali s formacijo acetata (Legiša, 2014).

Najbolj opazna podobnost je torej proces tvorbe laktata pri humanih rakastih celicah in etanola pri kvasovkah. Oba metabolita izvirata iz glikolitskega piruvata in se izločata iz celic. Laktat nastaja neposredno po redukciji piruvata, etanol pa z eno samo vmesno stopnjo, odcepom CO₂ in redukcijo acetaldehida do etanola. Kvasne celice izločajo iz celic etanol in ogljikov dioksid v anaerobnih pogojih. Ob prisotnosti kisika pride do inhibicije alkoholne fermentacije. Pojav se imenuje Pasteurjev efekt in se pri *S. cerevisiae* pojavi le pri počasi rastočih celicah, ko je pretok metabolitov skozi glikolizo nizek. Ko je prisotna visoka koncentracija glukoze, pride tudi v aerobnih razmerah do alkoholne fermentacije zaradi represije respiracije, čemur pravimo Crabtreejev efekt (Diaz-Ruiz, 2008). Pri Crabtree pozitivnih organizmih, kamor sodi *S. cerevisiae*, pride zaradi visoke koncentracije glukoze v okolju do znižanja ravni izražanja večih genov, vključenih v respiracijo, kot tudi genov, vključenih v glukoneogenezo in v privzem in metabolizem alternativnih ogljikovih hidratov (Verstrepen in sod., 2004). Tudi rakaste celice večino glukoze fermentirajo, ne glede na dejstvo, da je kisik na voljo. ATP tvorijo v aerobni glikolizi in ob tem tvorijo laktat, ki ga izločijo iz celice (Warburgov efekt). V tkivih, kjer dostopnost hranil ni limitirajoč dejavnik rasti, celicam aerobna glikoliza omogoča dovolj energije za celično proliferacijo (Vander Heiden in sod., 2009).

2.5.1 Zunanji dejavniki, ki vplivajo na rast

Za boljše razumevanje metabolizma rakastih celic in kvasovk je najprej potrebno upoštevati okoljske dejavnike, ki določajo rast celic. Tumorji nastanejo in se delijo v večceličnih organizmih, kjer so celice navadno preskrbljene s stalnim dotokom hranil. Rast in delitev normalnih človeških celic je pod strogim nadzorom specifičnih rastnih faktorjev, ki ohranjajo pravilno obliko in funkcijo posameznih tkiv. Ena od bistvenih značilnosti rakastih celic je ta, da vzdržujejo proliferacijo neodvisno od rastnih signalov, s čimer jim je

omogočena neomejena delitev celic (Hanahan in Weinberg, 2011). Po drugi strani so kvasovke enocelični organizmi, ki so izpostavljeni nihanjem v dostopnosti hranil. Njihov metabolni sistem se mora glede na razpoložljivost hranil hitro prilagajati tem spremembam. Ko je na voljo dovolj hranil, kvasovke pospešeno sintetizirajo celične gradnike, da si zagotovijo čim hitrejšo reprodukcijo, medtem ko se ob pomanjkanju nutrientov njihov metabolizem upočasni. Celica *S. cerevisiae* se lahko podvoji v času 1-2 ur (Lord in Wheals, 1981), vendar je dejanski podvojitveni čas odvisen od razpoložljivosti hranil. Človeške celice rastejo bistveno počasneje. Pri hitro rastočih tumorjih, kot na primer tumor na modih ali možganih, se podvojitveni čas meri v dneh, medtem ko se pri počasi rastočih tumorjih, na primer pri raku na prostati in črevesju, pogosto meri v mesecih ali celo letih (Friberg in Mattson, 1997). Bolezen raka sproži akumulacija mutacij med procesom tumorigeneze. Odkritih je bilo približno 140 genov, ki lahko spodbudijo tumorigenezo, kadar so podvrženi mutacijam. Tipičen tumor vsebuje 2-8 takšnih mutacij, ki predstavljajo selekcijsko prednost rakastih celic (Vogelstein in sod., 2013).

Ključna signalna pot, ki vpliva na metabolizem rakastih celic, je PI3K/Akt/mTOR pot. Vezava rastnega faktorja na celični receptor povzroči aktivacijo PI3K (fosfatidilinozitol-3-kinaza), kar vodi k fosforilaciji fosfatidilinozitol lipidov plazemske membrane. To privede do aktivacije kinaz Akt (serin/treonin-protein-kinaza) in mTOR (tarča za rapamicin pri sesalcih, ang. mammalian target of rapamycin). Normalne celice uporabljajo to pot kot odgovor na rastne faktorje, ob mutacijah specifičnih onkogenov pa postane v rakastih celicah konstitutivno aktivna. Omogoča hitro proliferacijo, neodvisno od signaliziranja rastnih faktorjev (DeBerardinis in sod., 2008), saj poveča mnoge metabolne aktivnosti, ki služijo celični biosintezi. Vsak posamezen tumor ima različne genetske spremembe (Vogelstein in sod., 2013), zato se predvideva, da lahko mutacije različnih komponent PI3K/Akt/mTOR povzročijo stalno izražanje te poti. Aktivna PI3K/Akt/mTOR pot vpliva na biosintezo rakastih celic na tri različne načine. Pri prvem spodbudi celice k povečani ekspresiji transporterjev hranil v membrani, s čimer je dosežen hitrejši vnos glukoze, aminokislin in drugih hranil v celico (Roos in sod., 2007). Akt kinaze povečajo aktivnost c-Myc in HIF-1 α transkripcijskih faktorjev, kar poveča sintezo večine glikolitskih encimov (Yeung in sod., 2008; Elstrom in sod., 2004). In kot tretje, aktivirana pot poveča mnoge metabolne aktivnosti, ki služijo biosintezi celičnih gradnikov. PI3K in Akt stimulirata sintezo lipidov, mTOR pa je regulator translacije proteinov (Gingras in sod., 2001). V normalnih celicah je aktivacija poti regulirana z defosforilacijo fosfatidilinozitola s fosfatazo PTEN (homolog fosfataze in tenzina, ang. phosphatase and tensin homolog). V rakastih celicah pa je pot aktivirana z raznovrstnimi mehanizmi, ki skupaj predstavljajo prevladujoč razred mutacij v tumorskih celicah. Te mutacije povzročajo na primer aktivacijo PI3K, zmanjšajo vpliv negativnih regulatorjev (PTEN), ali na druge načine dosežejo stimulacijo sistema (Elstrom in sod., 2004). Šmerc in sod. predvidevajo, da je PI3K/Akt/mTOR pot odgovorna tudi za aktivacijo specifičnega proteolitičnega encima, ki cepi nativni PFK1 encim v krajše visokoaktivne fragmente (Šmerc in sod., 2011).

Za vplivanje na primarni metabolizem kvasnih celic niso potrebne mutacije ali rastni faktorji, že manjše spremembe v dostopnosti hranil imajo lahko pomembne posledice. Največji vpliv lahko opazimo ob dodatku glukoze stradajočim celicam v dobro prezračenem sistemu. Pristnost večje koncentracije glukoze zavre respiracijo, celice začnejo izločati etanol. Glukoza vpliva na specifične tarče Ras/cAMP/PKA signalne poti (Thevelein in de Winde, 1999) in s tem sproži aktivacijo celične rasti z ekspresijo transporterjev za glukozo in genov glikolize (DeRisi, 1997). Pri *S. cerevisiae* glukoza preko kinazne kaskade povzroči represijo genov, vključenih v razgradnjo alternativnih ogljikovih virov in genov, vključenih v glukoneogenezo. Glukozne signalne poti so inducirane, kadar koncentracija glukoze presega 20-40 mM, s čimer glukoza vpliva podobno kot rastni faktorji v sesalskih celicah (Verstrepen in sod., 2004).

2.5.2 Primarni metabolizem

Tako za rakaste kot za kvasne celice je glukoza preferenčni vir ogljika in energije. Glukoza vstopa v celice preko transmembranski prenašalcev, ki se izražajo v specifičnih pogojih. Narava in funkcija teh prenašalcev pogosto odloča o celokupnem celičnem metabolizmu, saj je prvi in velikokrat limitirajoči korak v metabolizmu glukoze njen prenos preko plazemske membrane (Legiša, 2014).

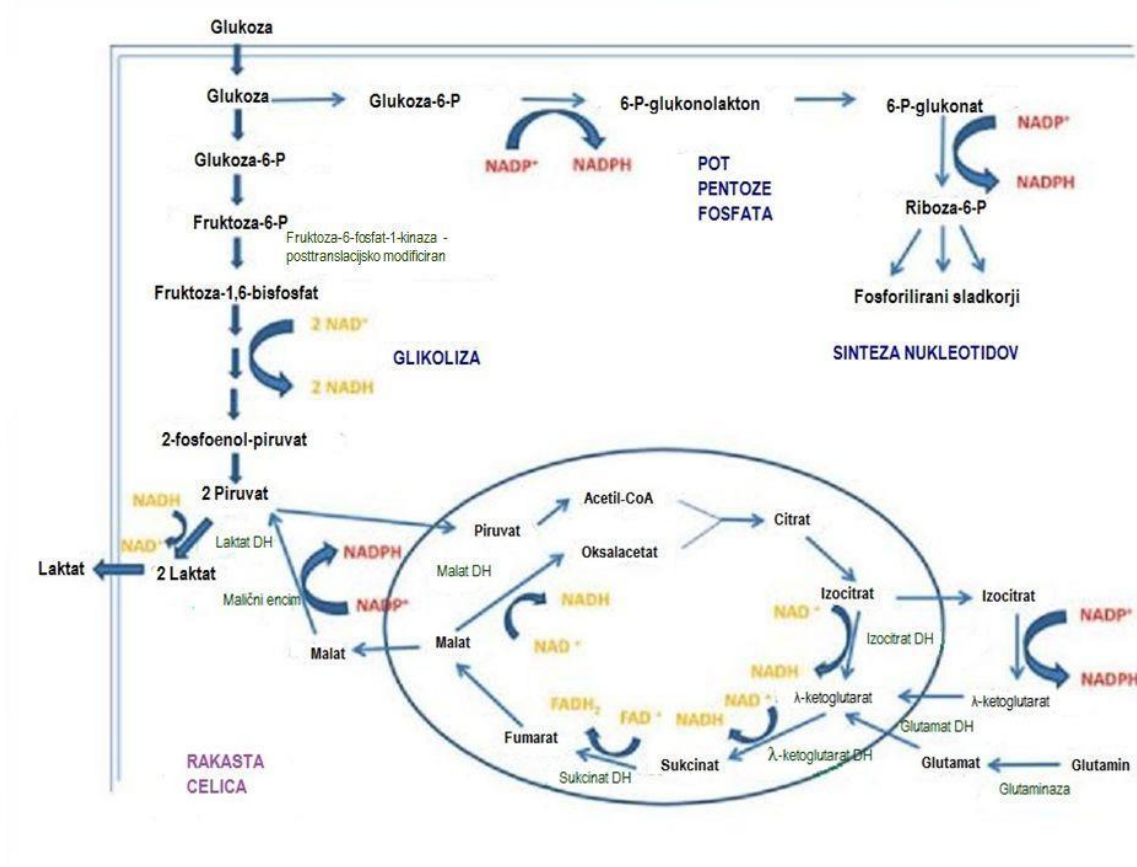
2.5.2.1 Prenašalci sladkorjev

Pri več različnih tumorjih so znanstveniki opazili povečano ekspresijo transporterja za glukozo GLUT1, in Younes in sod. (1996) navajajo, da je to najverjetneje nujen korak za napredovanje tumorja. GLUT1 olajša prehod glukoze skozi plazemsko membrano sesalskih celic. Povečana ekspresija, v kateri ima pomembno vlogo protein HIF-1 λ (hypoxia inducible factor), omogoča hitro rastočim celicam pridobivanje energije z glikolizo (Keith in Simon, 2007).

S. cerevisiae ima 20 genov, ki kodirajo proteine, podobne glukoznim transporterjem (hexose transporters, HXT). HXT proteini spadajo v MFS superdružino transporterjev (Pao in sod., 1998). Skozi MFS transporterje poteka prenos glukoze z olajšano difuzijo. Opisana sta dva sistema privzema glukoze v *S. cerevisiae*. Prvi je sistem z nizko afiniteto (visok K_m , 15-20 mM), drugi sistem, z visoko afiniteto (nizek K_m , 1-2 mM), pa inhibira povišana koncentracija glukoze. Prisotnost HXT z različnimi afinitetami ne preseneča, saj lahko kvasovke rastejo v širokem območju koncentracije glukoze (od nekaj μ M do 2 M) (Ozcan in Johnston, 1999). Iz navedenega lahko sklepamo, da transport glukoze pri rakastih celicah in pri kvasovkah ne predstavlja ovire za izdatno napajanje glikolitičnega toka (Legiša, 2014).

