

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nika TURK

IZRAŽANJE MODIFICIRANEGA GENA *pfkA* GLIVE
Aspergillus niger V KVASOVKI *Saccharomyces cerevisiae*

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nika TURK

IZRAŽANJE MODIFICIRANEGA GENA *pfkA* GLIVE *Aspergillus niger* V KVASOVKI *Saccharomyces cerevisiae*

DIPLOMSKO DELO

EXPRESSION OF A MODIFIED GENE *pfkA* OF FUNGI *Aspergillus niger* IN YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

GRADUATION THESIS

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Raziskovalni del diplome je bil opravljen na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, v laboratoriju za biotehnologijo.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Darja Žgur Bertok, za somentorja prof. dr. Matic Legiša ter za recenzenta prof. dr. Hrvoje Petković.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Somentor: prof. dr. Matic Legiša

Recenzent: prof. dr. Hrvoje Petković

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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. Hrvoje PETKOVIĆ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga 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.

Nika Turk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.6:579.25:582.282.23:577.2(043)=163.3
KG	glikoliza/ 6-fosfofrukto-1-kinaza/ kratek fragment/ <i>Aspergillus niger</i> / inhibicija/ citrat/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / kvasni plazmidi/ transformacija kvasovk
AV	TURK, Nika
SA	ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica) /LEGIŠA, Matic (somentor) /PETKOVIĆ, Hrvoje (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2015
IN	IZRAŽANJE MODIFICIRANEGA GENA <i>pfkA</i> GLIVE <i>Aspergillus niger</i> V KVASOVKI <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 76 str., 53 pregl., 27 sl., 61 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	

Encim 6-fosfofrukto-1-kinaza (PFK 1) je osrednji regulatorni encim glikolize in je kot alosterični encim inhibiran s citratom in ATP. Inhibicija prepreči prekomeren pretok metabolitov preko glikolize, ko je v celici dovolj intermediatov Krebsovega cikla in ni potrebe po trošenju kemijoško vezane energije. V celicah glive *Aspergillus niger* prihaja do spontane dvostopenjske posttranslacijske modifikacije nativnega 85 kDa PFK. Pri tem nastane visoko aktiven kratek 49 kDa fragment PFK1, ki je odporen proti inhibiciji s citratom, kar omogoči neoviran pretok metabolitov preko glikolize. Z dosedanjimi raziskavami so uspeli sintetizirati visoko aktivne modificirane fragmente PFK1 v glivi *Aspergillus niger* in *A. tereus*, in sicer tako, da so v celice vnesli skrajšan modificiran gen *pfkA*. Transformirane celice so hitreje izločale citronske oziroma itakonsko kislino. V diplomski nalogi smo želeli izraziti modificiran gen *pfkA* v kvasovki *S. cerevisiae* z izbitimi lastnimi geni *pfkA*. Da bi se sintetiziral aktiven, dimeren holoencim pa je potrebna optimalna koncentracija monomer. Osredotočili smo se na izbiro primernega promotorja gena in plazmid, ki bi omogočil zadostno in primerno izražanje podenot encima. Zadostna koncentracija monomer bi omogočila spontano sestavo dimernih holoencimov, s tem njihovo aktivnost in vklop v metabolizem kvasovke. Za dosego cilja smo uporabili klasične molekularne metode: verižno reakcijo s polimerazo in njene različice, izolacijo plazmidov, restrikcijo, ligacijo, transformacijo kompetentnih celic in agarozno gelsko elektroforezo. Ali se je kratek fragment vklopil v metabolizem kvasovk smo testirali z rastjo transformant na gojiščih z različnimi sladkorji (glukozo, maltozo in fruktozo). Prišli smo do zaključka, da izbrana plazmida v kombinaciji s hitro presnavljajočima sladkorjem (glukozo, fruktozo) povzročita premočno izražanje kratkega fragmenta. Posledica je prevelik metabolni stres v celici, ki lahko vodi tudi do apoptoze. Transformante, ki so vsebovale kratek fragment so rasle le na maltozi. Sklepamo, da se razlog za to skriva v njeni dimerni strukturi, ki upočasni sproščanje glukoze v glikolizo in s tem metabolni stres.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 602.6:579.25:582.282.23:577.2(043) =163.3
CX	glycolysis/ 6-phosphofructo-1-kinase/ short fragment/ <i>Aspergillus niger</i> / inhibition/ citrate/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / yeast plasmids/ transformation of yeast
AU	TURK, Nika
AA	ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor) /LEGIŠA, Matic (co-advisor) /PETKOVIĆ, Hrvoje (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2015
TI	EXPRESION OF A MODIFIED GENE <i>pfkA</i> OF FUNGI <i>Aspergillus niger</i> IN YEAST <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DT	Diplomsko delo (University studies)
NO	XIII, 76 p., 53 tab., 27 fig., 61 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	

Enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK 1) is a central regulatory enzyme of glycolysis and is restrained with citrate and ATP as an allosteric enzyme. Inhibition makes excessive flux of metabolites through glycolysis impossible; when enough of intermediates of citric acid cycle are in a cell, there is no need for spending chemically bound energy. In cells of fungus *Aspergillus niger* a spontaneous two-stage posttranslational modification of native 85 kDa PFK occurs. This results in formation of highly active short 49 kDa fragment that is resistant to inhibition with citrate, which allows unrestrained flux of metabolites through glycolysis. With previous researches a highly active modified fragments of PFK 1 were synthesized in fungus *Aspergillus niger* and *A. terreus* by inserting shortened modified gene *pfkA* in fungal cells. Transformed cells secreted citric and itaconic acid faster. In graduation thesis we wanted to express modified gene *pfkA* in yeast *S. cerevisiae* with its *pfkA* genes knocked out. That an active, tetrameric holoenzyme would be synthesized an optimal concentration of monomers is necessary. We focused on choosing an appropriate gene promotor and plasmid, that would enable sufficient and appropriate expression of enzymes subunits. Sufficient concentration of monomers would enable spontaneous composition of dimeric holoenzymes and thus their activity and integration in metabolism of yeast as well. In order to achieve this goal we used classical molecular procedures: polymerase chain reaction and its versions, plasmid isolation, restriction, ligation, transformation of competent cells and agarose gel electrophoresis. In order to check if short fragment fits into yeasts metabolism, we tested the growth of transformants on medium containing different sugars (glucose, fructose and maltose). We came to the conclusion that the selected plasmid in combination with rapid metabolising sugars (glucose, fructose) causes over-expression of a short fragment. The result is metabolic stress which the cell is not able to handle leading to apoptosis in some cases. Transformants that contained short fragment grew only on maltose. We conclude that the reason for this lies in its dimeric structure that slows the release of glucose into glycolysis and with this metabolic stress.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK.....	XI

1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GLIKOLIZA DEL PRIMARNEGA METABOLIZMA	3
2.2 REGULACIJA PRIMARNEGA METABOLIZMA NA NIVOJU GLIKOLIZE.....	4
2.2.1 Faze glikolize.....	4
2.2.2 Raznovrstnost glikolizne poti	5
2.2.3 EMP pot in vpleteni encimi	5
2.2.3.1 Oksidativna stopnja	5
2.2.3.2 Reduktivna stopnja	7
2.3 PFK GLAVNI REGULATORNI ENCIM.....	8
2.3.1 Dejavnost encima.....	8
2.3.2 Evolucija encima.....	9
2.3.3 Zgradba encima	9
2.3.4 Kinetične lastnosti PFK 1	10
2.4 KRATEK FRAGMENT PFK1	11
2.4.1 Odkritje kratkega fragmenta	11
2.4.2 Posttranslacijske modifikacije PFK1 pri glivi <i>A. niger</i>	11
2.4.3 Kinetične lastnosti fragmenta PFK1 glive <i>A. niger</i>	12
2.4.4 Posttranslacijske modifikacije PFK1 pri drugih organizmih.....	13
2.4.5 Posttranslacijske modifikacije PFKM pri raku.....	14
2.4.6 Priprava visoko aktivnega kratkega fragmenta PFK1 iz modificiranega gena <i>pfkA</i>	16
2.5 IZBOR ORGANIZMA ZA IZRAŽANJE MODIFICIRANEGA PROTEINA.....	17
2.6 KVASOVKA <i>S.cerevisiae</i> SEV HD114-8D	17

2.7	IZBOR VEKTORJEV ZA TRANSFORMACIJO KVASOVK.....	18
3	MATERIALI IN METODE	21
3.1	NAMNOŽITEV BAKTERIJE <i>E.coli</i> SEV DH5 α ZA IZOLACIJO PLAZMIDNEGA VEKTORJA p416GPD IN p426GPD.....	21
3.2	IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA p416GPD IN p426GPD IZ BAKTERIJE <i>E.coli</i> SEV DH5 α	21
3.3	NAMNOŽITEV VKLJUČKA <i>TE260</i> IN NATIVNEGA <i>npfkA</i> S PCR ZA LIGACIJO V VEKTOR p416GPD IN VEKTOR p426GPD	21
3.3.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	21
3.3.2	Namnožitev vključka <i>TE260</i>	22
3.3.3	Namnožitev nativnega <i>npfkA</i>	24
3.4	PREVERJANJE PRODUKTA PCR Z AGAROZNO GELSKO ELEKTROFOREZO	27
3.4.1	Agarozna gelska elektroforeza	27
3.4.2	Priprava elektroforeznega gela	27
3.4.3	Izvedba elektroforeze	28
3.4.4	Obdelava elektroforeznega gela	28
3.5	ČIŠČENJE PRODUKTA PCR	28
3.6	RESTRIKCIJA VKLJUČKA <i>TE260</i> , <i>npfkA</i> IN EKSPRESIJSKIH VEKTORJEV	28
3.6.1	Restrikcija vključka <i>TE260</i> , <i>npfkA</i> in vektorja za izražanje genov p416GPD ...	28
3.6.2	Restrikcija vključka <i>TE260</i> , <i>npfkA</i> in vektorja za izražanje genov p426GPD ...	30
3.6.3	Preverjanje uspešnosti restrikcije z agarozno gelsko elektroforezo	31
3.6.4	Čiščenje DNK vključka <i>TE260</i> , <i>npfkA</i> in vektorja iz elektroforeznega gela.....	31
3.7	LIGACIJA VKLJUČKA V VEKTOR	32
3.7.1	Ligacija vključka <i>TE260</i> v vektor p416GPD	32
3.7.2	Ligacija vključka <i>npfkA</i> v vektor p416GPD	33
3.7.3	Ligacija vključka <i>TE260</i> v vektor p426GPD	34
3.7.4	Ligacija vključka <i>npfkA</i> v vektor p426GPD	34
3.8	TRANSFORMACIJA <i>E.coli</i> DH5 α	35
3.8.1	Bakterijska transformacija in kompetenca.....	35
3.8.2	Izvedba transformacije	35
3.8.3	Pregled plošč s transformantami	36
3.9	POTRDITEV KONSTRUKTOV	36
3.9.1	Izvedba PCR za potrditev konstruktov v transformantah.....	36
3.10	NAMNOŽITEV TRANSFORMANT ZA SEKVENCIRANJE.....	40
3.11	IZOLACIJA REKOMBINANTNIH PLAZMIDOV ZA SEKVENCIRANJE.....	41

3.12 PRIPRAVA GOJIŠČ ZA KVASOVKE <i>S. cerevisiae</i> SEV HD114 -8D (ZA VNOS KONSTRUKTOV)	41
3.12.1 Priprava trdnega gojišča YEPGE.....	41
3.12.2 Priprava tekočega gojišča YEPGE	41
3.12.3 Priprava gojišča Sc-ura, GE za gojenje izhodnega seva.....	42
3.12.4 Priprava gojišča Sc-ura z drugimi viri ogljika za testiranje transformant ...	42
3.12.4.1 Priprava založne raztopine amon sulfata	43
3.13 NACEPITEV KVASOVKE <i>S. cerevisiae</i>	44
3.13.1 Nacepitev na trdno gojišče.....	44
3.13.2 Nacepitev v tekoče gojišče	44
3.14 TRANSFORMACIJA KVASOVKE <i>S. cerevisiae</i>.....	44
3.14.1 Izolacija rekombinantnih plazmidov.....	44
3.14.2 Priprava reagentov za transformacijo	44
3.14.2.1 Priprava 1M raztopine litijevega acetata.....	44
3.14.2.2 Priprava 0,15 M raztopine polietilen glikola	44
3.14.3 Transformacija.....	45
3.14.4 Preverjanje uspešnosti transformacije s PCR na osnovi kolonije	46
3.15 GOJENJE KVASOVKE <i>S. cerevisiae</i> NA SELEKCIJSKIH GOJIŠČIH	48
4 REZULTATI.....	50
4.1 KLONIRANJE GENA ZA KRATKI FRAGMENT IN NATIVNI ENCIM PFK1 GLIVE <i>A. niger</i>.....	50
4.2 RESTRIKCIJA VKLJUČKOV IN VEKTORJEV ZA IZRAŽANJE GENOV	53
4.3 LIGACIJA IN TRANSFORMACIJA V <i>E. coli</i>	54
4.4 PLAZMIDNA IZOLACIJA IN PCR ZA POTRDITEV KONSTRUKTOV	54
4.5 POTRDITEV KONSTRUKTOV S SEKVENCIRANJEM	56
4.6 TRANSFORMACIJA PLAZMIDOV S KONSTRUKTI V KVASOVKO <i>S. cerevisiae</i> SEV HD114-8D	58
4.7 TESTIRANJE KOLONIJ TRANSFORMANT <i>S. cerevisiae</i> S POMOČJO PCR	59
4.8 PRIPRAVA TRAJNE KULTURE	60
4.9 KONTROLA RASTI TRANSFORMANT NA RAZLIČNIH GOJIŠČIH	61
5 RAZPRAVA.....	64
6 SKLEPI	69
7 POVZETEK.....	70
8 VIRI	72
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka <i>TE260</i> za ligacijo v vektor p416GPD.....	23
Preglednica 2:	Temperaturni program PCR reakcije vključka <i>TE260</i> za ligacijo v vektor p416GPD.....	23
Preglednica 3:	Zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnožitev <i>TE260</i> z restrikc. mestoma za encima <i>XbaI</i> , <i>BamHI</i> (za vključitev v vektor p416GPD)	23
Preglednica 4:	Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka <i>TE260</i> za ligacijo v vektor p426GPD.....	24
Preglednica 5:	Temperaturni program PCR reakcije vključka <i>TE260</i> za ligacijo v vektor p426GPD.....	24
Preglednica 6:	Zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnožitev <i>TE260</i> z restrikcijskima mestoma za encima <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> (za vključitev v vektor p426GPD).....	24
Preglednica 7:	Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka <i>npfkA</i> za ligacijo v vektor p416GPD.....	25
Preglednica 8:	Temperaturni program PCR reakcije vključka <i>npfkA</i> za ligacijo v vektor p416GPD	25
Preglednica 9:	Zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnožitev <i>npfkA</i> z restrikcijskima mestoma za encima <i>XbaI</i> , <i>BamHI</i> (za vključitev v vektor p416GPD)	26
Preglednica 10:	Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka <i>npfkA</i> za ligacijo v vektor p426GPD	26
Preglednica 11:	Temperaturni program PCR reakcije vključka <i>npfkA</i> za ligacijo v vektor p426GPD	26
Preglednica 12:	Zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnožitev <i>npfkA</i> z restrikcijskima mestoma za encima <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> (za vključitev v vektor p426GPD).....	27
Preglednica 13:	Sestava restrikcijske mešanice za restrikcijo pomnožka <i>TE260</i> za ligacijo v vektor p416GPD.....	29
Preglednica 14:	Sestava restrikcijske mešanice za restrikcijo pomnožka <i>npfkA</i> za ligacijo v vektor p416GPD.....	29
Preglednica 15:	Sestava restrikcijske mešanice za odpiranje vektorja p416GPD.....	29
Preglednica 16:	Sestava restrikcijske mešanice za restrikcijo pomnožka <i>TE260</i> za ligacijo v vektor p426GPD.....	30
Preglednica 17:	Sestava restrikcijske mešanice za restrikcijo pomnožka <i>npfkA</i> za ligacijo v vektor p426GPD.....	30
Preglednica 18:	Sestava restrikcijske mešanice za odpiranje vektorja p426GPD.....	31
Preglednica 19:	Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka <i>TE260</i> v vektor p416GPD....	32
Preglednica 20:	Sestava ligacijske mešanice za kontrolno ligacijo p416GPD (vključek <i>TE260</i>)..	32
Preglednica 21:	Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka <i>npfkA</i> v vektor p416GPD	33
Preglednica 22:	Sestava ligacijske mešanice za kontrolno ligacijo p416GPD (vključek <i>npfkA</i>)	33