2.5.2.2 Vzdrževanje NADH/NADPH razmerja

Povečan glikolitični tok ustvarja povišan nivo ATP v citoplazmi in zmanjšuje citoplazemsko razmerje NAD^+/NADH . NAD^+ se regenerira iz NADH ob pretvorbi nastalega glikolitskega piruvata v laktat z laktat dehidrogenazo A (LDH-A), laktat pa se izloči iz celice. Nekaj glikolitskega piruvata pa se s piruvat dehidrogenazo pretvori v acetil-CoA in vstopi v cikel citronske kisline v mitohondriju. Tu se pretvori v intermediate, kot je citrat, ki se lahko uporabijo za sintezo makromolekul, na primer maščobnih kislin in holesterola za sintezo lipidnih membran hčerinski celic. Citrat se prenese v citoplazmo, kjer ga encim ATP citrat liaza cepi, ob čemer nastane acetil-CoA in oksalacetat. Acetil-CoA se s pomočjo sintaze maščobnih kislin (ang. fatty acid synthase, FAS) porablja za nastanek lipidov, oksalacetat pa se z malat dehidrogenazo pretvori v malat. Malat se lahko vrne v mitohondrij s citrat-malat antiportom, ali pa ga malični encim pretvori v piruvat, ob čemer se tvori NADPH, ki se lahko porablja pri sintezi maščobnih kislin in v drugih biosintetskih poteh (DeBerardinis in sod., 2008). NAD^+ specifičen malični encim tako bistveno pripomore k uravnoteženju NADH/NADPH razmerja v rakastih celicah. Pomembno vlogo pri vzdrževanju razmerja ima tudi encim transhidrogenaza, ki generira NADPH iz NADH ob povišanem glikolitičnem pretoku. Poraba citrata za sintezo lipidov privede do pomanjkanja oksalacetata, ki se mora obnoviti, da lahko cikel citronske kisline teče nemoteno (anapleroz). To se zagotavlja na različne načine, najenostavnejši je s piruvat karboksilazo, ki proizvede oksalacetat direktno iz piruvata. Alternativni vir je metabolizem aminokislin, posebno glutamina, najbolj zastopane aminokisline v sesalskem krvnem serumu (DeBerardinis in sod., 2007). Proliferativne rakaste celice ga uporabljajo za nastanek α -ketoglutarata, ki se v CCK lahko porabi za sintezo oksalacetata. Lahko pa poteče pretvorba glutamina do malata, ki se z maličnim encimom v citosolu pretvori v piruvat, ob tem pa se generira NADPH (Vander Heiden in sod., 2009).



Slika 4: Shematični prikaz metabolizma rakastih celic z ojačanim tokom glikolize; NADH/NADPH razmerje se le delno ohranja preko poti pentoze fosfata; glutaminoliza omogoča dodatno formacijo NADPH z aktivnostjo maličnega encima, NADH se reoksidira tudi ob produkciji laktata (Legiša, 2014)

Pri kvasovkah, ki nimajo ne maličnega encima ne transhidrogenaze, ima za vzdrževanje razmerja NADPH/NADH pomembno vlogo acetat. Med hitro rastjo celic nastaja poleg etanola ob reoksidaciji NADH tudi acetat, ob tem pa tudi NADH ali NADPH z acetaldehid dehidrogenazo. Zato nastanek acetata z od NADH-odvisno mitohondrijsko izoobliko acetaldehid dehidrogenaze ALD4 lahko kaže na limitacijo v drugih NADH-produkcijskih poteh, kot na primer preko CCK. Nastanek acetata s citosolnim od NADPH-odvisnim izoencimom ALD6 pa nakazuje nezadostno produkcijo NADPH v pentoza fosfatni poti (Ferreira in sod., 2004).

2.5.2.3 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Kadar nivo metabolitov CCK preseže kapaciteto elektronske transportne verige za asimilacijo elektronov, se poveča nastanek reaktivnih kisikov zvrsti (ang. reactive oxygen species, ROS), kot so vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni anion (O_2^-) in hidroksilni radikal ($\bullet OH$) (Wellen in Thompson, 2010). Povišano razmerje NADH/NAD⁺ torej vodi k

povečani produkciji ROS. Prosti radikali sprožijo verižne radikalske reakcije, ki lahko poškodujejo makromolekule in s tem vplivajo na njihovo funkcijo; kljub obrambnim sistemom celic (encimi superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaza, različni proteolitični in lipolitični encimi ter popravljalni sistemi DNA) lahko prevelika produkcija ROS sčasoma vodi v celično smrt (Gutteridge, 1993). V rakastih celicah se nastanek ROS poveča z metabolnim stresom, povišan nivo ROS pa nadalje pospešuje tumorigenezo s povečanjem števila DNA mutacij (Wellen in Thompson, 2010).

Pri kvasovkah lahko povečan dostop hranil privede do prekomernega nastanka ROS, kar lahko povzroči apoptozo celic (Madeo in sod., 1999). Predvideva se, da predvsem dva mehanizma uspešno preprečujeta formacijo ROS Crabtree pozitivnih kvasovk: prvič, usmerjanje metabolizma piruvata v produkcijo etanola, in drugič, inhibicija respiratornega kompleksa III s povišanim nivojem fruktoze bisfosfata (značilnim za hitro rastoče celice), kar sili celice k reoksidaciji mitohondrijske NADH na nivoju etanol dehidrogenaze (Diaz-Ruiz, 2008).

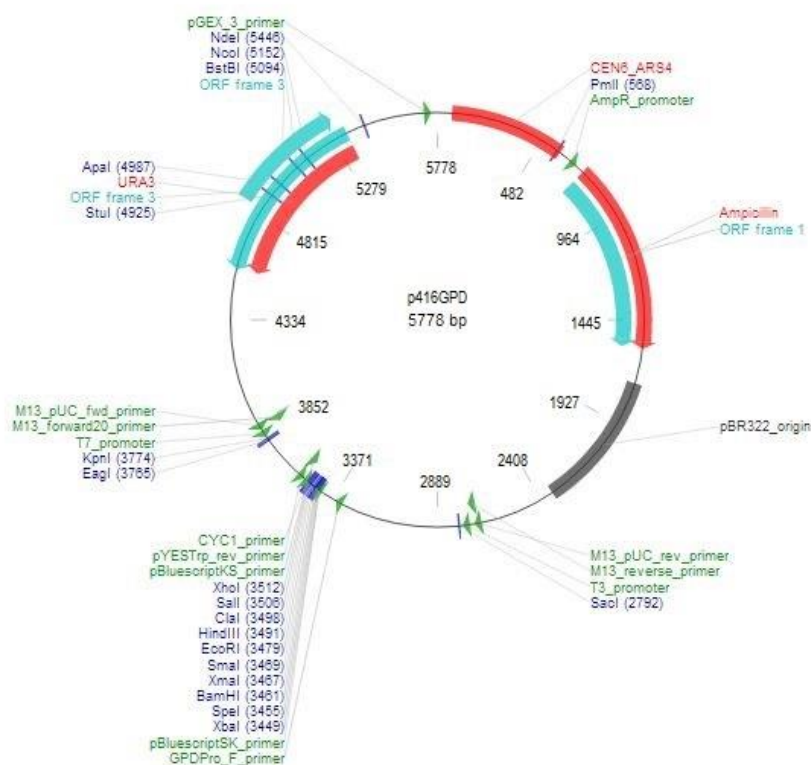
3 MATERIAL IN METODE

3.1 SEV KVASOVKE *S. cerevisiae* HD114-8D

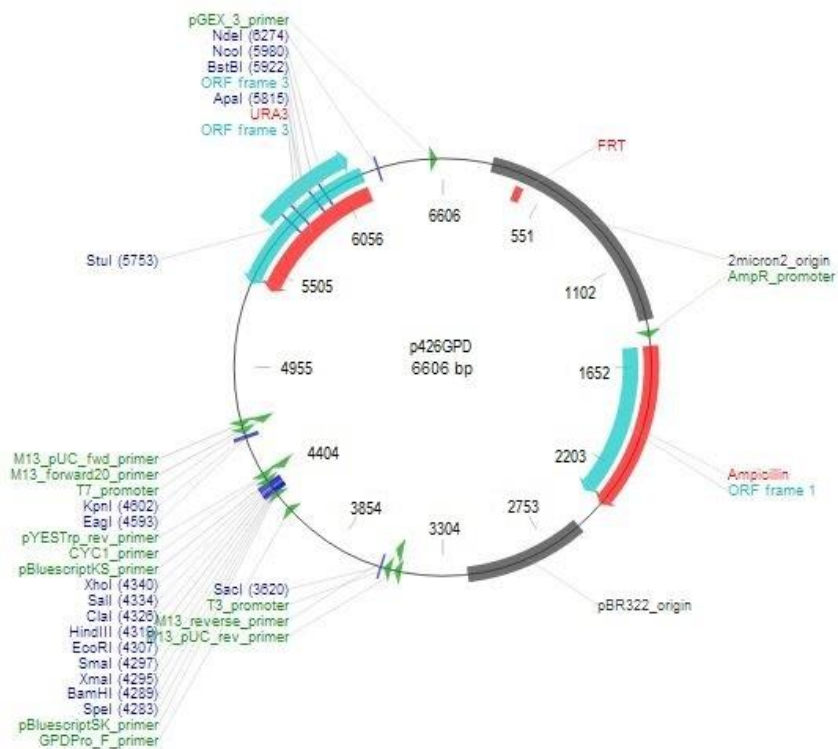
Za test rasti na gojišču z glukozo kot edinim virom ogljika (Sc - ura Glc) ter drugimi sladkorji in za analizo izražanja nativnega ter skrajšanega gena *PFKM* smo uporabili kvasovko *S. cerevisiae* sev HD114-8D. Ta sev izvira iz seva HD56-5A, ki je uracilni avkosotrof in ima vse gene za nativni encim fruktoza-6-fosfat-1-kinazo (Raben in sod., 1995). Gostiteljski sev HD114-8D ima genotip *MATa pfk1::HIS3 pfk2::HIS3 ura3-52 leu2-3, his3-11,15* (Estevez in sod., 1995) in ima izbita gena za obe podenoti encima fruktoza-6-fosfat-1-kinaza, zato ne raste na gojišču z glukozo kot edinim virom ogljika, lahko pa raste na gojišču, ki vsebuje glicerol in etanol. Mutacije *ura3-52*, *leu2-3* in *his3-11,15* predstavljajo avkostrofnost na uracil, levcin in histidin. Kvasovko smo transformirali s konstrukti na osnovi plazmidov p416GPD in p426GPD, ki vsebujeta gen za komplementacijo uracilne avkostrofije, zato po uspešni transformaciji sev lahko raste na gojišču brez uracila (Mumberg in sod., 1995).

3.2 PLAZMIDNA VEKTORJA p416GPD in p426GPD

Za izražanje kratkega in nativnega fragmenta *PFKM* smo izbrali ekspresijska vektorja p416GPD in p426GPD. Vektor p416GPD je centromerni CEN/ARS plazmid, ki se v celici navadno nahaja v majhnem številu kopij. Vektor p426GPD pa je 2 μ plazmid, ki se v celici nahaja v večjem številu (Christianson in sod., 1992). Oba vektorja vsebujeta močan konstitutivni promotor gena *GPD1* (pridobljen iz gena, ki kodira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo), markerski gen *URA3* (kodira encim za sintezo uracila), zapis za ampicilinsko rezistenco in terminator transkripcije gena *CYC1* (Mumberg in sod., 1995). Restriksijske mape so prikazane na Slikah 5 in 6.



Slika 5: Restriksijska mapa plazmida p416GPD (Addgene, 2004a)



Slika 6: Restriksijska mapa plazmida p426GPD (Addgene, 2004b)

3.3. VKLJUČKA nhPFKM IN sfPFKM

V plazmidna vektorja p416GPD in p426GPD smo vstavili nativni humani gen nhPFKM za encim PFK1 mišičnega tipa ter modificiran gen za kratek fragment PFK1. Oba sta bila prvotno vstavljena v plazmid pAlter-Ex1, za izražanje v *E.coli* sev RL257 z izbitimi geni za lastne Pfk1 encime (Šmerc in sod., 2011). PFK1 humanega PFK1 mišičnega tipa so Šmerc in sod. pomnožili s PCR in hkrati uvedli restrikcijska mesta, ki so omogočila vključitev v plazmid pAlter-Ex1. Prav tako so pripravili tudi skrajšano različico nativnega gena, ki nosi zapis za Fragment 9. Kinetične lastnosti omenjenega fragmenta so podrobneje opisane v točki 2.3.4.3. Ker smo se odločili za vnos nativnega in skrajšanega gena v druga vektorja (z močnim konstitutivnim promotorjem) za vnos v kvasovko *S. cerevisiae*, smo ob pomnoževanju vključkov uvedli tudi nova restrikcijska mesta za vključitev v plazmid p416GPD oz. p426GPD ter skrajšan gen poimenovali sfPFKM (okrajšano za ang. short fragment PFKM).

3.4 SESTAVA GOJIŠČ

3.4.1 Gojišče Sc – ura GE (z glicerolom in etanolom)

Preglednica 1: Recept za pripravo gojišča Sc – ura GE

Sestavina	Količina
Dodatek kvasnega sintetičnega gojišča brez uracila	0,192 g
Glicerol	2 ml
10 x kvasna dušikova baza brez aminokislin (po avtoklaviranju)	10 ml
Etanol (po avtoklaviranju)	2 ml
dH ₂ O	do 100 ml

Op.: za trdno gojišče dodamo 2 g agarja

3.4.2 Gojišče Sc – ura s sladkorji (1 %)

Preglednica 2: Recept za pripravo gojišča Sc – ura s sladkorji (1 %)

Sestavina	Količina
Sintetični kvasni dopolnilni medij brez uracila	0,192 g
Glukoza/fruktoza/maltoza (1 %)	1 g
Agar	1,5 g
dH ₂ O	do 90 ml
10 x kvasna dušikova osnova (Y1251) z dodanim amon sulfatom (po avtoklaviranju)	10 ml

3.4.3 Gojišče YEPGE

Preglednica 3: Recept za pripravo gojišča YEPGE

Sestavina	Količina
Kvasni ekstrakt	1 g
Bakto pepton	1 g
Glicerol	2 ml
Etanol (po avtoklaviranju)	2 ml
dH ₂ O	do 100 ml

Op.: za trdno gojišče dodamo 2 g agarja

3.5 TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH CELIC *E. coli* SEV DH5λ S PLAZMIDNIMA VEKTORJEMA p416GPD IN p426GPD

Komercialno predpripravljenim kompetentnim celicam *E. coli* sev DH5λ (60 µl) smo dodali v posamezne mikrocentrifugirke ločeno 2 µl plazmida p416GPD in 2 µl p426GPD s koncentracijo $c = 20 \text{ ng/}\mu\text{l}$ in izvedli transformacijo. Najprej smo mikrocentrifugirke inkubirali 4 minute na 42 °C, nato 2 minuti na ledu. Nato smo dodali 1 ml že pripravljenega tekočega gojišča Luria Bertani proizvajalca Sigma (Sigma Aldrich, St. Luis, ZDA) in stresali pri 350 obr./min. na 37 °C eno uro. Nato smo centrifugirali 3 minute pri 7000 obr./min. Odvečno gojišče smo odstranili, 100 µl usedline pa resuspendirali na vibracijskem mešalniku in naredili razmaz na že pripravljeno gojišče LB z dodanim ampicilinom ($c_{\text{amp}} = 100 \text{ }\mu\text{g/ml}$) proizvajalca Sigma (Sigma Aldrich, St. Luis, ZDA), ter inkubirali pri 37 °C 18 ur.

3.5.1 Namnožitev transformiranih celic za izolacijo plazmidne DNA

Iz LB gojitvene plošče z dodanim ampicilinom (točka 3.5) smo posamezno osamljeno kolonijo postrgali z zobotrebcom in prenesli v epruveto z 10 ml tekočega gojišča LB, kateremu smo dodali 10 µl ampicilina z založno koncentracijo $c_{\text{amp}} = 50 \text{ mg/ml}$. Epruvete smo nato stresali na stresalniku 18 ur na 37 °C.

3.6 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA p416GPD IN p426GPD IZ BAKTERIJSKIH CELIC *E. coli* SEV DH5λ

Iz epruvete, kjer smo namnožili *E. coli* DH5λ s plazmidom p416GPD, ter iz epruvete, kjer smo namnožili *E. coli* sev DH5λ s plazmidom p426GPD, smo odpipetirali 2 ml gojišča s celicami in centrifugirali 1 minuto pri najvišjih obratih. Usedlino smo nato ponovno resuspendirali v 2 ml gojišča z bakterijskimi celicami, ter postopek še dvakrat ponovili.

Dobljeno usedlino smo nato resuspendirali v 250 ml raztopine za resuspendiranje komercialnega kompleta GeneJETTM plasmid MiniprepKit (Fermentas International, Burlington, Kanda), s katerim smo nato tudi izvedli izolacijo plazmidne DNA po navodilih proizvajalca Fermentas. Dobljene koncentracije plazmidnih DNA p416GPD in p426GPD smo določili s spektrofotometrom NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, ZDA).

3.7 NAMNOŽITEV VKLJUČKA *sfPFKM* IN NATIVNEGA *nhPFKM* Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)

3.7.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Za pomnoževanje genov *nhPFKM* in *sfPFKM* s PCR in za vstavitev v plazmidna vektorja p416GPD in p426GPD, smo morali izbrati primerne začetne oligonukleotide (zač. o.). S pomočjo restrikcijskih map plazmidov smo izbrali dvojce prepoznavnih zaporedij za dva restrikcijska encima za vsak vključek, ki smo jih upoštevali pri načrtovanju zač. o. Z izbiro dveh restrikcijskih encimov preprečimo zapiranje vektorja brez vključka, poleg tega pa lahko vstavimo fragment v želeni orientaciji. Upoštevali smo tudi nukleotidna zaporedja vključkov, da izbrane restriktaze ne režejo znotraj vključka. To smo preverili tudi s pomočjo internetnega orodja NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Izbrali smo restrikcijske encime, ki režejo DNA s stopničastim rezom, zaradi česar nastanejo štrleči konci. Ker plazmida p416GPD in p426GPD ne vsebujeta kodona za začetek translacije ter stop kodona, smo zaporedja vključili pri konstruiranju zač. o. Zaporedje smernega zač. o. smo sestavili tako, da smo prvih 6 nukleotidov (nt) izbrali naključno, sledilo je prepoznavno restrikcijsko mesto izbranega restrikcijskega encima, start kodon ATG, ter prb. 16 nt, ki nalegajo na zaporedje vključka. Za zaporedje protismernega zač. o. pa smo najprej določili prb. 16 nt, ki nalegajo na zaporedje vključka, sledil je stop kodon TAA, prepoznavno mesto za izbran restrikcijski encim ter zaporedje šestih naključnih nt. Nato smo z internetnim orodjem Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) poiskali njegov reverzni komplement (smer zapisa 5'→3'). Pazili smo, da konca izbranega para oligonukleotidov nista komplementarna, ter da ne vsebujeta komplementarnih regij, kar smo preverili z internetnim orodjem OligoEvaluatorTM na spletni strani Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligo-evaluator.html>). Preverili smo tudi temperature tališča ter naročili zaporedja preko internetne strani Custom Oligos (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos.html>), za nas jih je izdelalo podjetje Sigma-Aldrich (St. Luis, ZDA). Začetne oligonukleotide smo poimenovali glede na zaporedne številke baze zač. o. v bazi Kemijskega inštituta. Zaporedja zač. o. so podana v Preglednici 4.

Preglednica 4: Nukleotidna zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')
2171 (S)	GAATTATCTAGAATGACCCATGAAGAGCACC
2172 (P)	TAATTCGGATCCTTACAGGCCCTCGAAACCATC
2197 (P)	TAATTCGGATCCTTAGACGGCCGCTTCCCC
2213 (S)	GAATTAGGATCCATGACCCATGAAGAGCACC
2214 (P)	TAATTCCTCGAGTTACAGGCCCTCGAAACCATC
2215 (P)	TTATTCCTCGAGTTAGACGGCCGCTTCCCC

Op.: Oznake: S-smerni, P-protismerni

3.7.2 Namnožitev vključka sfPFKM

Za PCR potrebujemo 10-50 ng matrične DNA. Založno koncentracijo vključka v vektorju pAlter-Ex1 smo določili s spektrofotometrom NanoDrop ($c_{342} = 13,2 \text{ ng}/\mu\text{l}$) in pripravili reakcijsko mešanico za PCR (Preglednici 5 in 6). Uporabili smo *Pfx* Platinum DNA-polimerazo (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, ZDA).

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka sfPFKM za ligacijo v plazmidni vektor p416GPD

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
Matrična DNA (342)	13,2 ng/ μl	2
Zač. oligonukleotid S (2171)	20 pmol/ μl	2,5
Zač. oligonukleotid P (2172)	20 pmol/ μl	2,5
Mešanica dNTP	2,5 mM	4
Mg ²⁺ ioni (MgSO ₄)	50 mM	1
Pomnoževalni pufer	10 x	5
Polimeraza <i>Pfx</i> Platinum	/	1
Voda MQ	/	32
Skupni volumen		50

Op.: 342 je ime matrične DNA - sfPFKM v pAlter-Ex1 v bazi Kemijskega inštituta.

Op.2: Oznake: S-smerni, P-protismerni

Vse sestavine smo vnesli v mikrocentrifugirke in jih vstavili v aparaturu za PCR (MWG-Biotech, Ebersberg, Nemčija).

PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih:

- 2 minuti pri temperaturi začetne denaturacije DNA (94 °C)
- Pomnoževanje (30 ponovitev):
 - 1 minuta pri temperaturi denaturacije (94 °C)
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C)
 - 1,5 minute (1 minuta / 1 kbp) pri temperaturi pomnoževanja vključkov, ki je značilna za določeno polimerazo (68 °C za *Pfx* Platinum)
- Zaključevanje reakcije: 7 minut pri temperaturi pomnoževanja vključkov (68 °C)
- Hlajenje: ohladitev na 4 °C.

Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka *sfPFKM* za ligacijo v plazmidni vektor p426GPD

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
Matrična DNA (342)	13,2 ng/μl	2
Zač. oligonukleotid S (2213)	20 pmol/μl	2,5
Zač. oligonukleotid P (2214)	20 pmol/μl	2,5
Mešanica dNTP	2,5 mM	4
Mg ²⁺ ioni (MgSO ₄)	50 mM	1
Pomnoževalni pufer	10 x	5
Polimeraza <i>Pfx</i> Platinum	/	1
Voda MQ	/	32
Skupni volumen		50

Op.1: 342 je ime matrične DNA - *sfPFKM* v pAlter-Ex1.

Op.2: Oznake: S-smerni, P-protismerni

PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih:

1. 2 minuti pri temperaturi začetne denaturacije DNA (94 °C)
2. Pomnoževanje (30 ponovitev):
 - 1 minuta pri temperaturi denaturacije (94 °C)
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C)
 - 1,5 minute pri temperaturi pomnoževanja vključkov, ki je značilna za določeno polimerazo (68 °C za *Pfx* Platinum)
3. Zaključevanje reakcije: 7 minut pri temperaturi pomnoževanja vključkov (68 °C)
4. Hlajenje: ohladitev na 4 °C.

3.7.3 Namnožitev vključka *nhPFKM*

Založno koncentracijo vključka v vektorju pAlter-Ex1 smo določili s spektrofotometrom NanoDrop ($c_{343} = 42,6 \text{ ng/μl}$) in pripravili reakcijsko mešanico za PCR (Preglednica 7 in 8). Vodo MQ smo dodali do končnega volumna 50 μl.

Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka *nhPFKM* v plazmidni vektor p416GPD

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
Matrična DNA (343)	42,6 ng/μl	1
Zač. oligonukleotid S (2171)	20 pmol/μl	2,5
Zač. oligonukleotid P (2197)	20 pmol/μl	2,5
Mešanica dNTP	2,5 mM	4
Mg ²⁺ ioni (MgSO ₄)	50 mM	1
Pomnoževalni pufer	10 x	5
Polimeraza <i>Pfx</i> Platinum	/	1
Voda MQ	/	33
Skupni volumen		50

Op.1: 343 je ime matrične DNA - *nhPFKM* v pAlter-Ex1 v bazi Kemijskega inštituta.

Op.2: Oznake: S-smerni, P-protismerni

PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih:

1. 2 minuti pri temperaturi začetne denaturacije DNA (94 °C)
2. Pomnoževanje (30 ponovitev):
 - 1 minuta pri temperaturi denaturacije (94 °C)
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C)
 - 2,5 minuti pri temperaturi pomnoževanja vključkov, ki je značilna za določeno polimerazo (68 °C za *Pfx* Platinum)
3. Zaključevanje reakcije: 7 minut pri temperaturi pomnoževanja vključkov (68 °C)
4. Hlajenje: ohladitev na 4 °C.

Preglednica 8: Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka *nhPFKM* v plazmidni vektor p426GPD

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
Matrična DNA (343)	42,6 ng/μl	1
Zač. oligonukleotid S (2213)	20 pmol/μl	2,5
Zač. oligonukleotid P (2215)	20 pmol/μl	2,5
Mešanica dNTP	2,5 mM	4
Mg ²⁺ ioni (MgSO ₄)	50 mM	1
Pomnoževalni pufer	10 x	5
Polimeraza <i>Pfx</i> Platinum	/	1
Voda MQ	/	33
Skupni volumen		50

Op.1: 343 je ime matrične DNA - *nhPFKM* v pAlter-Ex1 v bazi Kemijskega inštituta.

Op.2: Oznake: S-smerni, P-protismerni

PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih:

1. 2 minuti pri temperaturi začetne denaturacije DNA (94 °C)
2. Pomnoževanje (30 ponovitev):
 - 1 minuta pri temperaturi denaturacije (94 °C)
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C)
 - 2,5 minuti pri temperaturi pomnoževanja vključkov, ki je značilna za določeno polimerazo (68 °C za *Pfx* Platinum)
3. Zaključevanje reakcije: 7 minut pri temperaturi pomnoževanja vključkov (68 °C)
4. Hlajenje: ohladitev na 4 °C.

3.8 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA PRODUKTOV PCR

Uspešnost pomnoževanja vključkov smo preverili na agaroznem gelu z elektroforezo. Pripravili smo 1,2 % agarozni gel. 1,2 g agaroze smo s segrevanjem raztopili v 100 ml pufru TAE, ohladili in dodali 2 μl etidijevega bromida (0,5 mg/ml). Raztopino smo nato vlili v elektroforezno banjico. Ko se je gel strdil, smo nanegli po 5 μl posameznega vzorca DNA, kateremu smo dodali 1 μl (1/6 končnega volumna) 6-kratnega nanašalnega pufru.

Nanesli smo tudi 60 µl velikostnega standarda λDNA *HindIII/EcoRI* 10 kbp velikostno lestvico. Elektroforeza je potekala 40 minut pri napetosti 100 V, nato smo gel osvetlili z UV svetlobo in fotografirali.

3.9 ČIŠČENJE PRODUKTOV PCR

Produkte PCR smo iz agaroznega gela izrezali s skalpelom in očistili s kompletom QIAquick PCR Purification Kit po navodilih proizvajalca (Qiagen, Hilden, Nemčija). DNA se veže na nosilec, ki ga speremo s 50 µl MQ. Koncentracijo očiščenih produktov smo določili s spektrofotometrom NanoDrop.