Preglednica 23:	Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka <i>TE260</i> v vektor p426GPD....	34
Preglednica 24:	Sestava ligacijske mešanice za kontrolno ligacijo p426GPD (vključek <i>TE260</i>)....	34
Preglednica 25:	Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka <i>npfkA</i> v vektor p426GPD	35
Preglednica 26:	Sestava ligacijske mešanice za kontrolno ligacijo p426GPD (vključek <i>npfkA</i>)	35
Preglednica 27:	Sestava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje vsebnosti konstrukta (vključka <i>TE260</i> v vektorju p416GPD).....	37
Preglednica 28:	Temperaturni program PCR (potrditev vključka <i>TE260</i> v vektorju p416GPD)	37
Preglednica 29:	Sestava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje vsebnosti konstrukta (vključek <i>npfkA</i> v vektorju p416GPD).....	38
Preglednica 30:	Temperaturni program PCR (potrditev vključka <i>npfkA</i> v vektorju p416GPD).	38
Preglednica 31:	Sestava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje vsebnosti konstrukta (vključek <i>TE260</i> v vektorju p426GPD).....	39
Preglednica 32:	Temperaturni program PCR (potrditev vključka <i>TE260</i> v vektorju p426GPD)	39
Preglednica 33:	Sestava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje vsebnosti konstrukta (vključek <i>npfkA</i> v vektorju p426GPD).....	40
Preglednica 34:	Temperaturni program PCR (potrditev vključka <i>npfkA</i> v vektorju p426GPD).	40
Preglednica 35:	Sestava trdnega gojišča YEPGE (za 250 ml oz. 10 plošč)	41
Preglednica 36:	Sestava tekočega gojišča YEPGE (za 100 ml)	42
Preglednica 37:	Sestava gojišča Sc-ura, GE (za 100 ml)	42
Preglednica 38:	Sestava gojišča Sc-ura, glukoza; Sc-ura, fruktoza; Sc-ura, maltoza (za 100 ml) ..	43
Preglednica 39:	Sestava založne razt. za Sc-ura, glukoza (za 100 ml).....	43
Preglednica 40:	Sestava transformacijske mešanice	45
Preglednica 41:	Sestava kontrolne transformacijske mešanice	46
Preglednica 42:	Sestava reakcijske mešanice za PCR na osnovi kolonije	47
Preglednica 43:	Par uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje posameznega konstrukta v vektorju p416GPD oz. p426GPD	47
Preglednica 44:	Temperaturni program PCR reakcije za preverjanje uspešnosti transformacije	48
Preglednica 45:	Oštevilčenje konstrukta na gojitveni plošči.....	49
Preglednica 46:	Začetni oligonukleotidi uporabljeni za namnoževanje skrajšanega in nativnega gena <i>npfkA</i>	50
Preglednica 47:	Zaporedja začetnih oligonukleotidov s prilagojenimi restriktijskimi mesti za ligacijo v plazmid p416GPD	50
Preglednica 48:	Zaporedja začetnih oligonukleotidov s prilagojenimi restriktijskimi mesti za ligacijo v plazmid p426GPD	51
Preglednica 49:	Zaporedje notranjega smernega začetnega oligonukleotida uporabljenega za sekvenciranje gena <i>npfkA</i>	57

Preglednica 50:	Zaporedna številka kolonije transformant na gojitveni plošči LBA v katerih smo s sekvenciranjem potrdili ustreznost vnešenega konstrukta	57
Preglednica 51:	Založne koncentracije plazmidov s konstruktami izmerjene z Nanodrop spektrofotometrom	57
Preglednica 52:	Število transformant seva HD114 – 8D na gojišču Sc-ura, GE po enotedenski inkubaciji.....	58
Preglednica 53:	Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri PCR na osnovi kolonije za pomnoževanje konstruktov iz kvasovk, ter zaporedje kolonij na transformacijski plošči Sc-ura, GE.....	59

KAZALO SLIK

Slika 1:	Stopnje katabolizma in anabolizma (prirejeno po Boyer, 2005: 371)	4
Slika 2:	Fosforilacija glukoze v glukozo-6-P s pomočjo ATP. Negativen naboj jo zadrži v celici (Garret in Grisham, 2010: 539).....	6
Slika 3:	EMP pot; zaporedje encimskih reakcij pri konverziji glukoze v piruvat in nadaljnji pretvorbi v fermentativne produkte (Brock in sod., 1994: 101)	7
Slika 4:	Piruvat, ki nastane med glikolizo se lahko porabi na različne načine. Aerobi ga pretvorijo do acetil-CoA, ki se oksidira v ciklu TCA. Pri omejenem kisiku pride do konverzije piruvata v mlečno kislino ali etanol in CO ₂ (Garret in Grisham, 2010: 537)	8
Slika 5:	3D struktura ene od štirih podenot encima fosfofruktokinaze z molekulo ADP (oranžna) in fruktozo-6-fosfat (rdeča) (Garret in Grisham, 2010: 542).....	10
Slika 6:	Plazmidna mapa p416 GPD (Addgene, 2014a)	18
Slika 7:	Plazmidna mapa p426 GPD (Addgene, 2014b).....	19
Slika 8:	Shematično prikazan potek PCR reakcije (Potočnik in Repnik, 2014: 9)	22
Slika 9:	Ločitev molekul DNK na agaroznem gelu (Potočnik in Repnik, 2014: 12).....	27
Slika 10:	Shema nacepitve transformant na LBA ploščo.....	36
Slika 11:	Način nacepitve kvasovk s posameznim konstruktom na seleksijska gojišča.....	48
Slika 12:	Gelska elektroforeza pomnoženega vključka <i>TE260</i> za ligacijo v plazmid p416GPD, DNK velikostna lestvica: Lambda DNA / <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker (pričakovana velikost na gelu 1369 bp).....	51
Slika 13:	Gelska elektroforeza pomnoženega vključka <i>npfkA</i> za ligacijo v plazmid p416GPD, DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 2454 bp).....	52
Slika 14:	Gelska elektroforeza pomnoženega vključka <i>TE260</i> za ligacijo v plazmid p426GPD, DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 1369 bp).....	52
Slika 15:	Gelska elektroforeza pomnoženega vključka <i>npfkA</i> za ligacijo v plazmid p426GPD, DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 2454 bp).....	53
Slika 16:	Gelska elektroforeza p416GPD po restrikciji z <i>XbaI</i> ter <i>Bam HI</i> ; DNK velikostna lestvica: Lambda DNA / <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker (pričakovana velikost na gelu 5,8 kbp).....	53
Slika 17:	Gelska elektroforeza p426GPD po restrikciji z <i>BamHI</i> ter <i>HindIII</i> ; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 6,6 kbp).....	54
Slika 18:	Gelska elektroforeza vključka <i>TE260</i> v plazmidu p416GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 1,4 kbp)	55
Slika 19:	Gelska elektroforeza vključka <i>npfkA</i> v plazmidu p416GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 2,4 kbp)	55
Slika 20:	Gelska elektroforeza vključka <i>TE260</i> v plazmidu p426GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 1,4 kbp)	56
Slika 21:	Gelska elektroforeza vključka <i>npfkA</i> v plazmidu p426GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 2,4 kbp)	56

Slika 22:	Rast transformant seva HD114–8D z vstavljenim konstruktom: 1= <i>npfkA</i> v plazmidu p416GPD, 2= <i>npfkA</i> v plazmidu p426GPD, 3= <i>TE260</i> v plazmidu p416GPD, 4= <i>TE260</i> v plazmidu p426GPD na gojišču Sc-ura, GE.....	59
Slika 23:	Gelska elektroforeza; s PCR na osnovi kolonije preverjamo velikost vnešenih konstruktov v transformiranih kvasovkah. Lise 1, 2, 3 vsebujejo vključek <i>TE260</i> v p416GPD (kolonije 1, 2, 3). Lise 4, 5, 6 vsebujejo isti vključek v p426GPD (kolonije 7, 8, 9) (pričakovana velikost na gelu 1,4 kbp). Kontroli 1 in 2 sta vključek <i>TE260</i> v izoliranem plazmidu p416GPD oz. p426GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder..	60
Slika 24:	Gelska elektroforeza; s PCR na osnovi kolonije preverjamo velikost vnešenih konstruktov v transformiranih kvasovkah. Lise 1, 2, 3 vsebujejo vključek <i>npfkA</i> v p416GPD (kolonije 4, 5, 6). Lise 4, 5, 6 vsebujejo isti vključek v p426GPD (kolonije 10, 11, 12) (pričakovana velikost na gelu 2,4 kbp). Kontroli 1 in 2 sta vključek <i>npfkA</i> v izoliranem plazmidu p416GPD oz. p426GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder..	60
Slika 25:	Rast transformant seva HD114–8D z vstavljenim konstruktom: 1= <i>npfkA</i> v plazmidu p416GPD, 2= <i>npfkA</i> v plazmidu p426GPD, 3= <i>TE260</i> v plazmidu p416GPD, 4= <i>TE260</i> v plazmidu p426GPD na gojišču Sc-ura, glukoza.....	61
Slika 26:	Rast transformant seva HD114–8D z vstavljenim konstruktom: 1= <i>npfkA</i> v plazmidu p416GPD, 2= <i>npfkA</i> v plazmidu p426GPD, 3= <i>TE260</i> v plazmidu p416GPD, 4= <i>TE260</i> v plazmidu p426GPD na gojišču Sc-ura, fruktoza.....	62
Slika 27:	Rast transformant seva HD114–8D z vstavljenim konstruktom: 1= <i>npfkA</i> v plazmidu p416GPD, 2= <i>npfkA</i> v plazmidu p426GPD, 3= <i>TE260</i> v plazmidu p416GPD, 4= <i>TE260</i> v plazmidu p426GPD na gojišču Sc-ura, maltoza.....	62

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Acetil-CoA	acetil koencim A
AK	aminokislina
Amp	ampicilin
bp	bazni par
CCK	cikel citronske kisline oz. Krebsov cikel
cDNK	komplementarna DNK (ang. complementary DNA)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EMP	Embden-Meyerhof-Parnasova pot glikolize
FADH ₂	flavin adenin dinukleotid (sprejemnik elektronov); reducirana oblika FAD
g	težnostni pospešek
kbp	kilo baznih parov (1000 baznih parov)
LB	gojišče Luria-Bertani
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat
MQ	destilirana, deionizirana voda
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (koencim vključen v redoks reakcije; NAD ⁺ je reducirana oblika koencima)
OD	optična gostota (ang. optical density)
OH	ogljikovi hidrati
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PEG	polietilen glikol
PFK1	6-fosfofrukto-1-kinaza
PKA	proteinska kinaza A
PPF	pot pentoze fosfata
ROS	reakтивne kisikove spojine (ang. reactive oxygen species)
rpm	obratov na minuto (ang. rotations per minute)
SDS	sodium dodecil sulfat
ssDNK	enoverižna DNK (ang. single stranded DNA)
Taq POL.	toplotočno stabilna polimeraza pridobljena iz termofilnih arhej <i>Thermus aquaticus</i>
TAE pufer	pufer iz mešanice tris-hidroksimetil-aminometana, ocetne kisline in EDTA
TE pufer	pufer iz tris in EDTA
TRIS	tris hidroksimetil aminometan
YPEGE	kvasni ekstrakt z dodanim peptonom, glicerolom in etanolom (ang. yeast extract with peptone, ethanol and glycerol)

1 UVOD

Svet mikrobov in človek sta prepletena vse od začetka našega obstoja. Mikrobi so del naše mikroflore, nas ohranajo zdrave in nas hkrati silijo v konstanten boj z njimi. Gradivo naše zunanjje okolje s tem, ko prispevajo h kroženju elementov v naravi in nam omogočajo pridobivanje zdravil, hormonov, hrane in pijače.

Procesi kvarjenja hrane, fermentacije in razvoja bolezni so do 18. stoletja veljali za bolj ali manj spontane fenomene. Percepциja je izhajala še iz antičnega prepričanja, da se lahko novo življenje ustvari spontano iz nežive materije. Le redki naturalisti so v tistem obdobju zagovarjali tezo, da se življenje ne more spontano generirati iz neživega. Spor je dokončno rešil pionir tovrstnega raziskovanja francoski kemik in mikrobiolog Louis Pasteur. S preprostimi poskusi je utišal zagovornike spontane generacije in dokazal obstoj mikroorganizmov. Pojasnil, da mikroorganizmi povzročajo različne fermentacije in bolezni. Položil je temelje sterilizacije in aseptičnih tehnik. Kljub mnogim odkritjem in raziskavam, ki jih je o svojem delu predstavil širši javnosti, so medicinske ustanove nerade sprejele njegovo teorijo o mikrobnih povzročiteljih bolezni. S preučevanjem vraničnega prisada sta s Kochom tlakovala začetke medicinske mikrobiologije. S pripravo prvih cepiv proti antraksu in steklini je odprl vrata tudi preventivni medicini. Pasteur je bil izreden opazovalec narave in ljudem v svojem okolju je ponudil številne preproste rešitve v boju z mikroorganizmi. Njegovi prispevki v skupno zakladnico znanja so neprecenljivi. Nekoč je dejal: »Ni je take stvari, kot je čista in aplikativna znanost. Je le znanost in aplikacija znanosti« (Ulmann, 2014). S to miselnostjo smo pristopili tudi k izvedbi te diplomske naloge.

Študij glikolize, kot del primarnega metabolizma spada v t. i. bazično znanost. Tovrstna odkritja v osnovi nimajo neposredne uporabne vrednosti, vendar so nujna za poglobljeno razumevanje delovanja nekega organizma. Želja mnogih sodobnih raziskovalcev je, da bi njihovo delo dobilo uporabno vrednost. Stremijo k povečanju izkoristkov pri pridobivanju surovin s pomočjo mikroorganizmov, želijo pojasniti mehanizme razvoja določenih bolezni, pridobiti nova učinkovitejša zdravila ...

Danes se raziskave encimov glikolize usmerjajo predvsem na področje medicine – vloga glikolize pri razvoju nevrodgenerativnih bolezni ter rakavih obolenj. Še vedno pa ostaja zaradi industrijskega pomena aktualen študij glikolitičnih encimov za povečanje doprinosov številnih mikrobnih proizvodov kot sta npr. proizvodnja mlečne kisline in etanola.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Encim 6-fosfofrukto-1-kinaza (PFK1) je osrednji regulatorni encim glikolize in je kot alosterični encim inhibiran s citratom in ATP. Inhibicija prepreči prekomeren pretok metabolitov preko glikolize, ko je v celici dovolj intermediatov Krebsovega cikla in ni potrebe po trošenju kemijsko vezane energije.

V celicah glive *Aspergillus niger* prihaja do spontane dvostopenjske posttranslacijske modifikacije nativnega 85 kDa PFK1. Pri tem nastane visoko aktiven kratek 49 kDa

fragment PFK1, ki je odporen proti inhibiciji s citratom, kar omogoči neoviran pretok metabolitov preko glikolize (Legiša in Mlakar, 2006).

Z dosedanjimi raziskavami so uspeli dokazati, da transformante glive *A. niger* in *A. terreus*, v katere so vnesli skrajšan modificiran gen *mt-pfkA*, lahko sintetizirajo visoko aktivne modificirane fragmente PFK1. Transformirane celice so hitreje izločale citronsko (Capuder in sod., 2009) oziroma itakonsko kislino (Tevž in sod., 2010).

1.1 CILJI RAZISKOVANJA

V diplomski nalogi želimo izraziti modificiran gen *pfkA* iz glive *A. niger* v kvasovki *S. cerevisiae* z izbitimi lastnimi geni *pfkA*. Da bi se sintetiziral aktiven, dimeren holoencim pa je potrebna optimalna koncentracija monomer.

Povečano koncentracijo monomer želimo doseči z izbiro primerenega promotorja gena in plazmida, ki bi omogočila zadostno ter primerno izražanje podenot encima. Zadostna koncentracija monomer bi omogočila sestavo dimernih holoencimov, s tem njihovo aktivnost in vklop v metabolizem kvasovke.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Z izbiro ustreznega promotorja in plazmida bo v kvasovki *S. cerevisiae* z izbitimi lastnimi geni *pfkA* prišlo do zadostnega izražanja monomer za spontano združevanje v funkcionalen holoencim in vključitev v metabolizem. Pričakujemo, da bodo transformante z aktivnim modificiranim encimom PFK1 na določenih sladkorjih rasle bolje kot kvasovke z nativnim encimom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIKOLIZA DEL PRIMARNEGA METABOLIZMA

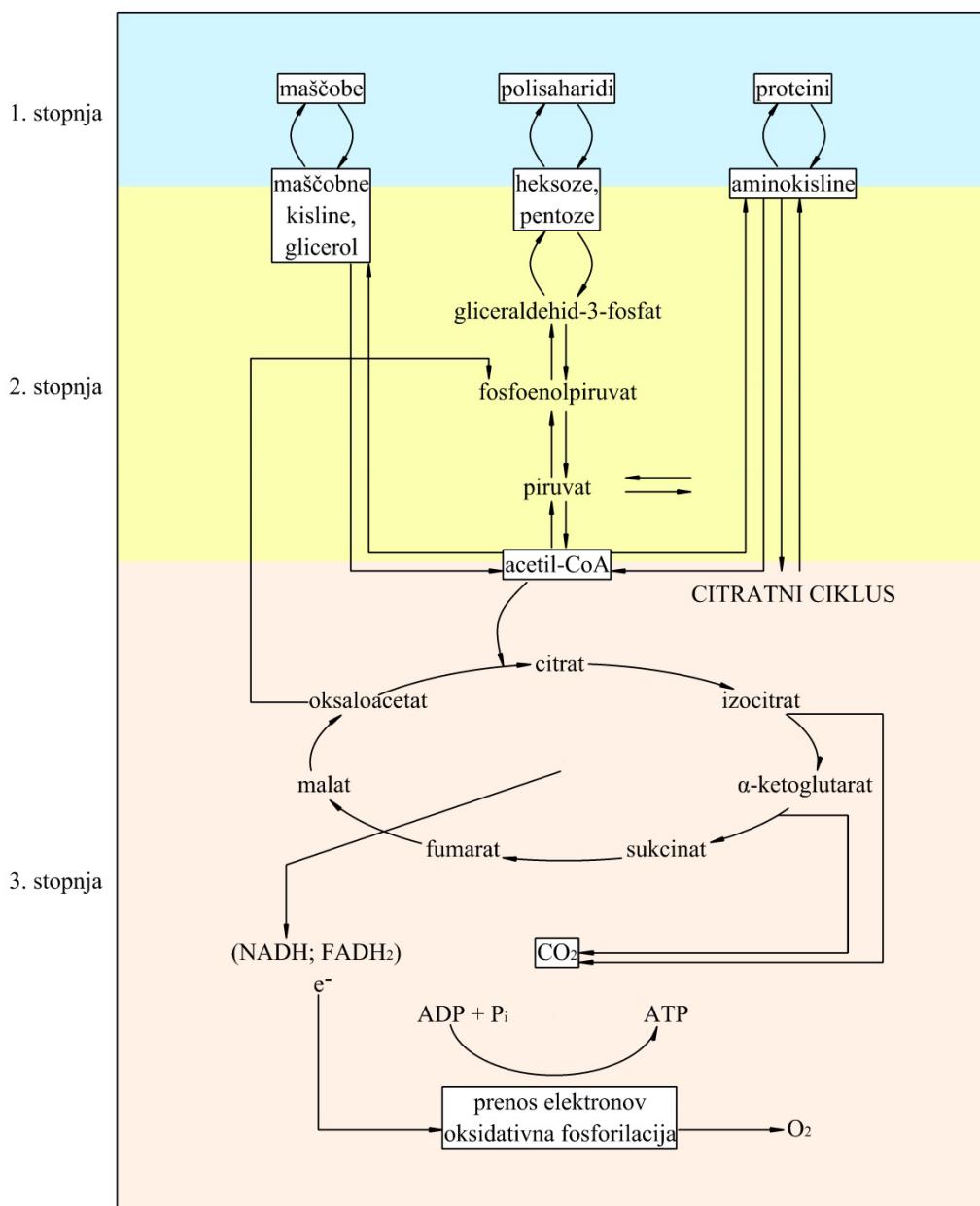
Primarni metabolizem nekega organizma predstavlja kemijske reakcije, ki so ključne za njegovo normalno rast, razvoj in reprodukcijo. Reakcije so med seboj odvisne in ne morejo potekati ločeno. Razvrstimo jih lahko v tri osnovne metabolne poti – glikolizo, cikel citronske kisline oz. Krebsov cikel in oksidativno fosforilacijo.

Metabolizem lahko v osnovi razdelimo na katabolizem in anabolizem. Katabolne reakcije so reakcije razgradnje, pri katerih se sprošča energija v obliki ATP. Ta energija je potrebna v sinteznih reakcijah anabolizma za tvorbo novih kovalentnih vezi pri sestavi makromolekul (proteinov, nukleinskih kislin, polisaharidov in lipidov). V katabolnih reakcijah nastaja tudi NADPH, ki služi kot donor elektronov v reduktivnih reakcijah anabolizma (Garrett in Grisham, 2010).

V prvi stopnji katabolizma prihaja do razgradnje makromolekul v njihove osnovne gradnike. Proteini se razgradijo do aminokislin (AK), triacilgliceroli do maščobnih kislin (MK) in glicerola, polisaharidi do monosaharidov. Najpogosteje je to glukoza. V drugi stopnji prihaja do oksidacije molekul do acetil-CoA, ki je lahko neposredna (AK, MK), v primeru glukoze pa se ta oksidira preko serije vmesnih metabolitov. Acetil-coA nato vstopa v cikel citronske kisline – CCK v katerem se oksidira do ogljikovega dioksida (končni produkt aerobnega metabolizma ogljika). Pri oksidaciji intermediatov CCK nastajata reducirana nukleotida NADH in FADH₂, ki svoje elektrone posredujeta preko dihalne verige na molekulski kisik, ki je njihov končni prejemnik. Pri tem se sprošča energija in nastane voda. Energija, ki se sprosti pri prenosu elektronov preko dihalne verige se porabi za sintezo ATP iz ADP in fosfata. Ta proces poznamo pod imenom oksidativna fosforilacija (Boyer, 2005).

Makromolekule vstopajo v procese razgradnje preko različnih poti, vendar se le te združijo v citratnem ciklu. Celica je z združevanjem metabolnih poti veliko bolj učinkovita ter tudi ekonomična, saj na ta način zmanjša število encimov vpletenih v razgradnjo hrane (posredno tudi število genov) (Boyer, 2005).

Združevanje katabolnih poti in njihova prepletost vodi do občutljivosti encimov na različne inhibitorje oz. aktivatorje. V diplomskem delu smo se ukvarjali z izražanjem modificiranega gena za sintezo osrednjega encima glikolize 6-fosfofrukto-1-kinaze (PFK1), ki bi bil neobčutljiv na povratno inhibicijo s citratom iz citratnega cikla.



Slika 1: Stopnje katabolizma in anabolizma (prirejeno po Boyer, 2005: 371)

2.2 REGULACIJA PRIMARNEGA METABOLIZMA NA NIVOJU GLIKOLIZE

2.2.1 Faze glikolize

Glikoliza je univerzalna biokemična pot razgradnje sladkorjev sestavljena iz desetih zaporednih reakcij, ki vodijo k nastanku piruvata. V osnovi je enaka tako pri prokariontih kot evkarijontih, aerobih oz. anaerobih.

Pot razgradnje glukoze lahko poenostavimo in reakcije združimo v tri osnovne faze. V prvi fazi se izvajajo pripravljalne reakcije, ki molekulo glukoze preoblikujejo in aktivirajo. Reakcije so namenjene zgolj pripravi in ne prihaja do redoks reakcij, zato se energija ne sprošča. Nastaja ključni intermediat glikolize gliceraldehid-3-fosfat (Brock in sod., 1994). V drugi fazi se z redoks reakcijami tvori visoko energijska fosfatna molekula v obliki ATP, dve molekuli NADH ter dve molekuli piruvata (Boyer, 2005).

V tretji fazi piruvat pri aerobičnih vstopih preko CCK v oksidativno fosforilacijo (dihanje), pri anaerobičnih pa se razgradi v fermentativnih procesih bodisi do etanola in ogljikovega dioksida (alkoholna fermentacija) ali do laktata (mlečna fermentacija) (Brock in sod., 1994). Za aerobe je glikoliza le proces v katerem se molekula glukoze pripravi za nadaljnjo razgradnjo, posledično je energijski izplen v tej fazi majhen. Celice aerobov pridobijo poglavitni delež energije v obliki ATP z oksidacijo piruvata v acetil-CoA, pri samem vstopu acetil-CoA v CCK ter pri celičnem dihanju. V nasprotju z aerobičnimi je za anaerobe ATP, ki se sprosti tekom glikolize poglavitnega pomena, ker predstavlja edini vir energije iz metabolizma ogljikovih hidratov (Boyer, 2005).

2.2.2 Raznovrstnost glikolizne poti

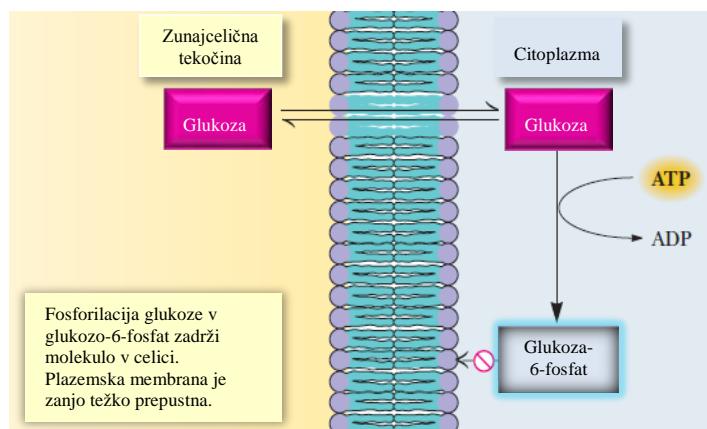
Za večino organizmov velja, da poteka razgradnja glukoze na način, ki so ga prvi opisali nemška raziskovalca Gustav Embden, Otto Meyerhof in Poljak Jakub Karol Parnas. Zato je poznana kot Embden-Meyerhof-Parnasova pot – EMP pot (Garret in Grisham, 2010).

Mnoge bakterije razgrajujejo glukozo po energijsko manj učinkoviti verziji Entner-Doudoroffovi poti. Vzporedna možnost razgradnje glukoze je pot pentoze fosfata, ki se prav tako pojavlja v več oblikah (Garret in Grisham, 2010).

2.2.3 EMP pot in vpletenci encimi

2.2.3.1 Oksidativna stopnja

EMP pot razgradnje glukoze je bila odkrita že v 40ih letih 20. stoletja, ko so raziskovalci prvič dokazali vse intermediate, ki se v določeni fazi pojavijo pri razgradnji glukoze v piruvat. Razlika med prokarionti in evkarionti je le v 1. reakciji glikolize, kjer pride do aktivacije glukoze v glukozo-6-fosfat. Za fosforilacijo glukoze se porabi ena molekula ATP. Dodajanje fosfata na molekulo glukoze zadrži substrat v celici. Glukoza je namreč elektro nevtralna in bi lahko difundirala skozi celično membrano. Zaradi fosfata dobi molekula negativen naboj in membrana za glukozo-6-fosfat ni prepustna. Hitra fosforilacija omogoča tudi nizke znotrajcelične koncentracije glukoze, kar omogoča celici olajšano difuzijo glukoze v celico (Garret in Grisham, 2010).

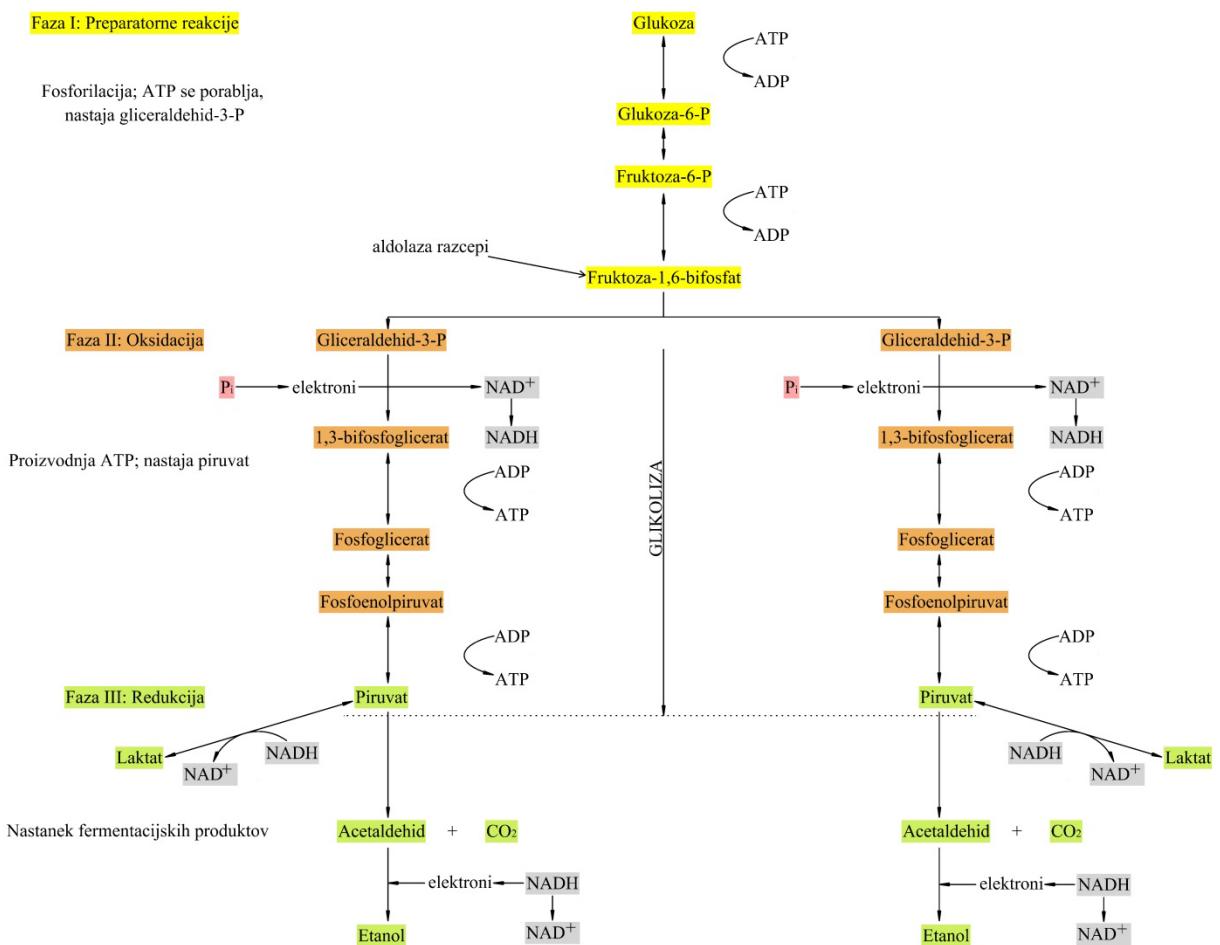


Slika 2: Fosforilacija glukoze v glukozo-6-P s pomočjo ATP. Negativen naboj jo zadrži v celici
(Garret in Grisham, 2010: 539)

Šele, ko je glukoza fosforilirana je pripravljena za nadaljnjo razgradnjo. Reakcijo izvede encim heksokinaza, ki fosforilira mesti C-1 in C-6. Pri evkarionih za svoje delovanje potrebuje Mg^{2+} ione. Pri nekaterih prokarionih lahko ATP nadomesti fosfoenol piruvat, s katerim skupina transportnih encimov fosforilira glukoza ob njenem prehodu skozi membrano (Brock in sod., 1994).