3.10 PRIPRAVA VKLJUČKOV IN VEKTORJEV ZA LIGACIJO

3.10.1 Rezanje vključkov *sfPFKM*, *nhPFKM* in vektorja *p416GPD*

Za pripravo vključkov *sfPFKM* in *nhPFKM* ter vektorja *p416GPD* za ligacijo smo uporabili komercialne restrikcijske encime proizvajalca Fermentas (Fermentas International, Burlington, Kanada). Pripravili smo restrikcijsko mešanico, ki je vsebovala 2 µg DNA, 1 µl posameznega restrikcijskega encima, 5 µl pufru za optimalno delovanje encimov, ter dodali toliko sterilne MQ, da je bil končni volumen 50 µl. Primeren pufer za optimalno delovanje obeh restrikcijskih encimov smo izbrali s pomočje internetne strani Fermentas, Double Digest (<https://www.thermofisher.com/si/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>). Preverili smo, da izbrana restrikcijska encima ne režeta zaporedja tudi znotraj gena (internetna stran Res cutter (<http://www.changbioscience.com/res/rescutter.html>)). Ker sta na plazmidu restrikcijski mesti za *BamHI* in *XbaI* blizu skupaj, smo restrikcijska encima dodali zaporedno. Sestava restrikcijskih mešanic je podana v Preglednicah 9, 10 in 11. Restrikcija je potekala 2 uri pri 37 °C.

Preglednica 9: Sestava restrikcijske mešanice pomnožka *sfPFKM* za ligacijo v plazmidni vektor *p416GPD*

Sestavina	Koncentracija	Volumen (µl)
DNA (<i>sfPFKM</i>)	148,6 ng/µl	13
Restr. encim 1 (<i>BamHI</i>)	/	1
Restr. encim 2 (<i>XbaI</i>)	/	1
Restr. pufer (Tango 10 x)	10 x	5
Voda MQ	/	30
Skupni volumen		50

Preglednica 10: Sestava restrikcijske mešanice pomnožka *nhPFKM* za ligacijo v plazmidni vektor p416GPD

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
DNA (<i>nhPFKM</i>)	127,6 ng/μl	16
Restr. encim 1 (<i>Bam</i> HI)	/	1
Restr. encim 2 (<i>Xba</i> I)	/	1
Restr. pufer (Tango 10 x)	10 x	5
Voda MQ	/	27
Skupni volumen		50

Preglednica 11: Sestava restrikcijske mešanice za odpiranje plazmidnega vektorja p416GPD za ligacijo

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
DNA (p416GPD)	404,4 ng/μl	5
Restr. encim 1 (<i>Bam</i> HI)	/	1
Restr. encim 2 (<i>Xba</i> I)	/	1
Restr. pufer (Tango 10 x)	10 x	5
Voda MQ	/	38
Skupni volumen		50

3.10.2 Rezanje vključkov *sfPFKM*, *nhPFKM* in vektorja p426GPD

Restrikcijske mešanice smo pripravili enako kot v točki 3.10.1. Izbrali smo primeren pufer za optimalno delovanje obeh encimov na internetni strani Fermentas, Double Digest (<https://www.thermofisher.com/si/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>), in dodali dvakratno količino komercialnega encima *Xho*I glede na drugi encim, ker je bila ob izbranem paru restriktaz podana opomba '2-fold excess of *Xho*I'. Sestava mešanic je podana v Preglednicah 12-14.

S pomočjo internetne strani Rescutter (<http://www.changbioscience.com/res/rescutter.html>) smo preverili, da restrikcijska encima ne režeta zaporedja tudi znotraj gena.

Preglednica 12: Sestava restrikcijske mešanice pomnožka *shPFKM* za ligacijo v plazmidni vektor p426GPD

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
DNA (<i>sfPFKM</i>)	109,6 ng/μl	18
Restr. encim 1 (<i>Bam</i> HI)	/	1,5
Restr. encim 2 (<i>Xho</i> I)	/	3
Restr. pufer (G)	/	5
Voda MQ	/	22,5
Skupni volumen		50

Preglednica 13: Sestava restrikcijske mešanice pomnožka *nhPFKM* za ligacijo v plazmidni vektor p426GPD

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
DNA (<i>nhPFKM</i>)	93,6 ng/μl	21
Restr. encim 1 (<i>Bam</i> HI)	/	1,5
Restr. encim 2 (<i>Xho</i> I)	/	3
Restr. pufer (G)	/	5
Voda MQ	/	19,5
Skupni volumen		50

Preglednica 14: Sestava restrikcijske mešanice za odpiranje plazmidnega vektorja p426GPD za ligacijo

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
DNA (p426GPD)	474,1 ng/μl	4,2
Restr. encim 1 (<i>Bam</i> HI)	/	1,5
Restr. encim 2 (<i>Xho</i> I)	/	3
Restr. pufer (G)	/	5
Voda MQ	/	36,3
Skupni volumen		50

3.11 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA REZANIH VKLJUČKOV IN VEKTORJEV

Agarozni gel smo pripravili kot v točki 3.8. Nanj smo nanesli po 5 μl posameznega vzorca DNA, kateremu smo dodali 1 μl nanašalnega pufra. Nanesli smo tudi 60 μl standarda. Elektroforeza je potekala 40 minut pri napetosti 100 V, nato smo gel osvetlili z UV svetlobo in fotografirali.

3.12 ČIŠČENJE REZANIH VKLJUČKOV IN VEKTORJEV

Po elektroforezi smo rezane produkte PCR in vektorjev s skalpelom izrezali iz gela in izolirali s komercialnim kompletom QIAquick PCR Purification Kit (za čiščenje 100 bp-10 kbp velikih DNA fragmentov) po navodilih proizvajalca (Qiagen, Hilden, Nemčija). Koncentracijo očiščenih PCR produktov smo določili s spektrofotometrom NanoDrop.

3.13 LIGACIJA VKLJUČKOV V VEKTORJA

Za vstavljanje vključkov v vektorja smo uporabili 100 ng posameznega vektorja in ustrezno količino vključka z lepljivimi konci, izračunano po formuli:

$$m_{\text{vključek}} = (m_{\text{vektor}} \times \text{dolžina}_{\text{vključek}}) / (\text{dolžina}_{\text{vektor}}) \quad \dots(1)$$

Za izračun smo uporabili naslednje podatke:

$$m_{\text{vektor}} = 100 \text{ ng}$$

$$\text{dolžina}_{\text{vektor}} (\text{p416 GPD}) \sim 5,8 \text{ kbp}$$

$$\text{dolžina}_{\text{vektor}} (\text{p426 GPD}) \sim 6,6 \text{ kbp}$$

$$\text{dolžina}_{\text{vključek}} (\text{sfPFKM}) \sim 1,4 \text{ kbp}$$

$$\text{dolžina}_{\text{vključek}} (\text{nhPFKM}) \sim 2,4 \text{ kbp}$$

$$V_{\text{vključek}} = m_{\text{vključek}} / c_{\text{vključek}}$$

Pripravili smo ligacijske mešanice, kjer smo uporabili T4-DNA ligazo in pufer za T4-DNA ligazo (Promega, Madison, ZDA), ter po potrebi dodali vodo MQ do končnega volumna 20 μl . Pri pripravi kontrolne ligacijske mešanice (vektor brez vključka) smo količino vključka nadomestili z ustrezno količino vode MQ. Sestava reakcijskih mešanic je podana v Preglednicah 15-18. Ligacija je tekla čez noč pri 16 °C.

Preglednica 15: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka *sfPFKM* v plazmidni vektor p416GPD

$$(c_{\text{p416GPD}} = 10,2 \text{ ng}/\mu\text{l}; c_{\text{sfPFKM}} = 6,7 \text{ ng}/\mu\text{l})$$

Sestavina	Volumen (μl)
Vektor (p416GPD)	10
Vključek (sfPFKM)	3,6
Ligaza (T4-DNA ligaza)	1
Pufer (T4 ligazni pufer)	2
Voda MQ	3,4
Skupni volumen	20

Op.: za pripravo kontrolne ligacijske mešanice smo količino vključka nadomestili z ustrezno količino vode MQ

Preglednica 16: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka *nhPFKM* v plazmidni vektor p416GPD

$$(c_{\text{p416GPD}} = 39,9 \text{ ng}/\mu\text{l}; c_{\text{nhPFKM}} = 5,7 \text{ ng}/\mu\text{l})$$

Sestavina	Volumen (μl)
Vektor (p416 GPD)	2,5
Vključek (nhPFKM)	7,3
Ligaza (T4-DNA ligaza)	1
Pufer (T4 ligazni pufer)	2
Voda MQ	7,2
Skupni volumen	20

Op.: za pripravo kontrolne ligacijske mešanice smo količino vključka nadomestili z ustrezno količino vode MQ

Preglednica 17: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka *sfPFKM* v plazmidni vektor p426GPD
($c_{p426GPD} = 10,7 \text{ ng/}\mu\text{l}$; $c_{sfPFKM} = 8,8 \text{ ng/}\mu\text{l}$)

Sestavina	Volumen (μl)
Vektor (p426 GPD)	9,4
Vključek (<i>sfPFKM</i>)	2,4
Ligaza (T4-DNA ligaza)	1
Pufer (T4 ligazni pufer)	2
Voda MQ	5,2
Skupni volumen	20

Op.: za pripravo kontrolne ligacijske mešanice smo količino vključka nadomestili z ustrežno količino vode MQ

Preglednica 18: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka *nhPFKM* v plazmidni vektor p426GPD
($c_{p426GPD} = 10,7 \text{ ng/}\mu\text{l}$; $c_{nhPFKM} = 8,4 \text{ ng/}\mu\text{l}$)

Sestavina	Volumen (μl)
Vektor (p426 GPD)	9,4
Vključek (<i>nhPFKM</i>)	4,3
Ligaza (T4-DNA ligaza)	1
Pufer (T4 ligazni pufer)	2
Voda MQ	3,3
Skupni volumen	20

Op.: za pripravo kontrolne ligacijske mešanice smo količino vključka nadomestili z ustrežno količino vode MQ

3.14 TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH CELIC *E. coli* SEV DH5 λ S KONSTRUKTI

Vektorja p416GPD in p426GPD z vstavljenima vključkoma *sfPFKM* in *nhPFKM* ter vektorje kontrolne ligacije brez vključkov smo vnesli v komercialno predpripravljene kompetentne celice *E. coli* sev DH5 λ . V posamezne mikrocentrifugirke z 200 μl kompetentnih bakterijskih celic smo dodali 20 μl posameznih ligacijskih mešanic ter kontrolnih ligacijskih mešanic. Mikrocentrifugirke smo pustili pol ure na ledu, nato smo jih inkubirali 4 minute na 42 °C. Sledila je 2-minutna inkubacija na ledu. Nato smo v posamezno mikrocentrifugirko dodali 1 ml gojišča LB z dodanim ampicilinom ($c_{amp} = 50 \text{ mg/ml}$) in eno uro stresali pri 350 obr./min na 37 °C. Po tem času smo mikrocentrifugirke centrifugirali 3 minute pri 7000 obr./min. Nato smo odstranili odvečno gojišče, 100 μl usedline pa resuspendirali na vibracijskem mešalniku in nanесли na plošče z gojiščem LB z dodanim amp. Plošče smo inkubirali 18 ur na 37 °C. Ob uspešni transformaciji smo po tem času na ploščah opazili rast bakterij z rekombinantnim plazmidom, plošče kontrolnih ligacij pa so morale ostati brez bakterijske rasti.

3.15 POTRDITEV KONSTRUKTOV

3.15.1 PCR in agarozna gelska elektroforeza

Iz vsake LB plošče z dodanim amp s transformantami z rekombinantnim plazmidom (p416GPD z vstavljenim *sfPFKM*; p416GPD z vstavljenim *nhPFKM*; p426GPD z vstavljenim *sfPFKM* in p426GPD z vstavljenim *nhPFKM*) smo izbrali 10 kolonij, s katerimi smo izvedli PCR za potrditev konstruktov. Kolonije smo precepili na novo LB ploščo z dodanim amp in jih ustrezno označili. Izolirali smo plazmidno DNA z vključkom po postopku, opisanem v točki 3.6, ter določili koncentracije s spektrofotometrom NanoDrop. Pri pripravi reakcijskih mešanic za PCR smo uporabili iste začetne oligonukleotide kot za namnožitev vključkov v točki 3.7.1. Sestave reakcijskih mešanic so navedene v Preglednicah 19-22.

Preglednica 19: Sestava reakcijske mešanice za PCR za potrditev vsebnosti plazmidnega vektorja p416GPD z vključkom *sfPFKM*

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
Matrična DNA (Plazmidna DNA)	23,2 ng/μl	2
Zač. oligonukleotid S (2171)	20 pmol/μl	1
Zač. oligonukleotid P (2172)	20 pmol/μl	1
Mešanica dNTP	2,5 mM	1,6
Mg ²⁺ ioni (MgSO ₄)	10 x	2
10 x pomnoževalni pufer	10 x	2
Polimeraza <i>Pfx</i> Platinum	/	1
Voda MQ	/	9,4
Skupni volumen		20

PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih:

1. 2 minuti pri temperaturi začetne denaturacije DNA (94 °C)
2. Pomnoževanje (30 ponovitev):
 - 1 minuta pri temperaturi denaturacije (94 °C)
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C)
 - 1,5 minute pri temperaturi pomnoževanja vključkov, ki je značilna za določeno polimerazo (68 °C za *Pfx* Platinum)
3. Zaključevanje reakcije: 7 minut pri temperaturi pomnoževanja vključkov (68 °C)
4. Hlajenje: ohladitev na 4 °C.

Preglednica 20: Sestava reakcijske mešanice za PCR za potrditev vsebnosti plazmidnega vektorja p426GPD z vključkom *sfPFKM*

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
Matrična DNA (Plazmidna DNA)	47,4 ng/μl	1
Zač. oligonukleotid S (2213)	20 pmol/μl	1
Zač. oligonukleotid P (2214)	20 pmol/μl	1
Mešanica dNTP	2,5 mM	1,6
Mg ²⁺ ioni (MgSO ₄)	10 x	2
10x pomnoževalni pufer	10 x	2
Polimeraza <i>Pfx</i> Platinum	/	1
Voda MQ	/	10,4
Skupni volumen		20

PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih:

1. 2 minuti pri temperaturi začetne denaturacije DNA (94 °C)
2. Pomnoževanje (30 ponovitev):
 - 1 minuta pri temperaturi denaturacije (94 °C)
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C)
 - 1,5 minute pri temperaturi pomnoževanja vključkov, ki je značilna za določeno polimerazo (68 °C za *Pfx* Platinum)
3. Zaključevanje reakcije: 7 minut pri temperaturi pomnoževanja vključkov (68 °C)
4. Hlajenje: ohladitev na 4 °C.

Preglednica 21: Sestava reakcijske mešanice za PCR za potrditev vsebnosti plazmidnega vektorja p416GPD z vključkom *nhPFKM*

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
Matrična DNA (Plazmidna DNA)	19,9 ng/μl	2
Zač. oligonukleotid S (2171)	20 pmol/μl	1
Zač. oligonukleotid P (2197)	20 pmol/μl	1
Mešanica dNTP	2,5 mM	1,6
Mg ²⁺ ioni (MgSO ₄)	10 x	2
Pomnoževalni pufer	10 x	2
Polimeraza <i>Pfx</i> Platinum	/	1
Voda MQ	/	9,4
Skupni volumen		20

PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih:

1. 2 minuti pri temperaturi začetne denaturacije DNA (94 °C)
2. Pomnoževanje (30 ponovitev):
 - 1 minuta pri temperaturi denaturacije (94 °C)
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C)

- 2,5 minuti pri temperaturi, ki je značilna za določeno polimerazo (68 °C za *Pfx* Platinum)
- 3. Zaključevanje reakcije: 7 minut pri temperaturi pomnoževanja vključkov (68 °C)
- 4. Hlajenje: ohladitev na 4 °C.

Preglednica 22: Sestava reakcijske mešanice za PCR za potrditev vsebnosti plazmidnega vektorja p426GPD z vključkom nhPFKM

Sestavina	Koncentracija	Volumen (μl)
Matrična DNA (Plazmidna DNA)	43,2 ng/μl	1
Zač. oligonukleotid S (2213)	20 pmol/μl	1
Zač. oligonukleotid P (2215)	20 pmol/μl	1
Mešanica dNTP	2,5 mM	1,6
Mg ²⁺ ioni (MgSO ₄)	10 x	2
Pomnoževalni pufer	10 x	2
Polimeraza <i>Pfx</i> Platinum	/	1
Voda MQ	/	10,4
Skupni volumen		20

PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih:

1. 2 minuti pri temperaturi začetne denaturacije DNA (94 °C)
2. Pomnoževanje (30 ponovitev):
 - 1 minuta pri temperaturi denaturacije (94 °C)
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C)
 - 2,5 minuti pri temperaturi pomnoževanja vključkov, ki je značilna za določeno polimerazo (68 °C za *Pfx* Platinum)
3. Zaključevanje reakcije: 7 minut pri temperaturi pomnoževanja vključkov (68 °C)
4. Hlajenje: ohladitev na 4 °C.

Po opravljenem PCR smo preverili ustreznost konstruktov na 1,2 % agaroznem gelu z elektroforezo po postopku, opisanem pod točko 3.8.

3.15.2 Priprava vzorcev za določitev nukleotidnega zaporedja rekombinantnih vključkov

Izbrali smo 4 bakterijske kolonije iz LB plošč z dodanim amp (točka 3.14), pri katerih smo z elektroforezo potrdili vsebnost vključkov sfPFKM in nhPFKM (vsakega v posameznem vektorju p416GPD in p426GPD). Vključke smo namnožili po postopku, kot opisano v točki 3.7. Rekombinantno plazmidno DNA smo izolirali kot opisano v točki 3.6, dobljene koncentracije smo določili s spektrofotometrom NanoDrop. Vzorce za določitev nukleotidnega zaporedja smo v mikrocentrifugirki pripravili tako, da je 15 μl vzorca

vsebovalo 100 ng/ μ l plazmidne DNA. V vzorec smo nato dodali po 1 μ l ustreznega začetnega oligonukleotida s koncentracijo 20 pmol/ μ l. Uporabili smo iste začetne nukleotide kot v točki 3.7.1, za nativni nhPFKM smo zaradi njegove dolžine uporabili še notranji začetni oligonukleotid, ki je že bil v bazi zač. o. Kemijskega inštituta, njegovo zaporedje je podano v Preglednici 23. Nukleotidno zaporedje je za nas določilo podjetje Eurofins (Eurofins Scientific, Luksemburg), s poravnavo pričakovanih in dobljenih zaporedij smo potrdili ustreznost vključkov.

Preglednica 23: Zaporedje notranjega smernega začetnega oligonukleotida za določitev nukleotidnega zaporedja nativnega nhPFKM

Začetni oligonukleotid	Zaporedje (5' -> 3')
1682	GGGGTGGGACGCCATCAGCC

Op.: Začetni oligonukleotid je poimenovan glede na zap. št. v bazi Kemijskega inštituta.

3.16 TRANSFORMACIJA KVASOVKE *S. cerevisiae* sev HD114-8D S KONSTRUKTI

3.16.1 Priprava raztopin za transformacijsko mešanico

En dan pred transformacijo smo si pripravili založne količine raztopin, potrebnih za transformacijsko mešanico, in sicer:

Litijev-acetat (1M): raztopili smo 5,1 g Li-acetata (proizvajalca Sigma-Aldrich, St. Luis, ZDA) v 5 ml vode, avtoklavirali 15 min ter shranili pri sobni temperaturi.

Polietilen glikol 3500 50 % (w/V): 50 g PEG 3500 (Sigma-Aldrich) smo raztopili v 30 ml MQ vode na mešalni ogrevani plošči. Nato smo raztopino prenesli v bučko in dodali MQ vodo do 100 ml ter premešali z obračanjem. Raztopino smo sterilizirali z injekcijo skozi filter s porami premera 0,45 μ m. Evaporacija vode zviša koncentracijo PEG in vpliva na uspešnost transformacije, zato smo bučko dobro zatesnili in shranili pri sobni temperaturi.

Nosilna ssDNA (2 mg/ml): raztopili smo 200 mg DNA lososove spreje (Sigma-Aldrich) v 100 ml pufra TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA, pH 8,0) z mešanjem na 4°C 1-2 uri. Po 1 ml alikvota smo shranili pri -20 °C. Nosilno DNA denaturiramo v vreli vodi in po petih minutah ohladimo v kopeli voda/led pred uporabo. Posamezne vzorce lahko 3x uporabimo oz. 3x prevremo.

3.16.2 Sestava transformacijske mešanice

Pred transformacijo smo pripravili transformacijske mešanice, sestava je podana v Preglednici 24.

Preglednica 24: Sestava transformacijske mešanice

Sestavina	Volumen (μl)
Polietilen glikol 3500 50 % (w/V)	240
Litijski acetat 1 M	36
Nosilna ssDNA (2 mg/ml)	50
Plazmid (1 μg) + voda MQ	34
Skupni volumen	360

3.16.3 Transformacija

Transformacijo kvasovke *S. cerevisiae* sev HD114-8D s konstrukti na osnovi plazmidov p416GPD in p426GPD (nhPFKM v p416GPD, sfPFKM v p416GPD, nhPFKM v p426GPD, sfPFKM v p426GPD) smo izvedli po prirejenem LiAc/ssDNA/PEG postopku članka Gietz in Woods, 2002. Kolonijo kvasovke seva HD114-8D smo s plošče YEPGE precepili v 100 ml tekočega gojišča YEPGE in inkubirali pri 120 obr./min na 30 °C do optične gostote OD₆₀₀ 1. Najprej smo kulturo centrifugirali 2 minuti na 3000 obr./min pri 4 °C (centrifuga Beckman Coulter). Odstranili smo odvečno gojišče in usedlino sprali s 50 ml vode MQ in usedlino resuspendirali v 2 ml vode MQ. V vreli vodi smo inkubirali nosilno DNA 5 min in nato ohladili v mešanici voda/led. Celično suspenzijo smo razdelili v 1,5 ml mikrocentrifugirke po 100 μl in jih centrifugirali 2 min na 3000 obr./min, nato smo odstranili supernatant. Usedlinam celic v posameznih mikrocentrifugirkah smo dodali 360 μl transformacijske mešanice (sestava je podana v preglednici 24), resuspendirali, in 40 minut inkubirali pri 42 °C. Nato smo centrifugirali 2 min na 3000 obr./min pri 4°C, odstranili supernatant in resuspendirali usedlino v 1 ml vode MQ. Po 150 μl posamezne suspenzije celic smo nacepili na plošče z gojiščem Sc - ura GE in en teden inkubirali pri 30 °C. Pripravili smo tudi dve negativni kontroli, pri prvi smo v transformacijski mešanici uporabili nerezana plazmida p416GPD in p426GPD (brez vključka), pri drugi pa plazmida nismo dodali (namesto plazmida smo dodali ustrezno količino vode MQ).

3.17 ANALIZA TRANSFORMANT S PCR NA OSNOVI KOLONIJE

PCR na osnovi kolonije je v osnovi enaka klasični PCR, le da predhodna izolacija DNA ni potrebna, saj jo dobimo neposredno iz kvasne kolonije. Iz posamezne plošče Sc - ura GE (točka 3.16.3) smo ločeno prenesli po tri kolonije v 25 µl 20 mM NaOH in suspenzijo inkubirali 6 minut v vodni kopeli na 100 °C. 1 µl te suspenzije smo uporabili kot matrično DNA. Sestava reakcijske mešanice za PCR na osnovi kolonije je podana v Preglednici 25, uporabljeni začetni nukleotidi za pomnoževanje posameznih konstruktov pa v Preglednici 26. Uporabili smo DNA-polimerazo AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, ZDA).

Preglednica 25: Sestava mešanice za PCR na osnovi kolonije

Sestavina	Koncentracija	Volumen (µl)
Matrična DNA	/	1
Začetni oligonukleotid S (*)	1 pmol/µl	1
Začetni oligonukleotid P (*)	1 pmol/µl	1
Mešanica dNTP	2,5 mM	1,6
Mg ²⁺ ioni (MgCl ₂)	10 x	2
Pomnoževalni pufer za AmpliTaq polimerazo	10 x	2
DNA-polimeraza AmpliTaq	/	1
Voda MQ	/	10,4
Skupni volumen		20

*Op.: Uporabljeni začetni nukleotidi so navedeni v preglednici 26.

Preglednica 26: Uporabljeni začetni nukleotidi za pomnoževanje konstruktov

Konstrukt	Začetni oligonukleotid S, začetni oligonukleotid P
sfPFKM v p416GPD	2171, 2172
nhPFKM v p416GPD	2171, 2197
sfPFKM v p426GPD	2213, 2214
nhPFKM v p426GPD	2213, 2215

PCR smo izvedli pri naslednjih pogojih:

1. 5 minut pri temperaturi začetne denaturacije DNA (95 °C)
2. Pomnoževanje (30 ponovitev):
 - 1 minuta pri temperaturi denaturacije (95 °C)
 - 1 minuta pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C)
 - 2,5 minuti pri temperaturi pomnoževanja vključkov, ki je značilna za določeno polimerazo (72 °C za DNA-polimerazo AmpliTaq)
3. Zaključevanje reakcije: 10 minut pri temperaturi pomnoževanja vključkov (72 °C)
4. Hlajenje: ohladitev na 4 °C.

Ustreznost PCR produktov smo preverili na 1,2 % agaroznem gelu z elektroforezo kot v točki 3.8.

3.18 GOJENJE TRANSFORMIRANIH KVASOVK S KONSTRUKTI NA SELEKCIJSKIH GOJIŠČIH

Po eno kvasno kolonijo, pri kateri smo po PCR na osnovi kolonije (točka 3.17) potrdili posamezen konstrukt z gelsko elektroforezo, smo iz izvirne plošče Sc – ura GE (točka 3.16.3) precepili v 10 ml tekočega gojišča YEPGE in inkubirali pri 30 °C in 130 obr./min 70 ur.

Po tem času smo kvasovke iz tekočega gojišča YEPGE precepili na gojišča Sc – ura s sladkorji (1 %), ter inkubirali en teden pri 28 °C. Kot negativno kontrolo smo na posamezna gojišča nacepili tudi kvasovko *S. cerevisiae* sev HD114-8D (brez vstavljenih konstruktov).

4 REZULTATI

4.1 NAČRTOVANJE ZAČETNIH NUKLEOTIDOV

Glede na poliklonsko mesto restrikcijske mape plazmidov (sliki 5 in 6) in nukleotidnega zaporedja fragmentov smo sestavili začetne oligonukleotide. Njihova zaporedja so podana v Preglednicah 27-30.

Preglednica 27: Nukleotidni zaporedji začetnih oligonukleotidov za pomnožitev *sfPFKM* in ligacijo v plazmidni vektor p416GPD

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')
2171 (smerni)	GAATTATCTAGA ATG ACCCATGAAGAGCACC
2172 (protismerni)	TAATTCGGATCC TTA CAGGCCCTCGAAACCATC

Op.: pri 2171 je odebeljeno restrikcijsko mesto za encim *Xba*I, z zeleno barvo je označen start kodon. Pri 2172 je odebeljeno restrikcijsko mesto za *Bam*HI, z rdečo barvo je označen stop kodon.