Temu sledi izomerizacija glukoze-6-fosfat z encimom fosfoglukoza izomeraza v fruktozo-6-fosfat. Dodajanje drugega fosfata na molekulo fruktoze izvede 6-fosfrukto-1-kinazu (PFK 1). Za nastanek fruktoze-1,6-difosfata se ponovno porabi ena molekula ATP. ATP se pretvori v ADP v prisotnosti Mg^{2+} ionov. Aldolaza opravi končno cepitev fruktoze-1,6-difosfata v gliceraldehid-3-fosfat in njegov izomer dihidroksi aceton fosfat (Brock in sod., 1994). Vendar lahko le gliceraldehid-3-fosfat vstopi neposredno v drugo fazo glikolize. Dihidroksi aceton fosfat se mora najprej pretvoriti v gliceraldehid-3-fosfat, kar mu omogoči encim trioza fosfat izomeraza (Garrett in Grisham, 2010). Do nastanka tega ključnega intermediata v glikolizi ne prihaja do redoks reakcij, zato se elektroni ne prenašajo. Prva in edina redoks reakcija je pretvorba gliceraldehid-3-fosfata v 1,3-difosfoglicerat. Anorganski fosfat doda gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenazu s pomočjo koencima NAD^+ . NAD^+ sprejme dva elektrona in se reducira v NADH. Ta spremembra anorganskega fosfata v organskega zagotovi energijo za nadaljnje reakcije, ki vodijo do sproščanja ATP. Encim fosfoglycerat kinaza pretvori 1,3-bifosfoglycerat v 3-fosfoglycerat, pri tem pa prde do fosforilacije molekule ADP v ATP. Ta proces imenujemo fosforilacija na nivoju substrata. Encim enolaza z molekule 3-fosfoglycerata ob prisotnosti Mg^{2+} ionov odcepi vodo, pri čemer se tvori fosfoenolpiruvat. Piruvat, ki je končni produkt glikolize nastane s pomočjo encima piruvat kinaze, Mg^{2+} in K^+ ionov. V tej reakciji se sprosti še ena molekula ATP (Brock in sod., 1994).

V glikolizi se dve molekuli ATP porabita v dveh reakcijah fosforilacije in sicer fosforilaciji glukoze in fruktoze-6-fosfat. V nadalnjih korakih glikolize se štiri mol. ATP sintetizirajo (dve pri vsaki pretvorbi 1,3-difosfoglicerata do piruvata). Zato je neto izplen glikolize ob vsaki oksidirani molekuli glukoze dve molekuli ATP in dve molekuli NADH (Brock in sod., 1994).



Slika 3: EMP pot; zaporedje encimskih reakcij pri konverziji glukoze v piruvat in nadaljnji pretvorbi v fermentativne produkte (Brock in sod., 1994: 101)

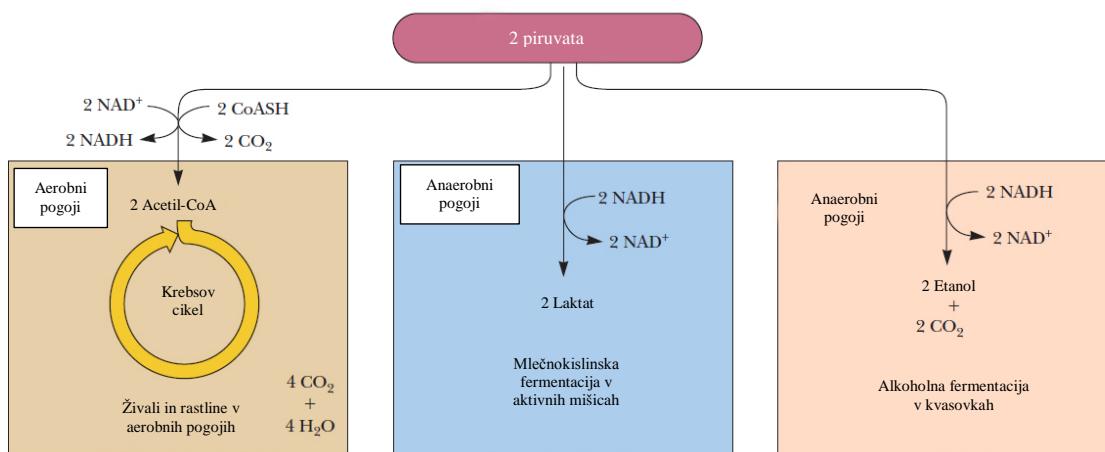
2.2.3.2 Reduktivna stopnja

Za uspešno pretvorbo gliceraldehid-3-fosfata v 1,3-difosfoglicerat je nujno potreben koencim NAD^+ , ki sprejme dva elektrona in se pri tem reducira do NADH. Vendar je količina NAD^+ v celici, ki je na voljo za redukcijo majhna. Kontinuirana oksidacija gliceraldehid-3-fosfata lahko poteka le ob prisotnosti NAD^+ , ki sprejema sproščene elektrone. NADH se mora zato porabiti in reoksidirati (Brock in sod., 1994).

Pri aerobičnih pogojih se piruvat pretvori v acetil-CoA, ki vstopi v CCK. V tem procesu se oksidira do CO_2 . Aerobni organizmi NADH, ki nastane tekom glikolize in CCK reoksidirajo v NAD^+ s pomočjo dehidrogenaz, ki se nahajajo na notranji mitohondrijski membrani, od koder elektroni nadalje potujejo preko elektronske transportne verige, ki jo predstavljajo citokromi (Garret in Grisham, 2010).

Reoksidacija v NAD^+ pod anaerobnimi pogoji je možna zaradi redukcije piruvata v različne fermentativne produkte. Pri kvasovkah se piruvat preko acetaldehida reducira do etanola in ogljikovega dioksida, pri mlečnokislinskih bakterijah do mlečne kisline. Pri tem prihaja do oksidacije molekule NADH v NAD^+ . Podoben proces se vrši pri intenzivnem delu mišic pri človeku, kjer se v odsotnosti kisika glukoza hitro porablja. Med krčenjem mišic ob odsotnosti kisika nastaja mlečna kislina, hkrati pa se reoksidira NADH (Brock in sod., 1994).

Ne glede na pot redukcije piruvata se mora NADH vrniti v svojo oksidirano obliko. NADH je difuzen koencim, ki lahko kroži med encimom, ki oksidira gliceraldehid-3-fosfat in se pritrdi na encim, ki reducira piruvat preko acetaldehida v npr. mlečno kislino. Pri tem se oksidira, odcepi in cikel oksidacije in redukcije se ponovi (Brock in sod., 1994).



Slika 4: Piruvat, ki nastane med glikolizo se lahko porabi na različne načine. Aerobi ga pretvorijo do acetil-CoA, ki se oksidira v ciklu TCA. Pri omejenem kisiku pride do konverzije piruvata v mlečno kislino ali etanol in CO_2 (Garret in Grisham, 2010: 537)

2.3 PFK GLAVNI REGULATORNI ENCIM

2.3.1 Dejavnost encima

Pretok intermediatov skozi glikolizo in s tem povezano število nastalih molekul ATP ter primerno redoks stanje NADH/ NAD^+ je v celici strogo nadzorovan proces. Osrednjega pomena za nadzor celotne glikolize je ireverzibilna pretvorba fruktoze-6-fosfat v fruktozo-1,6-difosfat. Izvaja jo encim 6-fosofrukto-1-kinaza (PFK1). Encim katalizira enega od treh ireverzibilnih korakov glikolize. PFK1 katalizira od Mg-ATP odvisno fosforilacijo, pri kateri se ob nastanku fruktoze-1,6-difosfat sprosti Mg-ADP. Ta encim je prisoten v bakterijah, glivah in živalih, medtem ko v rastlinah najdemo PFK1, ki ji, kot donor fosfatne skupine služi pirofosfat (Legiša in Usenik, 2010).

Čeprav je ATP v tej stopnji nujen, saj služi kot substrat, ob presežku deluje kot alosterični inhibitor encima. Kadar ima celica na voljo zadostne količine ATP, njegov presežek inhibira PFK1 in glikoliza se relativno zgodaj ustavi. Na ta način celica prepreči dodatno sintezo ATP. Alosterična kontrola PFK1 omogoča mikroorganizmom, da v aerobnih

pogojih za svojo rast porabijo manjše količine sladkorjev, kot v odsotnosti kisika. Kisik namreč omogoči nemoten Krebsov cikel in oksidativno fosforilacijo. Energijski izplen v obliki ATP je zato večji in posledično so potrebe po sproščanju kemično vezane energije preko glikolize manjše. Z zadostno količino ATP v celici je glikoliza inhibirana (Garret in Grisham, 2010).

Alosterično delovanje encima PFK1 je ključni mehanizem regulacije metabolizma ogljikovih spojin, saj celico globalno usmerja k sintezi oz. porabi ATP (Garret in Grisham, 2010).

2.3.2 Evolucija encima

Analize številnih bakterijskih in sesalskih sekvenc 6-fosfofrukto-1-kinaz nakazujejo, da so se evkariontske različice encimov razvile s podvojitvijo in združevanjem dveh genov. Evkariontski encimi so namreč več kot dvakrat večji od prokariontskih PFK1. Poravnava N terminalnih koncov sekvenc evkariontskih fosfofruktokinaz je pokazala, da so se pri evkariontskih encimih ostanki aktivnih mest ohranili le na N terminalnem delu molekule (Kemp in Gunasekera, 2002). Ti evolucijski procesi so pripomogli k boljši regulaciji encima, saj so se sčasoma razvila številna alosterična mesta, ki vplivajo na potek glikolize (Poorman in sod., 1984).

Študij aminokislinskih sekvenc je pripeljal do zaključka, da tudi alosterična mesta sesalskih encimov izvirajo iz podvojenih katalitičnih in regulatornih mest njihovih predhodnikov (Kemp in Gunasekera, 2002). Primerjava bakterijskih fosfofruktokinaz s sesalskimi je pokazala, da obe skupini encimov aktivira ADP, vendar najdemo pri višje razvitih organizmih tudi alosterična mesta za aktivacijo s fruktozo-2,6-difosfatom, ter inhibicijo z ATP in citratom (Poorman in sod., 1984).

2.3.3 Zgradba encima

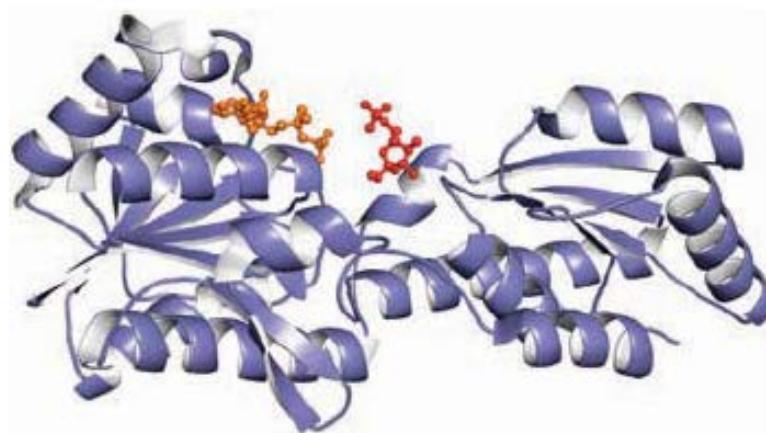
Do sedaj sta bili določeni kristalni strukturi PFK1 za prokarionta *E. coli* in *L. bulgaricus* in evkarionta *Trypanosoma brucei*. Pri tem organizmu ni prišlo do procesa genske podvojitve in fuzije (zaporedna združitev dveh podvojenih genov v en večji gen), ki je karakteristična za druge evkarionte. Zato za višje razvite organizme obstajajo le teoretični modeli, kje so locirana in kako naj bi se razvijala vezavna in alosterična mesta encima (Legiša in Usenik, 2010).

Fosfofruktokinaze so sestavljeni iz več podenot, ki se lahko obnašajo kooperativno. To pomeni, da aktivnost ene podenote ob vezavi majhnega liganda, vpliva na aktivnost vseh ostalih. Takšne proteine pogosto imenujemo alosterični encimi.

Bakterijske fosfofruktokinaze imajo le eno alosterično mesto, na katerega se lahko veže tako inhibitor, kot tudi aktivator. Evkariontske PFK, ki so več kot dvakrat večje od prokariontskih so pod kompleksnejšo kontollo. Sesalske PFK so razvile vezavna mesta za šest organskih molekul: aktivni mesti za vezavo fruktozo-6-fosfat in ATP, inhibitorni mesti za vezavo ATP in citrata, ter mesti za vezavo aktivatorjev fruktozo-2,6-difosfat in AMP (Kemp in Gunasekera, 2002).

Fosfofruktokinaza je homotetramer, protein, sestavljen iz štirih enakih podenot. Vsaka monomera encima ima dve domeni, ki sta sestavljeni iz treh slojev z $\alpha\beta\alpha$ motivom. Jedro vsake domene tvori 11 nizov β listov, ki so večinoma vzporedni. Osrednji del obdaja 13 α heliksov (Boyer, 2002).

Večja domena veže substrat ATP, manjša veže substrat fruktozo-6-fosfat. Alosterična efektorska mesta so locirana nasproti aktivnega mesta, na stičišču monomer. Razlaga alosterične narave PFK temelji na predpostavki, da sta možni le dve kvartarni stanji encima. To je R stanje (R za ang. relaxed, sproščeno) z visoko afiniteto za fruktozo-6-fosfat in T stanje (T za ang. taut, napeto) z nizko afiniteto. Med prehodom iz enega v drugo stanje pride do majhne rotacije dimer znotraj tetramera (sprememba kota za 7°). V R stanju sta simetrična niza β listov na stičišču monomer povezana z molekulo vode. V T stanju se stičišče napne, voda se odstrani, med nizi β listov pa se vzpostavijo vodikove vezi. Sprememba kvartarne strukture v stičišču dimer pogojuje tudi dostopnost vezavnih mest za fruktozo-6-fosfat (Evans in Schirmer, 1990).



Slika 5: 3D struktura ene od štirih podenot encima fosfofruktokinaze z molekulom ADP (oranžna) in fruktozo-6-fosfat (rdeča) (Garret in Grisham, 2010: 542)

2.3.4 Kinetične lastnosti PFK 1

Z divergenco katalitičnih in efektorskih mest prokarionskih fosfofruktokinaz se je pri evkarionskih encimih razvilo skupaj šest vezavnih mest za različne ligande. Dva od teh ligandov se vežeta v aktivni mesti encima, preostali štirje so alosterični efektorji. Eden od teh alosteričnih ligandov je citrat (Capuder in sod., 2009).

Glikoliza in CCK sta sklopljena preko PFK1 ravno zaradi citrata, ki je intermediat v CCK in deluje kot alosterični inhibitor PFK1. Ko CCK doseže nasičenost, se glikoliza, ki napaja cikel v aerobnih pogojih, upočasni. Kot že omenjeno, CCK usmeri elektrone v elektronsko transportno verigo (za sintezo ATP in oksidativno fosforilacijo) in zagotovi prekurzorske molekule za različne biosinteze poti. Inhibicija glikolize preko citrata ustavi nadaljnjo razgradnjo glukoze v te namene, v kolikor je CCK že nasičen. Deluje kot varovalo, ki preprečuje metabolni stres celice, prekomerno tvorbo metabolitov in prostih kisikovih radikalov (Garret in Grisham, 2010).

Drug alosteričen inhibitor je ATP, ki sicer v osnovi deluje kot substrat. PFK1 ima dve različni vezavni mesti za ATP – vezavno mesto za substrat z visoko afiniteto in regulatorno vezavno mesto z nizko afiniteto. Kadar je koncentracija ATP visoka se PFK1 obnaša kooperativno, graf encimske aktivnosti je sigmoiden (substrat je fruktoza-6-fosfat) in K_m za substrat se poveča. Vendar, ko je v citosolu koncentracija ATP zadostna se glikoliza ustavi. Po navadi pa celične koncentracije ATP ne varirajo dosti. Veliko bolj varira sama hitrost glikolize. Majhna nihanja v koncentraciji ATP zato ne morejo neposredno pojasniti velikih sprememb v hitrosti glikolize (Garret in Grisham, 2010).