Preglednica 28: Nukleotidni zaporedji začetnih oligonukleotidov za pomnožitev *sfPFKM* in ligacijo v plazmidni vektor p426GPD

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')
2213 (smerni)	GAATTAGGATCC ATG ACCCATGAAGAGCACC
2214 (protismerni)	TAATTCCTCGAG TTA CAGGCCCTCGAAACCATC

Op.: pri 2213 je odebeljeno restrikcijsko mesto za encim *Bam*HI, z zeleno barvo je označen start kodon. Pri 2214 je odebeljeno restrikcijsko mesto za *Xho*I, z rdečo barvo je označen stop kodon.

Preglednica 29: Nukleotidni zaporedji začetnih oligonukleotidov za pomnožitev *nhPFKM* in ligacijo v plazmidni vektor p416GPD

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')
2171 (smerni)	GAATTATCTAGA ATG ACCCATGAAGAGCACC
2197 (protismerni)	TAATTCGGATCC TTA GACGGCCGCTTCCCC

Op.: pri 2171 je odebeljeno restrikcijsko mesto za encim *Xba*I, z zeleno barvo je označen start kodon. Pri 2197 je odebeljeno restrikcijsko mesto za *Bam*HI, z rdečo barvo je označen stop kodon.

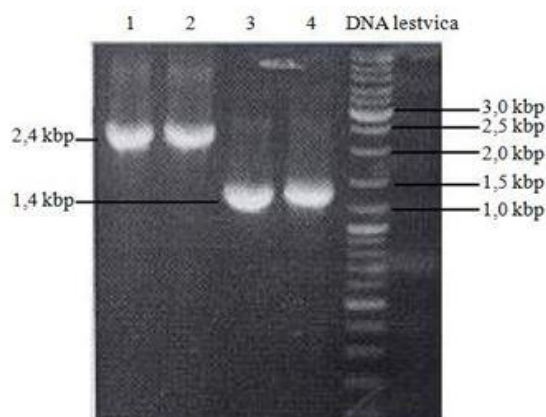
Preglednica 30: Nukleotidni zaporedji začetnih oligonukleotidov za pomnožitev *nhPFKM* in ligacijo v plazmidni vektor p426GPD

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→3')
2213 (smerni)	GAATTAGGATCC ATG ACCCATGAAGAGCACC
2215 (protismerni)	TTATTCCTCGAG TTA GACGGCCGCTTCCCC

Op.: pri 2213 je odebeljeno restrikcijsko mesto za encim *Bam*HI, z zeleno barvo je označen start kodon. Pri 2215 je odebeljeno restrikcijsko mesto za *Xho*I, z rdečo barvo je označen stop kodon.

4.2 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA NAMNOŽENIH VKLJUČKOV

Po namnožitvi s PCR smo preverili ustreznost vključkov oz. uspešnost namnožitve na 1,2 % agaroznem gelu z elektroforezo. Pričakovane velikosti na gelu so bile 1,4 kbp za kratek fragment in 2,4 kbp za nativni fragment. Kot standard smo uporabili 10 kbp velikostno lestvico.

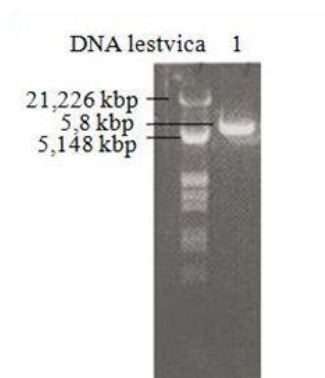


Slika 7: Agarozni gel; oznake: 1- *nhPFKM* po izvedenem PCR za ligacijo v p416GPD; 2- *nhPFKM* po PCR za ligacijo v p426GPD; 3- *sfPFKM* po PCR za ligacijo v p416 GPD; 4- *sfPFKM* po PCR za ligacijo v p426GPD

Lisi na agaroznem gelu (Slika 7) pod oznakama 1 in 2 sta se nahajali nekoliko pod liso 2,5 kbp velikostnega standarda, s čimer smo potrdili ustreznost vključka nativnega fragmenta pričakovane velikosti 2,4 kbp. Lisi pod oznakama 3 in 4 sta se nahajali med lisama 1,0 in 1,5 kbp velikostnega standarda, tako da smo potrdili tudi ustreznost vključka kratkega fragmenta pričakovane velikosti 1,4 kbp.

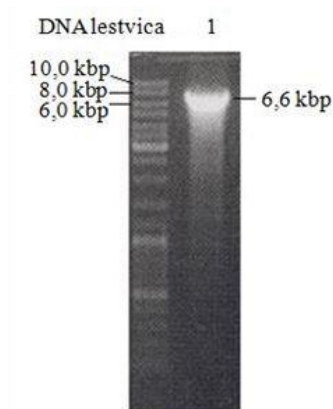
4.3 REZANJE VKLJUČKOV *sfPFKM* IN *nhPFKM* TER VEKTORJEV p416GPD IN p426GPD

Uspešnost restrikcije smo preverili na 1,2 % agaroznem gelu z elektroforezo. Kot standard smo uporabili λ DNA *HindIII/EcoRI* (Slika 8) in 10 kbp velikostno lestvico (sliki 9 in 10).



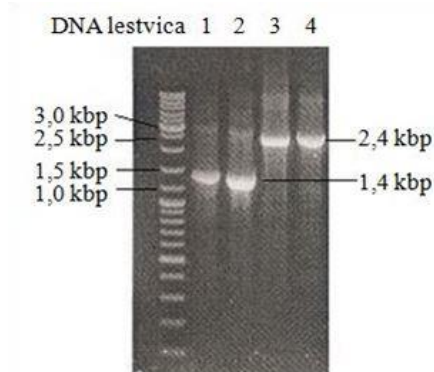
Slika 8: Agarozni gel; oznake: 1 - p416GPD po rezanju z *Bam*HI in *Xba*I

Lisa rezanega plazmida p416GPD na agaroznem gelu (Slika 8) se je nahajala med lisama velikosti 5,148 kbp in 21,226 kbp velikostne lestvice, s čimer smo potrdili ustreznost plazmida (pričakovana vrednost 5,8 kbp).



Slika 9: Agarozni gel; oznake: 1 - p426GPD po rezanju z *Bam*HI in *Xho*I

Lisa rezanega plazmida p426GPD na agaroznem gelu (Slika 9) se je nahajala med lisama velikosti 6,0 kbp in 8,0 kbp velikostne lestvice, s čimer smo potrdili ustreznost plazmida (pričakovana vrednost 6,6 kbp).



Slika 10: Agarozni gel; oznake: 1- sfPFKM po rezanju z *Bam*HI in *Xba*I; 2- sfPFKM po rezanju z *Bam*HI in *Xho*I; 3- nhPFKM po rezanju z *Bam*HI in *Xba*I; 4- nhPFKM po rezanju z *Bam*HI in *Xho*I

Lisi pod oznakama 1 in 2 na agaroznem gelu (Slika 10) sta se nahajali med lisama velikosti 1,0 kbp in 1,5 kbp velikostnega standarda, s čimer smo potrdili ustreznost velikosti vključkov (kratek fragment, pričakovana vrednost 1,4 kbp). Lisi pod oznakama 3 in 4 sta se nahajali nekoliko pod liso velikosti 2,5 kbp velikostnega standarda, s čimer smo potrdili ustreznost velikosti vključkov – pričakovana vrednost velikosti za nativni fragment je bila 2,4 kbp.

4.4 TRANSFORMACIJA KVASOVKE *S. cerevisiae* SEV HD114-8D S KONSTRUKTI

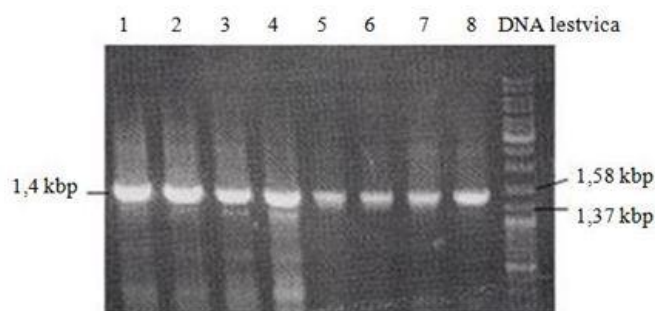
Kvasovko *S. cerevisiae* sev HD114-8D smo iz trdnega gojišča YEPGE precepili v tekoče gojišče YEPGE. Ustrezne konstrukte (sfPFKM v p416GPD in p426GPD, nhPFKM v p416GPD in p426GPD) smo vnesli v kvasovko *S. cerevisiae* sev HD114-8D s transformacijo. Kot kontrolo smo pripravili transformante s plazmidi brez vključka (kontrola 1); lahko rastejo na gojišču Sc – ura GE, saj porabljajo glicerol in etanol za rast. Kot negativno kontrolo smo pripravili transformacijsko mešanico brez plazmida. Kontrolne plošče (kontrola 2) so po inkubaciji ostale brez rasti. Št. kolonij transformiranih celic s posameznimi konstrukti je navedeno v preglednici 31.

Preglednica 31: Število transformant *S. cerevisiae* s posameznimi konstrukti na gojitveni plošči Sc – ura GE

Konstrukt v transformirani celici	Število kolonij na Sc – ura GE
sfPFKM v p416GPD	38
nhPFKM v p416GPD	54
sfPFKM v p426GPD	43
nhPFKM v p426GPD	61
Kontrola 1	19
Kontrola 2	0

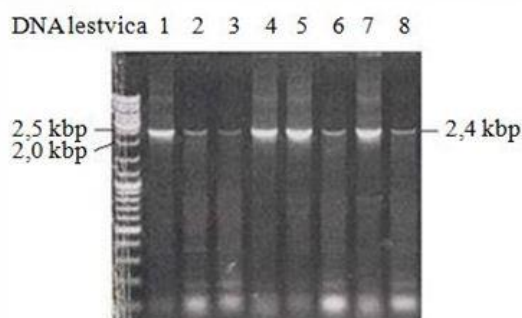
4.5 ANALIZA TRANSFORMANT S PCR NA OSNOVI KOLONIJE

Ustreznost konstruktov smo preverili na 1,2 % agaroznem gelu z elektroforezo. Kot standard smo uporabili λ DNA *HindIII/EcoRI* (Slika 11) in 10 kbp velikostno lestvico (Slika 12).



Slika 11: Agarozni gel po izvedenem PCR na osnovi kolonije transformiranih kvasovk; oznake konstruktov: 1- kontrola (*sfPFKM* v p416GPD), 2- kontrola (*sfPFKM* v p426GPD); 3, 4 in 5- *sfPFKM* v p416GPD; 6, 7 in 8- *sfPFKM* v p426GPD

Vse lise pod oznakami 1-8 na agaroznem gelu (Slika 11) so se nahajale v isti ravnini med lisama velikosti 1,37 kbp in 1,58 kbp velikostnega standarda, s čimer smo potrdili ustreznost velikosti vključka – kratek fragment v p416GPD (lise 3, 4 in 5) ter v p426GPD (lise 6, 7 in 8).



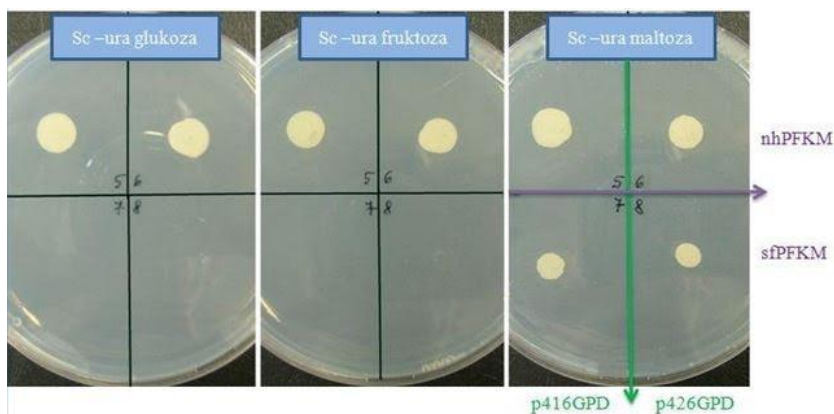
Slika 12: Agarozni gel po izvedenem PCR na osnovi kolonije transformiranih kvasovk; oznake konstruktov: 1-kontrola (*nhPFKM* v p416GPD), 2- kontrola (*nhPFKM* v p426GPD); 3, 4 in 5- *nhPFKM* v p416GPD; 6, 7 in 8- *nhPFKM* v p426GPD

Vse lise (oznake 1-8) na agaroznem gelu (Slika 12) so bile v isti ravnini, nekoliko pod liso velikosti 2,5 kbp velikostnega standarda. S tem smo potrdili ustreznost velikosti vključka nativnega PFKM v plazmidu p416GPD (lise 3, 4 in 5) oz. p426GPD (lise 6, 7 in 8).

4.6 RAST TRANSFORMIRANIH KVASOVK NA GOJIŠČIH Z RAZLIČNIMI SLADKORJI

Rast transformant na Sc – ura GE nakazuje, da so kvasovke prejele plazmidno DNA, saj zaradi komplementacije uracilne avksotrofije lahko rastejo na gojišču brez uracila. Aktivnost *nhPFKM* in *sfPFKM* ter njihovo sposobnost vključitve v metabolizem

transformant kvasovke *S. cerevisiae* sev HD114-8D pa smo analizirali s fiziološkim testom rasti na sladkorjih. Transformirane celice smo nacepili na gojišča z 1 % sladkorjem (glukoza, fruktoza, maltoza) in primerjali njihovo rast po enotedenski inkubaciji pri 28 °C.



Slika 13: Rast transformant *S. cerevisiae* sev HD114-8D s konstrukti na gojišču Sc – ura s sladkorji (od leve proti desni: z glukozo, s fruktozo in z maltozo). Oznake konstruktov: 5- nhPFKM v p416GPD, 6- nhPFKM v p426GPD, 7- sfPFKM v p416GPD, 8- sfPFKM v p426GPD

Vodoravna črta na ploščah gojišč z različnimi sladkorji (Slika 13) loči transformante z vstavljenim genom za nativni humani PFKM (zgoraj) ter transformante z vstavljenim genom za kratki fragment PFKM (spodaj). Navpična črta na ploščah loči transformante z plazmidom p416GPD (levo) ter p426GPD (desno). Po enotedenski inkubaciji so na vseh sladkorjih zrasle transformante, ki so vsebovale nhPFKM. V velikosti teh kolonij na posameznih sladkorjih ni večjih razlik, prav tako ni razlik med kolonijami z vektorjem p416GPD, in tistimi s p426GPD. Morfološko so podobne kolonijam, ki so zrasle na gojišču Sc – ura GE. Po drugi strani pa so transformante z vnešenim sfPFKM rasle le na gojišču z maltozo; kolonije so bile manjše od tistih z vnešenim nhPFKM, med kolonijami z vstavljenim vektorjem p416GPD, in tistim s p426GPD, pa v velikosti teh ni bilo bistvenih razlik. Kvasovka *S. cerevisiae* sev HD-114-8D na nobenem od navedenih gojišč ni rasla (negativna kontrola).

5 RAZPRAVA

Za ekspresijo kratkega visokoaktivnega fragmenta humanega PFKM smo izbrali kvasovke *S. cerevisiae*. So eden bolj preučenih evkariontskih organizmov in so zaradi enostavne gojitve eden najpogostejše uporabljenih modelnih organizmov za preučevanje primarnega metabolizma in drugih sistemov, vključno z rakom. Za vstavev kratkega in nativnega PFKM smo izbrali kvasovko *S. cerevisiae* sev HD114-8D, ki ima izbite gene za encim fruktoza-6-fosfat-1-kinazo, zato ne more rasti na fermentabilnih sladkorjih, raste pa na gojišču z dodanim glicerolom in etanolom (Estevez in sod., 1995).

Nativni humani PFKM je tetramerni encim, sestavljen iz dimernih podenot, ki se združujeta preko C-terminalnega dela. Kratki fragmenti, ki so skrajšani na C-terminalnem delu, so dimerni, in kot taki znatno bolj nestabilni od nativnega encima; v pogojih izven celice hitro izgubijo aktivnost (Šmerc in sod., 2011). Z izbiro močnega konstitutivnega promotorja GPD smo želeli doseči močno ekspresijo skrajšanega gena (*sfPFKM*) nativnega humanega *nhPFKM*; večja koncentracija izraženih podenot bi omogočila lažjo združitev podenot v aktivni encim. Tudi z izbiro dveh različnih ekspresijskih vektorjev, centromernim p416GPD in 2 μ p426GPD, smo želeli doseči različne nivoje izražanja podenot, ki bi lahko omogočili nastanek aktivnih vključkov. Predvidevali smo, da nam bo to uspelo predvsem s plazmidnim vektorjem p426GPD, ki se nahaja v celici v velikem številu kopij, poleg tega pa vsebuje močan promotor.

Pripravili smo transformante s *sfPFKM* in *nhPFKM* v plazmidnem vektorju p416GPD, ter transformante s *sfPFKM* in *nhPFKM* v plazmidnem vektorju p426GPD. Po enotedenski inkubaciji na 28 °C smo primerjali rast transformant na gojiščih z različnimi viri ogljikovih hidratov - glukozo, fruktozo in maltozo. Transformirane kvasovke z vstavljenim nativnim *nhPFKM* so rasle na vseh treh sladkorjih. Večjih razlik v velikosti kolonij med posameznimi gojišči, ter tudi med transformantami s p416GPD oz. p426GPD, ni bilo. Transformante z vstavljenim *sfPFKM* pa so, v nasprotju s pričakovanji, rasle le na gojišču z maltozo. Pričakovali smo namreč, da bodo najbolje rasle na enostavnem gojišču z glukozo, ki je kvasovkam preferenčni vir ogljika. Kljub temu z rastjo transformant z vstavljenim *sfPFKM* v vektorju p416GPD oz. p426GPD na maltozi lahko potrdimo, da smo v kvasovke učinkovito vnesli skrajšan gen *sfPFKM*, ki se je sestavil v funkcionalen encim in vključil v metabolizem kvasovke. Razlog za to, da transformante na glukozni in fruktozi niso rasle, je verjetno v zgradbi omenjenih sladkorjev. Glukoza in fruktoza sta monosaharida, medtem ko je maltoza disaharid, sestavljen iz dveh glukoznih podenot, povezanih z α -1,4-glikozidno vezjo. Glukozo in fruktozo zato lahko kvasovke hitreje porabljajo, kar lahko skupaj s kratkim fragmentom encima z zmanjšanim vplivom inhibicije privede do deregulacije metabolnega pretoka preko glikolize, prekomerne tvorbe NADH in s tem do porušitve NADH/NADPH razmerja. To privede do metabolnega stresa,

in končno lahko tudi do apoptoze celic. Pri maltozi pa se s hidrolizo v citosolu sproščajo glukozne enote počasneje, kar omili metabolni stres in omogoča rast na tem gojišču.

Rakaste celice, za katere je značilna hitra proliferacija, vzdržujejo NADH/NADPH razmerje z več mehanizmi. V poti pentoza fosfata nastaja NADPH ob pretvorbi G-6-P v 6-P-glukonolakton ter ob nastanku riboze-6-fosfata iz 6-P-glukonata. Ob pretvorbi malata v piruvat nastaja NADPH z od NADP^+ specifičnim maličnim encimom, ki ga kvasovke nimajo. Malični encim ima v rakastih celicah pomembno vlogo pri uravnoteženju NADH/NADPH razmerja (Vander Heiden in sod., 2009). Pri kvasovkah, ki nimajo ne maličnega encima ne transhidrogenaze, ki v rakastih celicah prav tako pretvarja NADH v NADPH, ima za vzdrževanje NADPH/NADH razmerja pomembno vlogo acetat. Med hitro rastjo celic nastaja poleg etanola (ob produkciji se reoksidira NADH) tudi acetat, ob tem pa tudi NADH ali NADPH z acetaldehid dehidrogenazo. Vendar pa tako etanol kot acetat v večjih količinah zmanjšata preživetje celic in ob pretirani zunajcelični akumulaciji lahko nastopi programirana celična smrt (Ludovico in sod., 2001). Ob povečanem metabolnem stresu oz. ob pospešenem glikolitičnem toku nastajajo tudi reaktivne kisikove zvrsti (ang. ROS), ki tako v kvasnih kot rakastih celicah lahko vodijo v apoptozo celic. Vendar pa v rakastih celicah povišan nivo ROS hkrati tudi pospešuje tumorigenezo s povečanjem števila DNA mutacij (Wellen in Thompson, 2010).

Z raziskovalnim delom smo uspeli pripraviti transformante z vstavljenim skrajšanim fragmentom PFKM, ki se je vključil v metabolizem kvasovke. Nismo pa uspeli pripraviti modelnega organizma, kjer bi lahko preučevali deregulirano glikolizo, saj so najverjetneje zaradi metabolnega stresa transformante s kratkim fragmentom PFKM rasle slabše kot tiste z vstavljenim nativnim humanim *nhPFKM* genom. Morda bi z gojiščem z nižjo vsebnostjo glukoze ali katerega drugega fermentativnega sladkorja uspeli doseči takšne pogoje za rast, kjer bi transformante s kratkim *sfPFKM* rasle hitreje kot tiste z nativnim genom.

6 SKLEPI

Transformirane kvasne celice *S. cerevisiae* sev HD114-8D z vnešenim nativnim humanim nhPFKM genom v ekspresijskih vektorjih p416GPD in p426GPD so rasle na vseh treh gojiščih Sc – ura z različnimi sladkorji (glukoza, fruktoza, maltoza), s čimer smo potrdili sintezo aktivnega encima, ki se je vključil v metabolizem kvasovke.

Z rastjo transformant *S. cerevisiae* sev HD114-8D z vnešenim skrajšanim sfPFKM genom na gojišču Sc – ura z maltozo smo potrdili tudi izražanje funkcionalnega kratkega fragmenta encima PFKM (mišičnega tipa). Sklepamo, da na ostalih dveh gojiščih, Sc – ura z glukozo in Sc – ura s fruktozo, ni bilo rasti, ker so presnovni produkti glukoze in fruktoze (monosaharida) v primeru deregulirane glikolize pri transformantah s sfPFKM povzročili prevelik metabolni stres za preživetje kvasovk.

V nasprotju z našo hipotezo z izraženim skrajšanim fragmentom PFKM v transformantah nismo dosegli boljše rasti v primerjavi z nativnim encimom. Z izbiro gojišča z nižjim deležem glukoze bi morda dosegli pogoje, ki ne bi privedli do metabolnega stresa v celici. Za natančnejšo analizo bi nato morali primerjalno spremljati rast v tekočih gojiščih ter z biokemičnimi analizami določiti nivo posameznih glikolitičnih intermediatov.

7 POVZETEK

Ena od temeljnih značilnosti rakastih celic je, da se delijo hitro in nenadzorovano. Onkogene mutacije jim omogočajo hitro proliferacijo, neodvisno od signalnih faktorjev. Njihov spremenjen energetski metabolizem pa jim dovoljuje, da privzemajo hranila v meri, ki presega energijske potrebe normalnih celic za rast in delitev. V aerobnih pogojih kljub razpoložljivemu kisiku s fermentacijo proizvajajo laktat, ki ga izločijo iz celic; pojav se imenuje Warburgov efekt (Šmerc in sod., 2011).

Ključni regulatorni encim glikolize, 6-fosfofrukto-1-kinaza (PFK1), je inhibiran ob povečanih koncentracijah citrata in adenzin trifosfata (ATP) v celici. Šmerc in sod. (2011) so ugotovili, da v rakastih celicah specifičen proteolitičen encim cepi človeški encim PFK1 85 kDa tako, da nastane kratek aktivni fragment 47 kDa s spremenjenimi kinetičnimi lastnostmi. Izkazuje zmanjšano inhibicijo z ATP in citratom, alosterični aktivator F-2,6-BP pa ga močneje aktivira, kot nativni encim. S tem fragment pospeši delovanje glikolize in deregulira metabolni pretok (Šmerc in sod., 2011).

Rekombinantni aktivni kratek fragment, ki lahko služi kot orodje za preučevanje metabolizma rakastih celic, lahko pripravimo tudi umetno z ekspresijo skrajšanega nativnega gena *PFK1*, pri čemer je ključna primerna koncentracija sintetiziranih monomerov za združitev v aktivni encim.

V diplomskem delu smo vnesli skrajšan humani gen, ki kodira visokoaktiven kratek fragment mišičnega tipa PFKM, v kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* sev HD114-8D, ki ima zbite lastne gene za encim fruktoza-6-fosfat-1-kinazo. Da bi dosegli primerno izražanje podenot za sintezo aktivnega encima, smo uporabili dva različna plazmidna vektorja, p416GPD in p426GPD, ki sta v celici prisotna v različnem številu kopij. Kvasovka *S. cerevisiae* z uspešno vstavljenim genom za kratek fragment PFKM v ekspresijskem vektorju bi lahko bila orodje za preučevanje deregulirane glikolize.

Z rastjo transformant na gojiščih s tremi različnimi sladkorji, z glukozo, fruktozo in maltozo, smo želeli preveriti, če sta se gena pravilno prepisala in če sta se njuna produkta, nativni PFKM in njegov kratek fragment, aktivno vključila v metabolizem kvasovke. Transformante z vstavljenim nativnim *PFKM* genom so zrasle na vseh treh gojiščih, medtem ko so transformante z vstavljenim skrajšanim *PFKM* genom zrasle le na gojišču z maltozo. Predvidevamo, da glukozo in fruktoza (monosaharida) v celici v kombinaciji z visokoaktivnim fragmentom PFKM povzročita prevelik metabolni stres, kar povzroči odmiranje celic, maltoza (disaharid) pa zaradi počasnega sproščanja glukoznih enot omili stres. Induciranje metabolizma, ki je podoben rakastim celicam, bi verjetno dosegli s

pripravo gojišča z nižjo vsebnostjo glukoze, aktivnost visokoaktivnega humanega fragmenta PFKM pa bi bilo smiselno spremljati tudi z biokemijskimi testi.