AMP deluje kot aktivator in izniči inhibicijo ATP. Ko se nivo ATP v celici zmanjša, lahko zaradi delovanja encima adenilat kinaze nivo AMP zelo naraste. Aktivnost PFK1 je odvisna tako od konc. ATP, kot tudi AMP in je direktno povezana z energijskim statusom celice. Aktivnost PFK1 je povečana, ko začne energije – ATP v celici primanjkovati, ter zmanjšana, ko ima celica zadosti ATP. Direktno s tem je povezana tudi sama hitrost glikolize. Hitrost glikolize pada ob zadostni količini ATP v celici in naraste ob znižani konc. ATP oz. ob porastu AMP (Garret in Grisham, 2010).

PFK1 regulira tudi močan alosterični aktivator fruktoza-2,6-difosfat. Aktivator poveča afiniteto encima do substrata fruktoze-6-fosfat, prav tako zmanjša inhibitorne učinke ATP. Fruktoza-2,6-difosfat poveča neto pretok glukoze skozi glikolizo z aktivacijo PFK1 in z inhibicijo encima fruktoze-1,6-difosfataze. To je encim, ki katalizira isto reakcijo v nasprotni smeri (Garret in Grisham, 2010).

2.4 KRATEK FRAGMENT PFK1

2.4.1 Odkritje kratkega fragmenta

Skrajšano obliko proteina PFK1 so najprej odkrili pri filamentozni glivi *Aspergillus niger*. Raziskovalci so kratek fragment v glivnem homogenatu dokazali po 20 urah rasti micelija. Prej je bilo mogoče zaslediti le nativni encim PFK1 z molekulsko maso 85 kDa. Po 24 urah so z afinitetno kromatografijo izolirali le še kratek fragment in mu s SDS-poliakril amidno gelsko elektroforezo določili velikost 49 kDa (Legiša, Mesojednik, 2005).

2.4.2 Posttranslacijske modifikacije PFK1 pri glivi *A. niger*

Komercialno se gliva *A. niger* uporablja za produkcijo citronske kisline iz saharoze. Glivne celice so sposobne pretvoriti tudi do 80 % saharoze v končni produkt, kar uvršča glivo *A. niger* med najbolj učinkovite industrijske mikroorganizme (Legiša in Mattey, 2007). Da celica proizvede presežek citrata, ki nastaja v ciklu citronske kisline je mogoče le ob povisanem nivoju ostalih intermediatov cikla. Poplava intermediatov cikla je neposredna posledica povečanega metabolnega pretoka skozi glikolizo. Pospešeno delovanje glikolize ob hkratnem presežku citrata iz CCK je mogoče zaradi spremenjenih regulatornih lastnosti encima PFK1. Posttranslacijske modifikacije PFK1 ključno spremenijo kinetične lastnosti encima in posledično onemogočijo inhibicijo s citratom (Legiša in Mesojednik, 2005).

In vitro obdelava PFK1 glive *A. niger* s proteinazo K je povzročila deaktivacijo encima. Vendar moramo vzeti v zakup, da so fosfofruktokinaze pri številnih organizmih regulirane

s fosforilacijo / defosforilacijo molekule, ki pogojuje njihovo aktivnost. Takšno obliko regulacije zasledimo predvsem pri višjih evkariontih, pri bakterijah le redko. Fosforilacijo evkarionskih PFK1 opravlja kinaza, ki je odvisna od cAMP (Legiša, Mesojednik, 2005).

Proteolitična cepitev nativnega encima PFK1 glive *A. niger* v njegovo krajšo različico, še ni popolnoma pojasnjen proces. Raziskovalci so odkrili, da pride med rastjo glive na gojišču z amonijevimi solmi, kot edinim virom dušika, do rahlega padca intracelularnega pH. Nekoliko kisel pH lahko inducira nizko aktivnost specifičnih proteaz, ki skozi daljše časovno obdobje razrežejo nativni 85 kDa protein v 49 kDa fragment. Kratek fragment je sestavljen iz 450 AK ostankov in ima odrezan C term. konec proteina. Z odcepitvijo C term. konca se izgubijo tri vezavna mesta za citrat, zato se ta ne more več učinkovito vezati na protein in ga inhibirati (Legiša in Mlakar, 2006). Nizka aktivnost proteaz korelira z izsledki raziskovalcev, ki kažejo, da se nativni encim cepi postopoma v razmiku 6-8 ur (Legiša in Mesojednik, 2005).

V nasprotju s počasnim procesom proteolitičnega cepljenja encima v kratek fragment raziskovalci predvidevajo, da je aktivacija modificiranega proteina takojšnja. Aktivacijo fragmenta s fosforilacijo izvede od cAMP odvisna proteinska kinaza po približno 26 h rasti micelija (Legiša in Mesojednik, 2005). Encim fosforilira specifični treoninski ostanek, ki je lociran v aktivnem mestu encima (Capuder in sod., 2011). Za aktivacijo kinaze mora priti do spontanega dviga koncentracije cAMP, ki ga pri glivi *A. niger* lahko zasledimo v zgodnjih fazah rasti pri pogojih, ki omogočajo izločanje citronske kislino. Količina nastalega cAMP je odvisna od začetne koncentracije saharoze v gojitvenem mediju. Ob višjih koncentracijah saharoze v mediju cAMP nastaja hitreje in v večjih količinah (Legiša in Mesojednik, 2005).

2.4.3 Kinetične lastnosti fragmenta PFK1 glive *A. niger*

Primerjava kinetičnih parametrov nativnega encima ter *in vitro* pripravljenega kratkega fragmenta PFK1 (*in vitro* proteoliza nativnega encima s proteinazo K in aktivacija s serinsko kinazo) je pokazala kar nekaj razlik. Iz Hillovega grafa, ki se uporablja za analizo sigmoidnih kinetičnih podatkov, so določili nižjo K_m vrednost kratkega fragmenta. K_m oz. afinitetna konstanta je tista koncentracija substrata pri kateri encim doseže polovično maksimalno hitrost (Suelter, 1985). Iz istega grafa so izračunali tudi nižji Hillov koeficient, ki je nakazal slabšo kooperativnost pri vezavi substrata v primerjavi z nativnim encimom (Legiša in Mesojednik, 2005).

Pomembno razliko med nativnim encimom PFK1 in njegovim fragmentom je razkril dodatek aktivatorja fruktoze-2,6-difosfat k raztopinam encimov. Pri nativnem encimu je efektor povečal njegovo afiniteto do substrata, vendar ni vplival na njegovo maksimalno hitrost. Prav tako dodatek aktivatorja fruktoze-2,6-difosfat v sistem z nativnim encimom in njegovim substratom (fruktoza-6-fosfat v konc., ki omogoča maksimalno hitrost encima) ni imel vpliva na aktivacijo ali inhibicijo encima z ATP (Legiša in Mesojednik, 2005).

V nasprotju z nativnim encimom je dodatek fruktoze-2,6-difosfat v sistem z modificiranim encimom, substratom, Mg^{2+} ioni in ATP učinkovito preprečil močno inhibicijo fragmenta z ATP. Izkazalo se je tudi, da poveča afiniteto encima do substrata in občutno poveča

maksimalno hitrost encima. Ob dodatku 2 μM fruktoze-2,6-difosfat v sistem se je aktivnost encima skoraj podvojila, pri konc. 8 μM pa skoraj potrojila (Legiša in Mesojednik, 2005).

Medtem, ko je citrat za nativni protein glive *A. niger* zmerni inhibitor, je krajša verzija encima nanj popolnoma neobčutljiva. Inhibicijo so raziskovalci preučevali s postopnim naraščanjem koncentracije citrata vse do 10 mM. Zaradi praktično nezmanjšane hitrosti delovanja encima sklepajo, da je kratek fragment pri fizioloških koncentracijah citrata popolnoma neobčutljiv na njegovo inhibicijo. Dodatek različnih efektorjev v sistem, npr. fruktoze-2,6-difosfat, amonijevih ionov ali AMP ni vplival na inhibicijo kratkega fragmenta s citratom. Izmerjene specifične aktivnosti encima so bile višje in v sorazmerju z dodanim aktivatorjem. Med posttranslacijskimi modifikacijami pride verjetno do krašanja C terminalnega konca, na katerem se nahajajo vezavna mesta za citrat. Študije nakazujejo, da je inhibicijo nativnega PFK1 s citratom možno omiliti z dodajanjem Mg^{2+} ionov v sistem. Nasprotno pa inhibicije ne morejo preprečiti amonijevi ioni, ki so sicer močni ojačevalci encimske aktivnosti (Legiša in Mlakar, 2006).

Od ostalih efektorjev je omembe vreden še AMP. AMP dvigne aktivnost obeh oblik encima PFK1 glive *A. niger*, vendar ima na krajši fragment večji vpliv. Aktivator AMP poveča afiniteto encima do substrata in občutno dvigne njegovo maksimalno hitrost (Legiša in Mlakar, 2006).

Primerjavo vplivov različnih efektorjev na obe različici encima je mogoče narediti na podlagi poskusov, ki so se skušali približati dejanskim razmerjem snovi v celici. Meritve pri fizioloških konc. fruktoze-6-fosfata ($0,23 \pm 0,07$ mM) so pokazale, da se aktivnost kratkega fragmenta pri dodanih fizioloških konc. različnih aktivatorjev (6 μM fruktoza-2,6-difosfat, 1 mM amonijevi ioni, 0,1 mM AMP) in inhibitorjev (1,5 mM ATP, 5 mM citrat) v sistem dvigne tudi do 15 krat v primerjavi s sistemom s kratkim fragmentom brez dodanih efektorjev. Dodatek vseh efektorjev v fizioloških konc. v sistem s fruktozo-6-fosfat (0,25 mM) z nativnim encimom je dvignil njegovo aktivnost le za faktor $2 \pm 0,5$ (Legiša in Mlakar, 2006).

To odkritja kratkega fragmenta pri glivi *A. niger* je vodila želja raziskovalcev, da bi pojasnili visok pretok metabolitov skozi glikolizo, kljub povišani znotrajcelični koncentraciji citrata med sekrecijo citronske kisline. Sprva so domnevali, da je za preprečitev inhibicije PFK1 s citratom ključnega pomena povišana konc. amonijevih ionov (Habison in sod., 1979). Kasneje se je ta teorija razširila na skupno pozitivno delovanje fruktoze-2,6-difosfat, AMP in NH_4^+ ionov (Habison in sod., 1983). Vsi našteti aktivatorji sicer dvignejo afiniteto nativne PFK1 do fruktoze-6-fosfat in zmanjšajo inhibitorno delovanje citrata, vendar ga ne morejo popolnoma izničiti. Močan metabolni tok skozi glikolizo ob hkratnem visokem intracelularnem nivoju citrata, ki deluje inhibitorno na nativno PFK1 je mogoč zaradi posttranslacijske modifikacije nativnega encima (Legiša in Mlakar, 2006).

2.4.4 Posttranslacijske modifikacije PFK1 pri drugih organizmih

In vitro lahko s proteolitičnim cepljenjem dela encima ohranimo njegovo aktivnost in hkrati spremenimo njegove alosterične lastnosti. Proteoliza ima na PFK1 različnih organizmov različne učinke. Odstranitev 17 AK ostankov s C terminalnega konca encima

bakterije *Staphylococcus aureus* je močno zmanjšala inhibicijo z ATP (Valaitits in sod., 1987). Raziskovalca Emerk in Frieden sta zajčjo mišično PFK1 izpostavila tripsinu in ugotovila, da encim razpade na dve polovici, vendar razpad ne vpliva na njegove regulatorne lastnosti (Emrek in Frieden, 1974). Ko je druga raziskovalna skupina isti encim izpostavila subtilizinu, je ta encim deaktiviral (Gottschalk in sod., 1983).

V kraljestvu gliv so bile obsežne študije proteolitičnega cepljenja izvedene predvsem na kvasnih fosfofruktokinazah. Izpostavitev PFK1 različnim proteolitičnim encimom je vedno privredla do popolne izgube njenih katalitičnih aktivnosti (Kopperschlaeger in sod., 1993).

2.4.5 Posttranslacijske modifikacije PFKM pri raku

Preučevanje malignih celic pri različnih vrstah raka je pokazalo, da vse izkazujejo skupno lastnost. V primerjavi z normalnimi celicami porabljajo večje količine glukoze, ki jo v veliki meri pretvorijo v mlečno kislino. Rakave celice pretežno pridobivajo energijo preko pospešene glikolize, ki ji sledi fermentacija piruvata do mlečne kisline v citosolu, namesto mitohondrijske oksidativne fosforilacije. Pojav, ko do fermentacije prihaja kljub izobilju kisika, poznamo pod imenom Warburgov efekt (Warburg, 1956). Spremenjen celični metabolizem je ena od osnovnih značilnosti raka (Hanahan in Weinberg., 2011).

Ključni dejavniki, ki so značilni za razvoj rakavega metabolnega fenotipa, so onkogene mutacije, ki spremeniijo signalizacijo rastnega faktorja po poti PI3K/Akt/mTOR. Aktivacija te poti ojača metabolno aktivnost na dva načina. Poveča se sinteza sladkornega transporterja Glut1 (pospeši prenos glukoze v celico), ter poveča se dejavnost transkripcijskega kompleksa HIF-1 α . Omenjeni kompleks v sodelovanju s transkripcijskim faktorjem c-Myc poveča sintezo večine glikolitičnih encimov. Vendar je potrebno vedeti, da je metabolni tok skozi glikolizo pri evkariontih močno kontroliran proces. Regulatorni encimi so ob povečanem delovanju ostalih encimov glikolize povratno inhibirani. Zato kljub presežni ekspresiji encimov glikolize ne pride do bistvenega dviga v konc. metabolitov. Da naravna varovala delujejo, so potrdile tudi raziskave z bakterijo *E. coli* in kvasovko *S. cerevisiae* pri katerih povečana sinteza vseh glikolitičnih encimov ni imela nikakršnega vpliva na hitrost glikolize oz. na produkcijo etanola. Torej lahko sklepamo, da med preobrazbo normalnih celic v rakave pride do pomembnih sprememb kinetike regulatornih encimov (Šmerc in sod., 2011).

Od treh osrednjih regulatornih encimov glikolize (heksokinaza, PFK 1, piruvat kinaza) fosfofruktokinaza nadavlada regulatorno vlogo ostalih dveh alosteričnih encimov (Šmerc in sod., 2011). Do sedaj so povečano aktivnost PFK1 v rakavih celicah povezovali le z izgubo funkcije p53 (transkripcijski faktor), kar rezultira v padcu konc. proteina TIGAR, ki deluje kot fruktoza-2,6-bifosfataza (Bensaad in sod., 2006). Posledično so konc. fruktoze-2,6-difosfat v rakavih celicah povišane in delujejo kot močan stimulus PFK1 (Šmerc in sod., 2011). Vendar je v literaturi mogoče najti vse več podatkov o izoformah PFK1, odpornih na inhibicijo s citratom (oblika najdena v človeškem gliomu (Staal in sod., 1987) in hitrorastočih hepatomah glodalcev (Marin-Hernandez in sod., 2006)).

V sesalskem genomu se nahajajo trije geni za PFK1, ki se različno izražajo glede na tkivo v katerem so locirani. Pri ljudeh poznamo mišični tip (PFK-M; 85, 051 Da) (Yamasaki in sod., 1991), jetrni tip (PFK-L; 84, 917 Da) (Elson in sod., 1990) in trombocitni tip (PFK-P;

85, 596 Da) (Eto in sod., 1994). Vse tri oblike izoencimov so močno občutljive na inhibicijo s citratom (Vora in sod., 1985) in ATP (Dunaway in sod., 1988). Študije so pokazale, da morda v sesalskih rakavih celicah prihaja do podobne dvostopenjske posttranslacijske modifikacije PFK-M0, kot pri PFK1 glive *A. niger*. Formacija krajsrega visoko aktivnega fragmenta s spremenjenimi kinetičnimi parametri bi lahko pojasnila pospešeno glikolizo v malignih celicah (Šmerc in sod., 2011).

Za *in vitro* posttranslacijsko modifikacijo sesalskih PFK1 je bil izbran encim PFK-M izoliran iz zajčeje mišice. Poravnava AK sekvenc vseh treh izoencimov (tipov M, L in P) je namreč pokazala, da le PFK-M vsebuje negativno nabito asparaginsko kislino na mestu, ki korelira s treoninskim ostankom v aktivnem mestu PFK1 glive *A. niger*. Zato je bil PFK-M izbran kot najverjetnejši kandidat, da bo po enostopenjski posttranslacijski modifikaciji iz njega nastal visoko aktiven kratek fragment (Šmerc in sod., 2011).