8 VIRI

- Addgene. 2004a. Vector database. Plasmid p416GPD. Cambridge, Addgene: 1 str.
<https://www.addgene.org/vector-database/1630/> (januar 2016)
- Addgene. 2004b. Vector database. Plasmid p426GPD. Cambridge, Addgene: 1 str.
<https://www.addgene.org/vector-database/1632/> (januar 2016)
- Banaszak K., Mechin I., Obmolova G., Oldham M., Chang S.H., Ruiz T., Radermacher M., Kopperschläger G., Rypniewski W. 2011. The crystal structures of eukaryotic phosphofructokinases from baker's yeast and rabbit skeletal muscle. *Journal of Molecular Biology*, 407: 284-297
- Boyer R. 2002. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Capuder M., Benčina M., Legiša M., Šolar T. 2009. Highly active, citrate inhibition resistant form of *Aspergillus niger*, 6-phosphofructo-1-kinase encoded by a modified *pfkA* gene. *Journal of Biotechnology*, 144: 51-57
- Christianson T.W., Sikorski R.S., Dante M., Shero J.H., Hieter P. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, 110, 1: 119-122
- Custom Oligos. 2004. St. Louis, Sigma Aldrich : 1 str.
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos.html> (junij 2016)
- DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*, 7: 11-20
- DeBerardinis R.J., Mancuso A., Daikhin E., Nissim I., Yudkoff M., Wehrli S., Thompson C.B. 2007. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 49: 19345-19350
- DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P.O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278, 5338: 680-686
- Díaz-Ruiz R., Avéret N., Araiza D., Pinson B., Uribe-Carvajal S., Devin A., Rigoulet M. 2008. Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *Journal of Biological Chemistry*, 283, 40:26948-26955
- Dunaway G.A., Kasten T.B., Sebo T., Trapp R. 1988. Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochemical Journal*, 251, 3: 677-683
- Elson A., Levanon D., Brandeis M., Dfini M., Bernstein Y. 1990. The structure of human liver-type phosphofructokinase gene. *Genomics*, 7, 1: 47-56
- Elstrom R.L., Bauer D.E., Buzzai M., Karnauskas R., Harris M.H., Plas D.R., Zhuang H., Cinalli R.M., Alavi A., Rudin C.M., Thompson C.B. 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Research*, 64, 11: 3892-3899

- Estevez A.M., Heinisch J., Aragon J.J. 1995. Functional complementation of yeast phosphofructokinase mutants by the non-allosteric enzyme from *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Letters*, 374, 1: 100-104
- Eto K., Sakura H., Yasuda K., Hayakawa T., Kawasaki E. 1994. Cloning of a complete protein-coding sequence of human platelet-type phosphofructokinase isozyme from pancreatic islet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198, 3: 990-998
- Ferreira B.S., Calado C.R., van Keulen F., Fonseca L.P., Cabral J.M., da Fonseca M.M. 2004. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain triggers acetate production to fuel biosynthetic pathways. *Journal of Biotechnology*, 109, 1-2: 159-167
- Friberg S., Mattson S. 1997. On the growth rates of human malignant tumors: implications for medical decision making. *Journal of Surgical Oncology*, 65, 4: 284-297
- Gietz R.D., Woods R.A. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350: 87-96
- Gingras A.C., Raught B., Sonenberg N. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Development*, 15, 7: 807-826
- Globocan: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2012. Lyon, International Agency for Research on Cancer: 1 str. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (maj 2015)
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. Life with 6000 genes. 1996. *Science*, 274, 5287: 546, 563-567
- Guaragnella N., Palermo V., Galli A., Moro L., Mazzone C., Giannattasio S. 2014. The expanding role of yeast in cancer research and diagnosis: insights into the function of the oncosuppressors p53 and BRCA1/2. *FEMS Yeast Research*, 14, 1: 2-16
- Gutteridge J.M. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. 1993. *Free Radical Research Communications*, 19, 3: 141-158.
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2000. Hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 1: 57-70
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674
- Hauf J., Müller S., Zimmermann F.K. 2000. Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 9-10: 688-698
- Heinisch J.J. 1993. Expression of heterologous phosphofructokinase genes in yeast. *Federation of European Biochemical Societies*, 328, 1, 2: 35-40
- Huang L.E. Carrot and stick: HIF- α engages c-Myc in hypoxic adaptation. 2008. *Cell Death and Differentiation*, 15, 4: 672-677
- Keith B., Simon M.C. 2007. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, 129, 3: 465-472

- Kemp R.G., Gunasekera D. 2002. Evolution of the allosteric ligand sites of mammalian phosphofructo-1-kinase. *Biochemistry*, 41, 30: 9426-9430
- Legiša M. 2014. Similarities and differences between cancer and yeast carbohydrate metabolism. V: *Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism*. Piškur J., Compagno C. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 121-140
- Legiša M., Benčina M., Tevž G., Capuder M., Šolar T., Oven D. 2010. Mutated truncated mt-pfkA gene for the synthesis of active shorter fragment of 6-phosphofructo-1-kinase. European Patent EP 2010651 (B1); United States Patent US 7807404 (B2): 38 str.
- Lord P.G., Wheals A.G. 1981. Variability in individual cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 50: 361-376
- Ludovico P., Sousa M.J., Silva M.T., Leão C., Côrte-Real M. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147: 2409-2415
- Madeo F., Fröhlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S.J., Wolf D.H., Fröhlich K.U. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, 145, 4: 757-767
- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. New Jersey, Practice Hall International: 992 str.
- Mlakar T., Legiša M. 2006. Citrate-resistant form of 6-phosphofructo-1-kinase from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7: 4515-4521
- Mumberg D., Müller R., Funk M. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156, 1: 119-122
- NEBcutter. 2003. Hertfordshire, New England BioLabs: 1 str.
<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> (julij 2016)
- Nelson D.L., Cox M.M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York, Freeman and Company: 1216 str.
- OligoEvaluator. 2004. St. Louis, Sigma-Aldrich: 1 str.
<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligo-evaluator.html> (julij 2016)
- Ozcan S., Johnston M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 3: 554-569
- Pao S.S., Paulsen I.T., Saier M.H. Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1: 1-34
- Poorman, R.A., Randolph A., Kemp R.G., Heinrikson R.L. 1984. Evolution of phosphofructokinase-gene duplication and creation of new effector sites. *Nature*, 309: 467-469
- Raben N., Exelbert R., Spiegel R., Sherman J.B., Nakajima H., Plotz P., Heinisch J. 1995. Functional expression of human mutant phosphofructokinase in yeast: genetic defects in French Canadian and Swiss patients with phosphofructokinase deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 56, 1: 131-141

- Reverse complement. 2000. Hudson, Bioinformatics Organization: 1 str.
http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html (junij 2016)
- Romanos M.A., Clare J.J., Scorer C.A. 1992. Foreign expression in yeast. *Yeast*, 8, 6: 432-488
- Roos S., Jansson N., Palmberg I., Säljö K., Powell T.L., Jansson T. 2007. Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *Journal of Physiology*, 582, 1: 449-459
- Šmerc A., Legiša M., Sodja E. 2011. Posttranslational modifications of 6-phosphofructo-1-kinase as an important feature of cancer metabolism. *PLoS ONE*, 6,5: e19645, doi: 10.1371/journal.pone.0019645: 12 str.
- Thevelein J.M., de Winder J.H. 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 33, 5: 904-918
- Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 5930: 1029-1033
- Verstrepen K.J., Iserentant D., Malcorps P., Derdelinckx G., Van Dijck P., Winderickx J., Pretorius I.S., Thevelein J.M., Delvaux F.R. 2004. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends in Biotechnology*, 22, 10: 531-537
- Voet D., Voet J.G. 2004. *Biochemistry*. 3rd ed. Somerset, John Wiley & Sons: 1616 str.
- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A. Jr., Kinzler K.W. 2013. Cancer genome landscapes. *Science*, 339, 6127: 1546-1548
- Wellen K.E., Thompson C.B. 2010. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Molecular Cell*, 40, 2: 323-332
- Yamasaki T., Nakajima H., Kono N., Hotta K., Yamada K., Imai E., Kuwajima M., Noguchi T., Tanaka T., Tarui S. 1991. Structure of the entire human muscle phosphofructokinase-encoding gene: a two promotor system. *Gene*, 104, 2: 277-282
- Yeung S.J., Pan J., Lee M.H. 2008. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis – the seventh hallmark of cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 24: 3981-3999
- Younes M., Lechago L.V., Somoano J.R., Mosharaf M., Lechago J. 1996. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Research*, 56, 5: 1164-1167

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Darji Žgur-Bertok, somentorju prof. dr. Maticu Legiši ter recenzentu prof. dr. Urošu Petroviču za dostopnost, prijaznost, vse koristne komentarje, napotke in razlage.

Saši, za pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela diplomske naloge.

Posebej bi se rada zahvalila svoji družini, za vso podporo in pomoč tekom študija.

Andreju... hvala!

Prijateljem, zaradi katerih mi bodo študijska leta ostala za vedno v lepem spominu.

Fantu Nejcu, za nalezljiv optimizem in srčnost, ter Nejčevi družini, ki se ob uspehih vedno iskreno veseli z mano.

PRILOGE

Priloga A1: Nukleotidno zaporedje nhPFKM v FASTA formatu

```
>phosphofructokinase-M
ATGACCCATGAAGAGCACCATGCAGCCAAAACCCCTGGGGATTGGCAAAGCCATTGCTGTCTTAACCTCTGGTG
GAGATGCCCCAAGGTATGAATGCTGCTGTCAGGGCTGTGGTTCGAGTTGGTATCTTCACCGGTGCCCGTGTCTT
CTTTGTCCATGAGGGTTATCAAGGCCTGGTGGATGGTGGAGATCACATCAAGGAAGCCACCTGGGAGAGCGTT
TCGATGATGCTTCAGCTGGGAGGCACGGTGATTGGAAGTGCCCGGTGCAAGGACTTTCGGGAACGAGAAGGAC
GACTCCGAGCTGCCTACAACCTGGTGAAGCGTGGGATCACCAATCTCTGTGTCATTGGGGGTGATGGCAGCCT
CACTGGGGCTGACACCTTCCGTTCTGAGTGGAGTGACTTGTTGAGTGACCTCCAGAAAGCAGGTAAGATCACA
GATGAGGAGGCTACGAAGTCCAGCTACCTGAACATTGTGGGCCCTGGTTGGGTCAATTGACAATGACTTCTGTG
GCACCGATATGACCATTGGCACTGACTCTGCCCTGCATCGGATCATGGAAATTGTAGATGCCATCACTACCAC
TGCCAGAGCCACCAGAGGACATTTGTGTTAGAAGTAATGGGCCGCCACTGTGGATACCTGGCCCTTGTACC
TCTCTGTCTGTGGGGCCGACTGGGTTTTTATTCCTGAATGTCCACCAGATGACGACTGGGAGGAACACCTTT
GTCGCCGACTCAGCGAGACAAGGACCCGTGGTTCTCGTCTCAACATCATCATTGTGGCTGAGGGTGCAATTGA
CAAGAATGGAAAACCAATCACCTCAGAAGACATCAAGAATCTGGTGGTTAAGCGTCTGGGATATGACACCCGG
GTTACTGTCTTGGGGCATGTGCAGAGGGGTGGGACGCCATCAGCCTTTGACAGAATTCTGGGCAGCAGGATGG
GTGTGGAAGCAGTGATGGCACTTTTGGAGGGGACCCCAGATACCCAGCCTGTGTAGTGAGCCTCTCTGGTAA
CCAGGCTGTGCGCCTGCCCCTCATGGAATGTGTCCAGGTGACCAAAGATGTGACCAAGGCCATGGATGAGAAG
AAATTTGACGAAGCCCTGAAGCTGAGAGGCCGGAGCTTCATGAACAAC TGGGAGGTGTACAAGCTTCTAGCTC
ATGTCAGACCCCCGGTATCTAAGAGTGGTTCGCACACAGTGGCTGTGATGAACGTGGGGGCTCCGGCTGCAGG
CATGAATGCTGCTGTTGCTCCACTGTGAGGATTGGCCTTATCCAGGGCAACCGAGTGCTCGTTGTCCATGAT
GGTTTTCGAGGGCCTGGCCAAGGGGCGAGATAGAGGAAGCTGGCTGGAGCTATGTTGGGGGCTGGACTGGCCAAG
GTGGCTCTAAACTTGGGACTAAAAGGACTCTACCCAAGAAGAGCTTTGAACAGATCAGTGCCAATATAACTAA
GTTTAACATTTCAGGGCCTTGTGTCATCATTGGGGGCTTTGAGGCTTACACAGGGGGCCTGGAAC TGATGGAGGGC
AGGAAGCAGTTTGATGAGCTCTGCATCCCATTTGTGGTCATTTCCTGCTACAGTCTCCAACAATGTCCCTGGCT
CAGACTTCAGCGTTGGGGCTGACACAGCACTCAATACTATCTGCACAACCTGTGACCGCATCAAGCAGTCAGC
AGCTGGCACCAAGCGTCGGGTGTTTATCATTGAGACTATGGGTGGCTACTGTGGCTACCTGGCTACCATGGCT
GGACTGGCAGCTGGGGCCGATGCTGCCTACATTTTTTGAGGAGCCCTTCACCATTTCGAGACCTGCAGGCAAATG
TTGAACATCTGGTGCAAAAAGATGAAAACAAC TGTGAAAAGGGGCTTGGTGTTAAGGAATGAAAAGTGCAATGA
GAACTATACCACTGACTTCATTTTCAACCTGTACTCTGAGGAGGGGAAGGGCATCTTCGACAGCAGGAAGAAT
GTGCTTGGTCACATGCAGCAGGGTGGGAGCCCAACCCATTTGATAGGAATTTTGCCACTAAGATGGGCGCCA
AGGCTATGAACTGGATGTCTGGGAAAATCAAAGAGAGTTACCGTAATGGGCGGATCTTTGCCAATACTCCAGA
TTCGGGCTGTGTTCTGGGGATGCGTAAGAGGGCTCTGGTCTTCCAACCAGTGGCTGAGCTGAAGGACCAGACA
GATTTTGAGCATCGAATCCCCAAGGAACAGTGGTGGCTGAAACTGAGGCCCATCCTCAAAATCCTAGCCAAGT
ACGAGATTGACTTGGACACTTCAGACCATGCCACCTGGAGCACATCACCCGGAAGCGGTCCGGGGAAGCGGC
CGTCTAA
```