Da bi ugotovili katera oblika PFK1, je prisotna v tumorskih celicah so raziskovalci testirali štiri različne neoplastične celične linije, za katere vemo, da inducirajo metastazne tumorje po inserciji v testne živali. Uporabili so celice HeLa humanega karcinoma, celice B16-F10 mišjega melanoma, ter celice limfomov – podganjo celično linijo Nb2-11 in humano celično linijo TF-1. V vseh homogenatih neoplastičnih celičnih linij so z metodo western blot zaznali fragmente velike približno 47 kDa. Količina nativnega encima PFK1 velikega 85 kDa je bila pod mejo detekcije metode. Za primerjavo so v limfocitih, izoliranih iz humane periferne krvi z isto metodo zaznali le nativni 85 kDa encim ter prav tako v celični liniji HEK 293 (humane embrionične celice ledvic). Skoraj identični kratki fragmenti so bili odkriti v tumorjih. Ti so se razvili po desetih dneh v miših C57BL/6, ki so prejele subkutano injekcijo celic B16-F10. V nasprotju s testiranimi celičnimi linijami pa je celični homogenat vseboval tudi nativni PFK-M encim, ki pa je najverjetneje izhajal iz celic podpornega tkiva (krvne žile, vnetne celice...) (Šmerc in sod., 2011).

Za nadaljnje teste je bila pripravljena serija skrajšanih genov iz humane mišične PFK1 cDNK. Njihova učinkovitost je bila testirana v bakteriji *E. coli* sev RL 257, ki ni nosila genetskega zapisa za lastne proteine PFK1. Transformante so bile testirane na mediju, ki je vseboval glukozo. Za nadaljnje teste so izbrali transformante, ki so sintetizirale fragment 9 velikosti 47,8 Da. Da bi ugotovili kakšen vpliv imajo modificirani encimi PFK-M na netumorogene celice, so pripravili stabilne transfektante, ki so konstitutivno izražale nativni PFK-M in fragment 9 encima PFK-M. Hitrost rasti, porabo glukoze in akumulacijo laktata so primerjali s transfektantami, ki so vsebovale plazmid brez genov *pfk*. Najbolj drastična razlika med testiranimi transfektantami je bila količina akumuliranega laktata. Po 24 urah inkubacije je bila količina izločenega laktata v mediju (normalizirana na en milijon celic) 4 krat višja pri sevu, ki je sintetiziral fragment 9, v primerjavi s sevom, ki je produciral nativni PFK-M. V primerjavi s starševskim sevom pa je bila razlika kar 6 kratna. Naslednji dan se je razlika v akumulaciji zmanjšala na 30 %, kasneje so se vrednosti vseh treh celičnih linij poenotile. S hitrostjo akumulacije laktata je sovpadala tudi hitrost porabe glukoze. Po 24 urah so celice, ki so vsebovale fragment 9, porabile približno 40 % več glukoze kot celice z nativnim PFK-M. V primerjavi s starševskimi celicami je bila ta razlika še nekoliko višja (Šmerc in sod., 2011).

Pridobljeni podatki nakazujejo na pomembno vlogo modificiranega humanega PFK-M v deregulaciji metabolnega pretoka skozi glikolizo. Kljub temu med različnimi transfektantami ni bilo opaziti razlike v hitrosti rasti (za rakave celice je značilna hitra

proliferacija). Vendar je potrebno vedeti, da je celična linija HEK 293 netumorogena. V teh celicah ni onkogenih mutacij in signalna pot PI3K/Akt/mTOR ni motena. Ravno ta pa podpira hitro celularno biosintezo v rakavih celicah (Šmerc in sod., 2011). Primerjava metabolnih poti rakavih celic kolorektalnega karcinoma, ki izločajo laktat in netumorogenih stromalnih celic (Swietach in sod., 2007) je pokazala, da fibroblasti povezani s tumorjem izražajo velike konc. proteina MCT1/2, ki lahko zajame laktat, sproščen iz rakavih celic. Na padec laktata v mediju s celicami, ki so producirale fragment 9, bi bila lahko vplivala tudi piruvat dehidrogenaza (PDH). Ta se lahko v večjih količinah izraža v stromalnih celicah in je odgovorna za regulacijo reakcij od piruvata do Acetil-CoA in nadaljnjo oksidacijo piruvata. Povišana produkcija laktata v celicah HEK 293, ki so sintetizirale fragment 9, bi lahko aktivirala PDH, ki bi omilila kopiranje laktata z njegovo nadaljnjo oksidacijo. Na ta način bi poskrbela, da je bil učinek akumulacije zgolj začasen (Šmerc in sod., 2011).

Posttranslacijska modifikacija encima PFK1 bi lahko bila ključna za spremenjeno regulacijo metabolnega pretoka skozi glikolizo in nastanek Warburgovega efekta v rakavih celicah. Raziskave kažejo, da bi lahko bila signalna pot PI3K/Akt vključena v aktivacijo specifičnega proteolitičnega encima, ki reže nativne PFK1 v krajše različice. V kolikor bo v prihodnosti raziskovalcem uspelo potrditi predvidevanja, da so kratki fragmenti PFK1 omejeni zgolj na rakave celice, bi le ti lahko služili kot markerji za hitro rastoče maligne celice (Šmerc in sod., 2011).

2.4.6 Priprava visoko aktivnega kratkega fragmenta PFK1 iz modificiranega gena *pfkA*

Aktivacija kratkega fragmenta v celicah glive *A. niger* je dvostopenjski proces. V prvi fazi pride s proteazo do krajanja proteina v neaktivnem fragmentu. Fragment nato aktivira proteaza s fosforilacijo. Z *in vitro* pripravo modificiranega gena *pfkA* so se raziskovalci želeli ogniti kompleksnim posttranslacijskim modifikacijam. Na ta način bi imele transformante glive *A. niger* deregulirano glikolizo, ki bi močno napajala cikel TCA in v končni fazi povečano produkcijo citronske kisline. Modificiran gen bi lahko imel podoben pozitiven učinek tudi na druge industrijsko pomembne mikroorganizme pri produkciji različnih bio produktov (Capuder in sod., 2009).

Idealno tovrstne skrajšane gene testirajo v mikroorganizmih z delecijo nativnih genov *pfkA*. Vendar morajo biti na novo sintetizirani kratki fragmenti fosforilirani, da se zopet reaktivirajo. V bakterijskih celicah pa do spontane fosforilacije ne more priti zaradi odsotnosti encima proteinske kinaze A (PKA) (Capuder in sod., 2009).

Ker med mikrobi ni bilo na voljo primerenega seva z motenim genom *pfkA*, so raziskovalci za *in vivo* teste kratkega fragmenta izbrali sev glive *A. niger* A156. Izbrani sev (podobne lastnosti kot sev A60, ki se uporablja za visoko produkcijo citronske kisline) je imel manjšo verjetnost spontane posttranslacijske modifikacije PFK1 kot divji tip. S testiranjem številnih genov različnih dolžin so najprej določili primerno dolžino rezanega gena (Capuder in sod., 2009).

Da bi se ognili potrebi po aktivaciji kratkega fragmenta s fosforilacijo, so med pripravo gena treoninski AK ostanek na mestu 89 zamenjali z negativno nabito glutaminsko kislino.

Po vnosu modificiranega kratkega gena v glivo *A. niger*, so pri transformantah izmerili povečano aktivnost PFK1, ter pospešeno produkcijo citronske kisline in ekstracelularnih encimov (Capuder in sod., 2009).

Gen za kratek fragment PFK1 je zaradi svojega komercialnega potenciala sedaj tudi patentno zaščiten z evropskim in ameriškim patentom (EP 2 010 651 B1; US 7,807,404 B2) (Legiša in sod., 2010).

2.5 IZBOR ORGANIZMA ZA IZRAŽANJE MODIFICIRANEGA PROTEINA

Za izražanje kratkega fragmenta smo izbrali kvasovko *S. cerevisiae*, ker predstavlja evkariontski modelni organizem z najbolj podrobno raziskanim primarnim metabolizmom. Dolgoletna uporaba kvasovke pri alkoholnih fermentacijah je skozi čas privedla do akumulacije znanja s področij genetike, fiziologije, biokemije kot tudi genskega inženiringa in fermentacijskih tehnologij. Danes velja za izhodiščni organizem za razvoj strategij metabolnega inženiringa (Nevoigt, 2008).

S. cerevisiae je uporabna v raziskovalne namene, ker je nezahtevna za gojenje, raste na različnih enostavnih gojiščih, uspeva v aerobnih in anaerobnih pogojih, ima kratek podvojevalni čas, neobčutljivost celic pa omogoča izpostavitev različnim pogojem rasti v sklopu zastavljenih raziskav. Ameriška agencija FDA (ang. food and drug administration; agencija za hrano in zdravila) jo uvršča med organizme GRAS (ang. generally recognized as safe; splošno prepoznani kot varni), kar je nedvomno prispevalo k njeni povečani uporabi v temeljnih in aplikativnih raziskavah. K razmahu genetske manipulacije kvasovk je pripomogel tudi razvoj učinkovitih metod transformacije in specializiranih vektorjev za izražanje genov ter številnih drugih uporabnih orodij, kot so reporterski geni, imuno značke in genetski markerji (Nevoigt, 2008).

Z manipulacijo kvasovke smo želeli preučiti vpliv kratkega fragmenta encima PFK1 na fiziologijo evkariontskih celic. Končne rezultate pa uporabiti kot izhodišča za nadaljnje raziskave na področju metabolizma rakavih celic in aplicirati znanje za povečanje donosov v produkciji bioetanola.

2.6 KVASOVKA *S.cerevisiae* SEV HD114-8D

Za izražanje rekombinantnih plazmidov pripravljenih v *E. coli* smo transformirali kvasovko *S. cerevisiae* sev HD114-8D (*MATα pfk1:: HIS3 pfk2:: HIS3 ura3-52 leu2-3, 112 his3-11, 15 MAL SUC GAL*). Sev je bil pripravljen s komplementacijo iz seva HD56-5A in nosi histidinsko rezistenco (gen HIS3). Je avksotrofni mutant, ki ne more rasti brez uracila, leucina in histidina. Uporabljene kvasovke so brez lastnih genov *pfk* (brez *pfk1* in *pfk2*) (Boles, 1996). Zaradi izbitih genov niso sposobne rasti na glukoznem gojišču, lahko pa rastejo na gojišču, ki vsebuje glicerol in etanol. Transformante po uspešno izvedeni transformaciji z rekombinantnim plazmidom, ki vsebuje gen za komplementacijo uracilne avksotrofije, rastejo na gojišču brez dodanega uracila.

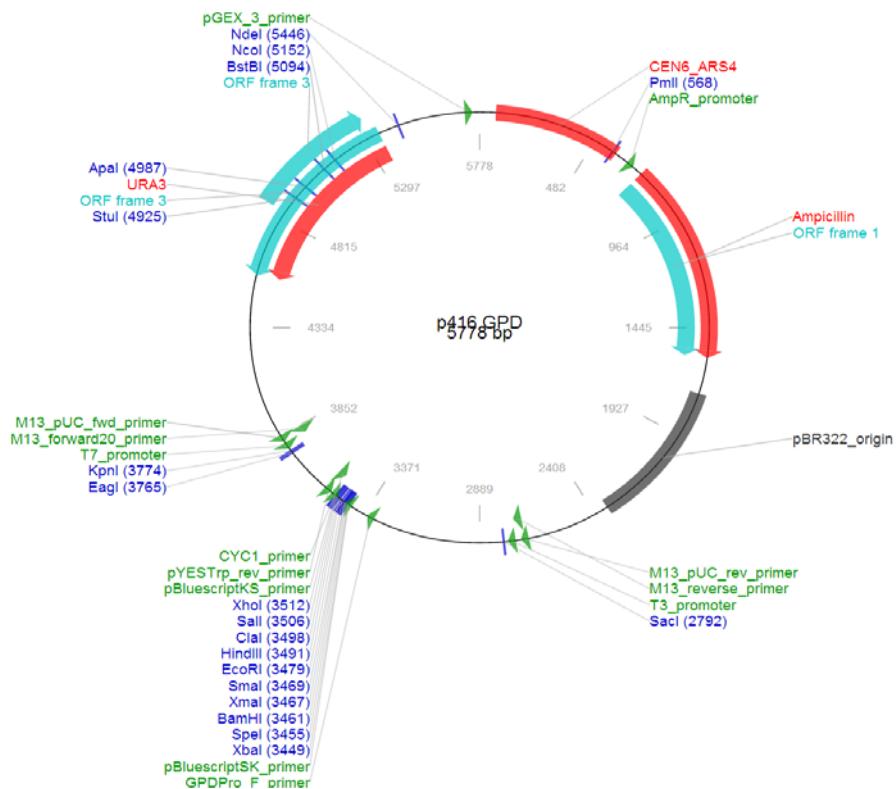
2.7 IZBOR VEKTORJEV ZA TRANSFORMACIJO KVASOVK

Na nivo izražanja nekega rekombinantnega proteina lahko vplivamo preko izbire določenega promotorja gena oz. z izbiro števila kopij gena. Različen nivo eizražanja genov smo dosegli z uporabo dveh različnih plazmidov. Za izražanje kratkega fragmenta in nativnega PFK1 smo izbrali kvasna vektorja p416GPD in p426GPD (vektorja sta bila kupljena pri podjetju ATCC; p416GPD-kataloška št.: ATCC 87360; p426GDP-kataloška št.: ATCC 87361).

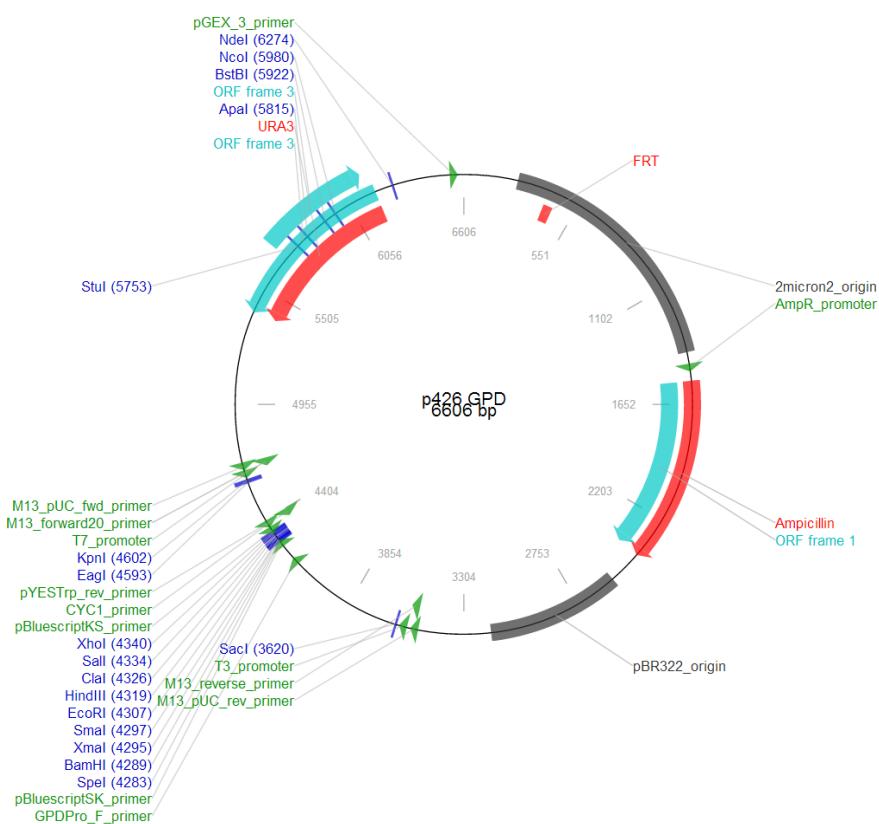
Vektor p416GPD je centromerni plazmid, ki se avtonomno podvojuje, ter vsebuje sekvence kvasnih centromer (CEN) in sekvence ARS. Po navadi so centromerni plazmidi prisotni v celicah v zelo nizkem številu, od 1 do 3 na celico (Sherman, 1998).

Uporabili smo tudi vektor p426GPD, ki je v osnovi 2μ plazmid. V haploidnih kvasnih celicah nastaja v velikem številu kopij (60-100 na celico) (Bruschi in Storici, 1997).

Oba ekspresijska sistema sestavlja močan konstitutivni promotor GPD, pridobljen iz gena za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo. Plazmid p416GPD ima poliklonsko mesto z devetimi restriktijskimi mesti, p426GPD pa z osmimi unikatnimi restriktijskimi mesti (brez restriktijskega mesta za *XbaI*). Plazmidoma je dodan markerski gen URA3 in terminator transkripcije CYC1 (Mumberg in sod., 1995).



Slika 6: Plazmidna mapa p416 GPD (Addgene, 2014a)



Slika 7: Plazmidna mapa p426 GPD (Addgene, 2014b)

Poliklonsko mesto obeh plazmidov ne vsebuje start kodona ATG, zato so morali vstavljeni vključki vsebovati svoj start kodon za začetek translacije (Mumberg in sod., 1995).

Uporabljena sistema za kloniranje se lahko uporablja tudi za izražanje v bakteriji *E. coli*. Plazmide, ki omogočajo propagacijo v dveh različnih gostiteljskih vrstah imenujemo shuttle vektorji. Glavna prednost tovrstnih plazmidov je, da jih lahko namnožimo v bakteriji *E. coli* in nato uporabimo v želenem sistemu (Sherman, 1998).

Komponenta vektorja, ki se nanaša na izražanje v *E. coli* vsebuje mesto ori (mesto začetka replikacije, ang. origin of replication) in selekcijski marker, ki je rezistenza na določen antibiotik. Plazmida p416GPD in p426GPD vsebujeta gene, ki kodirajo rezistenco na antibiotik ampicilin. Za podvajanje v *S. cerevisiae* vsebuje plazmid zaporedje ARS (avtonomna replikacijska sekvenca, ang. autonomous replication sequence) in selekcijski marker (URA 3- gen, ki kodira encim za sintezo uracila) (Sherman, 1998).

Ekspresijske nivoje obeh vektorjev so določili z merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti kvasnih kolonij, ki so vsebovale plazmid z reporterškim genom. Nivo izražanja plazmida p426GPD je bil več kot 4 krat višji v primerjavi s p416GPD. Številke približno ustrezajo razlike v številu kopij plazmidov na celico. Glede na št. kopij centromernega plazmidova v primerjavi z 2μ plazmidom, je dvig nivoja izražanja v celicah s p426GPD manjši, kot bi sicer pričakovali. Vzrok za nižjo raven izražanja od pričakovane bi lahko bilo pomanjkanje

transkripcijskih faktorjev v celicah transformiranih s plazmidom p426GPD (Mumberg in sod., 1995).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NAMNOŽITEV BAKTERIJE *E.coli* SEV DH5 α ZA IZOLACIJO PLAZMIDNEGA VEKTORJA p416GPD IN p426GPD

Epruvetam z 10 ml tekočega gojišča Luria Bretani (LB) smo dodali 10 μ l ampicilina (amp) z založno koncentracijo c = 50 mg/ml. Iz osnovne gojitvene plošče smo z zobotrebecem postrgali osamljeno bakterijsko kolonijo in zobotrebec prenesli v tekoče LB gojišče. Epruvete smo stresali na stresalniku 18 ur na 37 °C.

3.2 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA p416GPD IN p426GPD IZ BAKTERIJE *E.coli* SEV DH5 α

Iz epruvete, v kateri smo namnožili bakterijo *E.coli* sev DH5 α s plazmidom p416GPD, ter epruvete z *E.coli* sev DH5 α s plazmidom p426GPD smo odpipetirali 2 ml gojišča s celicami v posamezno mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 minuto na najvišjih obratih. Gojišče smo odstranili in postopek še dvakrat ponovili.

Pelet v mikrocentrifugirki smo resuspendirali z 250 ml raztopine za resuspendiranje in mikrocentrifugirke stresli na vibracijskem mešalniku. Za ločevalne kolone smo uporabili modre centrifugirke proizvajalca Fermentas.

Plazmidno DNK smo izolirali s komercialnim kitom GeneJETTM plasmid MiniprepKit (proizvajalec Fermentas) po navodilih proizvajalca. Sestava raztopine za resuspendiranje, izpiranje in ekstrakcijskih pufrov ni bila podana. Koncentracijo izolirane plazmidne DNK p416GPD in p426GPD smo izmerili z Nanodrop spektrofotometrom.

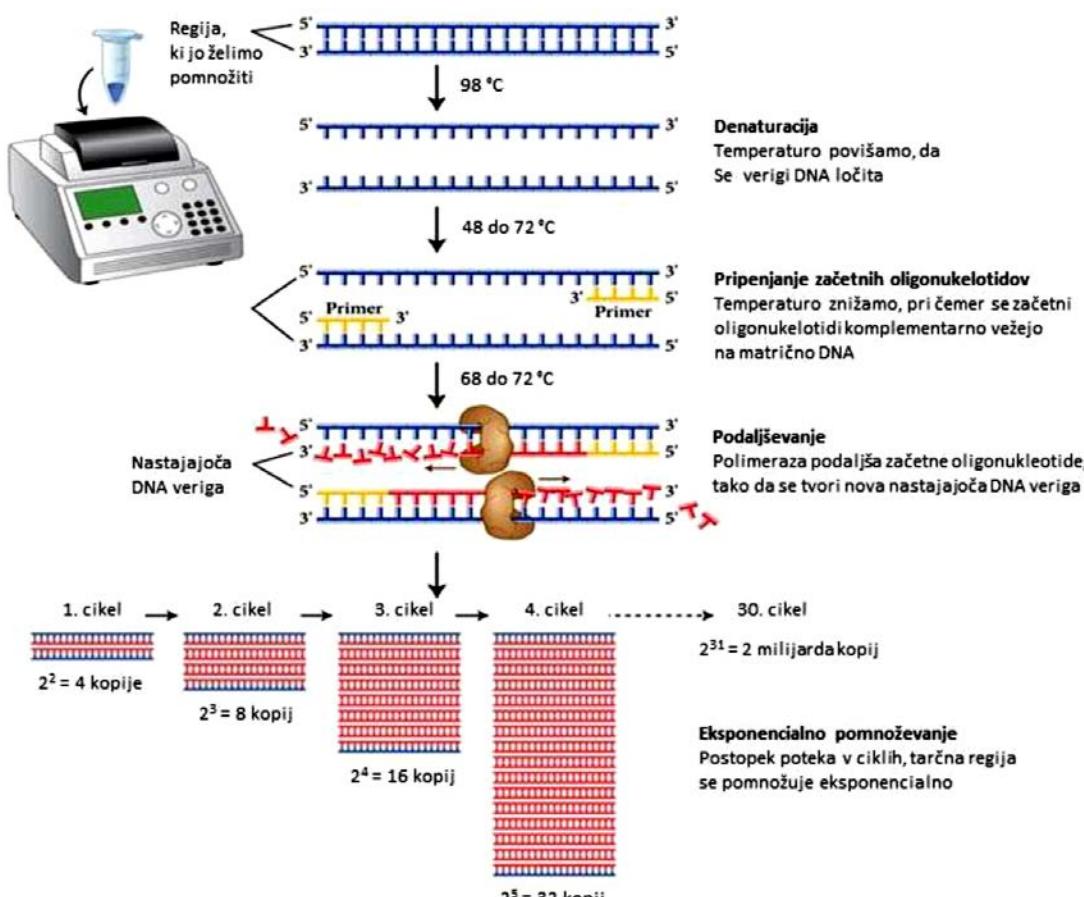
3.3 NAMNOŽITEV VKLJUČKA TE260 IN NATIVNEGA *npfkA* S PCR ZA LIGACIJO V VEKTOR p416GPD IN VEKTOR p426GPD

3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Transkripcijo modificiranega proteina smo skušali povečati z ligacijo vključka TE260 v vektorja p416GPD in p426GPD, zato smo ga morali predhodno namnožiti. Ker smo želeli primerjati aktivnost modificiranega proteina z nativnim, smo namnožili tudi nativni *npfkA*. Za pomnožitev vključkov smo uporabili PCR.

Verižna reakcija s polimerazo je molekularna metoda, ki omogoča *in vitro* pomnoževanje vnaprej določenih segmentov DNK. PCR vključuje taljenje dvojne viačnice DNK v enovijačno. Segment DNK, ki ga želimo pomnožiti vnaprej, določimo z izbiro začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo na izbrana območja DNK. Po parjenju začetnih oligonukleotidov s tarčno DNK sledi podaljševanje z DNK polimerazo, ki dodaja proste dNTP-je in tako podaljšuje verigo. Osnovni cikel taljenja DNK, naleganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja z DNK polimerazo ponovimo vsaj 30 krat, da dosežemo zadostno količino tarčne DNK (Atlas, Bartha; 1998).

Tipična temperatura za denaturacijo dvovijačne DNK je med 94 in 95 °C, 30-60 s. Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov lahko sega od 55 do 72 °C in je odvisna od deleža adenina oz. timina in gvanina oz. citozina. Temperatura podaljševanja je odvisna od izbrane polimeraze, čas njenega delovanja pa od dolžine tarčne DNA (Atlas, Bartha; 1998).



Slika 8: Shematično prikazan potek PCR reakcije (Potočnik in Repnik, 2014: 9)

3.3.2 Namnožitev vključka TE260

Delovna koncentracija DNK vključka za PCR mora biti med 10 in 50 ng. Za delo smo izbrali koncentracijo 20 ng. Koncentracijo založnih raztopin vključka TE260 v vektorju pALTER smo izmerili s pomočjo Nanodrop spektrofotometra (založna c_{TE260} v pALTER=52,9 ng/ μ l). Založne raztopine smo redčili s sterilno MQ do ustreznih koncentracij, nato pa pripravili reakcijsko mešanico za PCR podano v preglednici 1 in 4.

Preglednica 1: Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka *TE260* za ligacijo v vektor p416GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
Matrična DNK	<i>TE260</i> v pAlter	52,9 ng/µl	1 µl
Začetni olig. 1	TEGI5 (746)	20 pmol/µl	2,5 µl
Začetni olig. 2	TEGI7 (2196)	20 pmol/µl	2,5 µl
dNTP	/	2,5 mM	4 µl
Mag. Ioni	MgSO ₄	50 mM	1 µl
PCR pufer	10 x pufer za polimerazo	10 x	5 µl
Polimeraza	PFX platinum	/	1 µl
Voda	MQ	/	33 µl
Skupni volumen			4 µl

Op.: Zapis posameznega uporabljenega začetnega oligonukleotida je sestavljen iz njegovega imena in zaporedne kataloške številke v zbirki začetnih oligonukleotidov Kemijskega inštituta

Preglednica 2: Temperaturni program PCR reakcije vključka *TE260* za ligacijo v vektor p416GPD

Stopnja	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija dvov. DNK	94 °C	2 min
30 ciklov		
Denaturacija	94 °C	1 min
Prileganje	55 °C	1 min
Podaljševanje	68 °C	1,5 min
Zaključevanje reakcije	68 °C	7 min
Hlajenje	4 °C	neomejeno

Preglednica 3: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnožitev *TE260* z restrikc. mestoma za encima *XbaI*, *BamHI* (za vključitev v vektor p416GPD)

Začetni oligonukleotid	Zaporedje
TEGI5 (t.i. smerni)	5'-CATCGCTCTAGAATGGCTCCCCCAAGCTCC-3'
TEGI7 (t.i. protismerni)	5'-TTTCAGGATCCTTACCCGGGATCATAGTGCC-3'

Op.: V TEGI5 je odenbeljeno zaporedje za restrikcijsko mesto encima *XbaI*, v TEGI7 odenbeljeno restrikcijsko mesto za *BamHI*.

Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka *TE260* za ligacijo v vektor p426GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
Matrična DNK	<i>TE260</i> v pALTER	17,7 ng/µl	2 µl
Začetni olig. 1	pfk35 (1143)	20 pmol/µl	2,5 µl
Začetni olig. 2	TEGI9 (2199)	20 pmol/µl	2,5 µl
dNTP	/	2,5 mM	4 µl
Mag. Ioni	MgSO ₄	50 mM	1 µl
PCR pufer	10 x pufer za polimerazo	10 x	5 µl
Polimeraza	PFX platinum	/	1 µl
Voda	MQ	/	32 µl
Skupni volumen	/	/	50 µl

Preglednica 5: Temperaturni program PCR reakcije vključka *TE260* za ligacijo v vektor p426GPD

Stopnja		Temperatura	Čas
Začetna denaturacija dvov. DNK		94 °C	2 min
30 ciklov	Denaturacija	94 °C	1 min
	Prileganje	55 °C	1 min
	Podaljševanje	68 °C	1,5 min
Zaključevanje reakcije		68 °C	7 min
Hlajenje		4 °C	neomejeno

Preglednica 6: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnožitev *TE260* z restrikcijskima mestoma za encima *BamHI*, *HindIII* (za vključitev v vektor p426GPD)

Začetni oligonukleotid	Zaporedje
pfk35 (t.i. smerni)	5'- AAGTAAGGATCCATGGCTCCCCCAAGC -3'
TEGI9 (t.i. protismerni)	5'-TTTCAAAGCTTTACCCGGGATCATAGTGCC-3'

Op.: V pfk35 je odenobljeno zaporedje za restrikcijsko mesto encima *BamHI*, v TEGI9 odenobljeno restrikcijsko mesto za *HindIII*.

3.3.3 Namnožitev nativnega *npfkA*

Za ligacijo v plazmidna vektorja p416GPD in p426GPD smo morali tako kot vključek *TE260* namnožiti tudi nativni *npfkA* brez intronov. Vključek z oznako 319-pfkA se je

prvotno nahajal v plazmidu pJJH711(založna c_{npfkA} v pJJH711=247,7 ng/μl). Pri namnoževanju smo uporabili enak smerni začetni oligonukleotid, kot za namnožitev vključka TE260, protismerni začetni oligonukleotid pa smo spremenili, ker je sekvenca nativnega *npfkA* daljša (2454bp).

Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka *npfkA* za ligacijo v vektor p416GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
Matrična DNK	319- <i>npfkA</i> v pJJH711 (882)	247,7 ng/μl	1 μl
Začetni olig. 1	TEGI5 (746)	20 pmol/μl	2,5 μl
Začetni olig. 2	pfk32 (882)	20 pmol/μl	2,5 μl
dNTP	/	2,5 mM	4 μl
Mag. Ioni	MgSO ₄	50 mM	1 μl
PCR pufer	10 x pufer za polimerazo	10 x	5 μl
Polimeraza	PFX platinum	/	1 μl
Voda	MQ	/	33 μl
Skupni volumen	/	/	50 μl

Preglednica 8: Temperaturni program PCR reakcije vključka *npfkA* za ligacijo v vektor p416GPD

Stopnja		Temperatura	Čas
Začetna denaturacija dvov. DNK		94 °C	2 min
30 ciklov	Denaturacija	94 °C	1 min
	Prileganje	55 °C	1 min
	Podaljševanje	68 °C	2,5 min
Zaključevanje reakcije		68 °C	7 min
Hlajenje		4 °C	neomejeno

Preglednica 9: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnožitev *npfkA* z restriktijskima mestoma za encima *XbaI*, *BamHI* (za vključitev v vektor p416GPD)

Začetni oligonukleotid	Zaporedje
TEGI5 (t.i. smerni)	5'-CATCGCTCTAGAATGGCTCCCCCAAGCTCC-3'
pfk32 (t.i. protismerni)	5'-AGCTGTGGATCCTTAAGCATTCTCAT-3'

Op.: V TEGI5 odebeleno zaporedje za restriktijsko mesto encima *XbaI*, v pfk32 odebeleno restriktijsko mesto za *BamHI*.

Preglednica 10: Sestava reakcijske mešanice za PCR vključka *npfkA* za ligacijo v vektor p426GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
Matrična DNK	319- <i>npfkA</i> v pJJH711	247,7 ng/µl	1 µl
Začetni olig. 1	pfk35 (1143)	20 pmol/µl	2,5 µl
Začetni olig. 2	TEGI 10 (2200)	20 pmol/µl	2,5 µl
dNTP	/	2,5 mM	4 µl
Mag. ioni	MgSO ₄	50 Mm	1 µl
PCR pufer	10 x pufer za polimerazo	10 x	5 µl
Polimeraza	PFX platinum	/	1 µl
Voda	MQ	/	33 µl
Skupni volumen	/	/	50 µl

Preglednica 11: Temperaturni program PCR reakcije vključka *npfkA* za ligacijo v vektor p426GPD

Stopnja	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija dvov. DNK	94 °C	2 min
30 ciklov	Denaturacija	94 °C
	Prileganje	55 °C
	Podaljševanje	68 °C
Zaključevanje reakcije	68 °C	7 min
Hlajenje	4 °C	neomejeno

Preglednica 12: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnožitev *npfkA* z restriktijskima mestoma za encima *BamHI*, *HindIII* (za vključitev v vektor p426GPD)

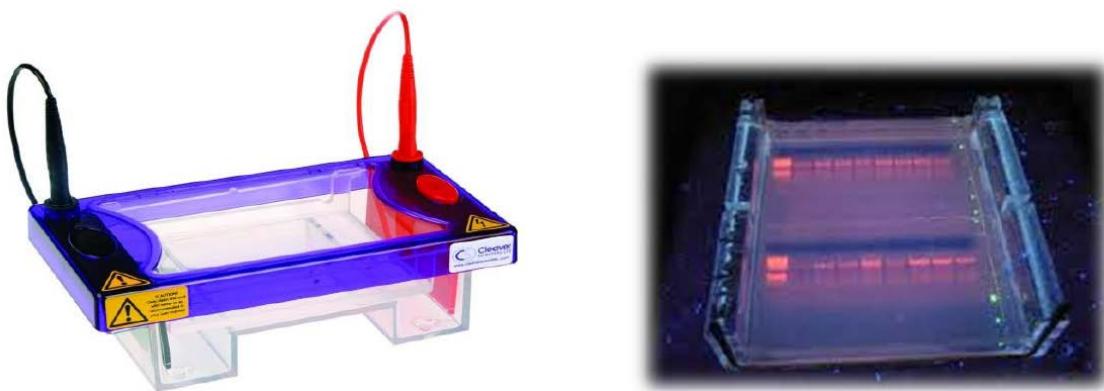
Začetni oligonukleotid	Zaporedje
pfk35 (t.i. smerni)	5'-AAGTAAGGATCCATGGCTCCCCCAAGC-3'
TEGI10 (t.i. protismerni)	5'-TTTCAAAGCTTTAACATTCTCATAGCAACTC-3'

Op.: V pfk35 je odebeleno zaporedje za restriktijsko mesto encima BamHI, v TEGI10 odebeleno restriktijsko mesto za HindIII.

3.4 PREVERJANJE PRODUKTA PCR Z AGAROZNO GELSKO ELEKTROFOREZO

3.4.1 Agarozna gelska elektroforeza

Elektroforeza je analitska tehnika, ki nam omogoča ločitev molekul v mešanici glede na njihovo molekulsko maso in elektrostatski naboj. Pri agarozni gelski elektroforezi se kot nosilec uporablja agarozna, iz katere se s pomočjo elektroforeznega pufra in barvila pripravi gel. Na gel, ki leži v elektroforezni banjici ter v ustreznom pufru se nanesejo molekule, ki jih želimo ločiti. Gel deluje kot molekulsko sito, zato večje molekule potujejo počasneje, manjše pa hitreje. Elektroforezno banjico priključimo na vir napetosti, da se v banjici ustvari električno polje. DNK, ki je negativno nabita molekula bo potovala proti pozitivni anodi, hitrost potovanja pa bo odvisna od njene velikosti. S pomočjo standarda nato določimo velikost ločenih DNK molekul (Boyer, 2005).



Slika 9: Ločitev molekul DNK na agaroznem gelu (Potočnik in Repnik, 2014: 12)

3.4.2 Priprava elektroforeznega gela

Na laboratorijski tehtnici smo zatehtali 1,2 g agaroze in jo v erlenmajerici zmešali s 100 ml pufra 1x TAE (pufer sestavljen iz tris baze, ocetne kisline in EDTA). Mešanico smo segrevali v mikrovalovni pečici 3 x po 40 s. Po 30 s smo v erlenmajerico dodali 2 µl etidijevega bromida. Gel smo hladili še dve minuti, nato pa ga ulili v elektroforezno banjico. Gel se je strjeval približno 45 min.

3.4.3 Izvedba elektroforeze

Na parafilmu smo zmešali 5 µl vzorca in 1 µl 6x nanašalnega pufra (pufer TAE). V mešanico ga dodamo toliko, da predstavlja 1/6 končnega volumna. Kot standard smo na gel nanesli 6 µl λDNA / EcoRI/HindIII oz. 6 µl velikostne lestvice DNA ladder. Elektroforeza je tekla 40 min pri napetosti 100 V.

3.4.4 Obdelava elektroforeznega gela

Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z ultravijolično lučjo, ki omogoči detekcijo na gelu ločene DNK, v katero se je vezal etidijev bromid. Gel smo nato fotografirali.

3.5 ČIŠČENJE PRODUKTA PCR

Produkt PCR smo očistili s komercialnim setom za čiščenje QIAQUICK-PCR purification kit (Qiagen, Los Angeles). Celotnemu volumnu pomnožka (vključek TE260, *npfkA*) smo dodali njegov 5 x volumen pufra PBI. Zmes smo prenesli v mikrocentrifugirko z membrano in centrifugirali 60 s na 13,4 x 10³ rpm. Eluat smo zavrgli, membrano pa sprali s 750 µl pufra PE in ponovno centrifugirali 60 s. Eluat smo zavrgli in ponovili centrifugiranje. Ločevalno kolono smo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Na sredino membrane smo nanesli 50 µl MQ in centrifugirali 1 min. Eluat je bila prečiščena DNK. Koncentracijo DNK po čiščenju smo izmerili z Nanodrop spektrofotometrom. Sestava pufrov v komercialnem setu za čiščenje ni bila podana.

3.6 RESTRIKCIJA VKLJUČKA TE260, *npfkA* IN EKSPRESIJSKIH VEKTORJEV

3.6.1 Restrikcija vključka TE260, *npfkA* in vektorja za izražanje genov p416GPD

V mikrocentrifugirki smo 2 µg DNK dodali 1 µl posameznega restrikcijskega encima, 5 µl ustreznega pufra, ki zagotavlja optimalno delovanje encimov in dodali MQ do volumna 50 µl. Restrikcijsko mešanico smo inkubirali 1 h 5 min na 37 °C. Encima smo dodali zaporedno. Sestava restrikcijske mešanice je podana v preglednicah 13, 14 ter 15.

Ustreznost restrikcijskih encimov in restrikcijskih pufrov smo preverili s pomočjo internetne strani Webcutter 2.0 (Heiman, 1997).

Preglednica 13: Sestava restriktivne mešanice za restrikcijo pomnožka *TE260* za ligacijo v vektor p416GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
DNK	<i>TE260</i>	85,9 ng/µl	23 µl
restrikc.encim 1	<i>XbaI</i>	/	1 µl
restrikc.encim 2	<i>BamHI</i>	/	1 µl
restrikc.pufer	Tango 10x	10 x	5 µl
voda	MQ	/	20 µl
Skupni volumen	/	/	50 µl

Preglednica 14: Sestava restriktivne mešanice za restrikcijo pomnožka *npfkA* za ligacijo v vektor p416GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
DNK	<i>npfkA</i>	125,9 ng/µl	16 µl
restrikc.encim 1	<i>XbaI</i>	/	1,5 µl
restrikc.encim 2	<i>BamHI</i>	/	1,5 µl
restrikc.pufer	Tango 10x	10 x	5 µl
voda	MQ	/	26 µl
Skupni volumen	/	/	50 µl

Preglednica 15: Sestava restriktivne mešanice za odpiranje vektorja p416GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
DNK	p416GPD	400,4 ng/µl	5 µl
restrikc.encim 1	<i>XbaI</i>	/	1 µl
restrikc.encim 2	<i>BamHI</i>	/	1 µl
restrikc.pufer	Tango 10x	10 x	5 µl
voda	MQ	/	38 µl
Skupni volumen	/	/	50 µl

3.6.2 Restrikcija vključka *TE260*, *npfkA* in vektorja za izražanje genov p426GPD

Restriktijski mapi vektorjev p416GPD in p426GPD se razlikujeta. Restriktijska encima, ki smo ju uporabili za rezanje vključkov pred ligacijo v plazmid p416GPD, sta bila za odpiranje plazmida p426GPD neuporabna. Zato smo pred ligacijo vključka *TE260* v plazmid p426GPD v DNK zaporedje vključkov s pomočjo PCR reakcije uvedli restriktijski mesti za encim *BamHI* na N term. koncu in za encim *HindIII* na C term. koncu.

Postopek priprave restriktijske mešanice je podan pod točko 3.6.1. Sestava restriktijskih mešanic je podana v preglednicah 16, 17 in 18.

Preglednica 16: Sestava restriktijske mešanice za restrikcijo pomnožka *TE260* za ligacijo v vektor p426GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
DNK	<i>TE260</i>	78,9 ng/µl	25 µl
restrikc.encim 1	<i>BamHI</i>	/	1,5 µl
restrikc.encim 2	<i>HindIII</i>	/	3 µl
restrikc.pufer	<i>BamHI</i>	/	5 µl
voda	MQ	/	15,5 µl
Skupni volumen	/	/	50 µl

Op.: Restriktijski encim *HindIII* ima oznako 2-fold Excess, kar pomeni, da v restrikc. mešanico dodajamo 2x volumen drugega restrikc. encima.

Preglednica 17: Sestava restriktijske mešanice za restrikcijo pomnožka *npfkA* za ligacijo v vektor p426GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
DNK	<i>npfkA</i>	92,2 ng/µl	22 µl
restrikc.encim 1	<i>BamHI</i>	/	1,5 µl
restrikc.encim 2	<i>HindIII</i>	/	3 µl
restrikc.pufer	<i>BamHI</i>	/	5 µl
voda	MQ	/	18,5 µl
Skupni volumen	/	/	50 µl

Preglednica 18: Sestava restrikcijske mešanice za odpiranje vektorja p426GPD

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
DNK	p426GPD	481,2 ng/µl	4 µl
restrikc.encim 1	<i>BamHI</i>	/	1,5 µl
restrikc.encim 2	<i>HindIII</i>	/	3 µl
restrikc.pufer	BamHI	/	5 µl
voda	MQ	/	36,5 µl
Skupni volumen	/	/	50 µl

3.6.3 Preverjanje uspešnosti restrikcije z agarozno gelsko elektroforezo

1,2 % agarozni gel smo pripravili po receptu na str. 27. Na gel smo nanesli 50 µl posamezne restrikcijske mešanice (vključek in vektor) in 10 µl nanašalnega pufra, ki smo ju predhodno zmešali. Za velikostno lestvico smo uporabili 6 µl λDNK/ EcoRI \ominus HindIII (ladder DNA do 10 kbaz).

3.6.4 Čiščenje DNK vključka TE260, *npfkA* in vektorja iz elektroforeznega gela

S skalpelom smo odrezali del gela, kjer smo pod UV lučjo zaznali iskano DNK. DNK smo očistili s komercialnim setom GEL EXTRACTION KIT (250) - Min Elute. Ker gel obdelujemo glede na njegovo težo, smo ga najprej stehtali. Težo gela smo dobili iz razlike med težama mikrocentrifugirke napolnjene z gelom in prazne mikrocentrifugirke. Po navodilih proizvajalca je 100 mg gela ekvivalentno 100 µl pufra, ki smo ga morali dodati. Stehtanemu gelu smo dodali 3 x volumen pufra QG. Mikrocentrifugirke smo stresali na temperaturi 50 °C 10 min. Pufru QG je dodan indikator pH, ki je v osnovi rumene barve (če je $\text{pH} \leq 7,5$) in se po raztopljanju gela ne sme spremeniti. Namreč le v tem območju pH je zagotovljena učinkovita absorptivnost membrane v čistilni koloni (znotraj mikrocentrifugirke). Če je velikost fragmenta DNK manjša od 400 bp in večja od 4 kbp dodamo 1 volumsko enoto izopropanola in zmešamo na vibrac. mešalu. Ker je velikost vektorja, ki smo ga čistili 5791 bp oz. 6606 bp smo dodali 180 µl izopropanola. Nato smo raztopino z DNK prenesli iz navadnih mikrocentrifugirk v mikrocentrifugirke QIAquick column in centrifugirali 1 min. Eluat smo zavrgli. Za izpiranje membrane smo uporabili 750 µl pufra PE in inkubirali 5 min. Nato smo centrifugirali 1 min. QIAquick kolono smo po centrifug. prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko. Za izpiranje smo dodali 50 µl MQ v center membrane in centrifugirali 1 min. Po čiščenju smo koncentracijo očiščenega razrezanega vključka TE260, *npfkA* in vektorjev p416GPD in p426GPD preverili z Nanodrop spektrofotometrom.

3.7 LIGACIJA VKLJUČKA V VEKTOR

3.7.1 Ligacija vključka TE260 v vektor p416GPD

Pri pripravi ligacijskih mešanic smo izhajali iz predpostavke, da mora biti za uspešno ligacijo v mešanici 100 ng plazmida. Pripadajoči volumen vključka smo izračunali s pomočjo naslednjih formul:

Preglednica 20: Sestava ligacijske mešanice za kontrolno ligacijo p416GPD (vključek TE260)

Sestavina	Ime	Količina
ligaza	T4 DNA ligaza	1 µl
vektor	p416GPD	7 µl
pufer	T4 ligazni pufer	2 µl
voda	MQ	10 µl
Skupni volumen	/	20 µl

3.7.2 Ligacija vključka *npfkA* v vektor p416GPD

Zopet smo izhajali iz predpostavke, da mora biti v ligacijski mešanici 100 ng plazmidne DNK. Pripadajoči volumen vključka smo izračunali, kot je predstavljeno na strani 32.

Preglednica 21: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka *npfkA* v vektor p416GPD

Sestavina	Ime	Količina
ligaza	T4 DNA ligaza	1 µl
vektor	p416GPD	2,5 µl
vključek	<i>npfkA</i>	14,5 µl
pufer	T4 ligazni pufer	2 µl
voda	MQ	/
Skupni volumen	/	20 µl

Preglednica 22: Sestava ligacijske mešanice za kontrolno ligacijo p416GPD (vključek *npfkA*)

Sestavina	Ime	Količina
ligaza	T4 DNA ligaza	1 µl
vektor	p416GPD	2,5 µl
pufer	T4 ligazni pufer	2 µl
voda	MQ	14,5 µl
Skupni volumen	/	20 µl

3.7.3 Ligacija vključka *TE260* v vektor p426GPD

V ligacijske mešanice smo zopet dodali 3 kratni volumen izračunanega volumna vključka *TE260*. Sestava ligacijskih mešanic je podana v preglednicah 23 in 24.

Preglednica 23: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka *TE260* v vektor p426GPD

Sestavina	Ime	Količina
ligaza	T4 DNA ligaza	1 µl
vektor	p426GPD	13,3 µl
vključek	<i>TE260</i>	3,7 µl
pufer	T4 ligazni pufer	2 µl
voda	MQ	/
Skupni volumen	/	20 µl

Preglednica 24: Sestava ligacijske mešanice za kontrolno ligacijo p426GPD (vključek *TE260*)

Sestavina	Ime	Količina
ligaza	T4 DNA ligaza	1 µl
vektor	p426GPD	13,3 µl
pufer	T4 ligazni pufer	2 µl
voda	MQ	3,7 µl
Skupni volumen	/	20 µl

3.7.4 Ligacija vključka *npfkA* v vektor p426GPD

Potreben volumen vključka *npfkA* za ligacijsko mešanico smo izračunali na enak način, kot za pripravo ostalih mešanic. Sestava mešanice je podana v preglednici 25.

Preglednica 25: Sestava ligacijske mešanice za ligacijo vključka *npfkA* v vektor p426GPD

Sestavina	Ime	Količina
ligaza	T4 DNA ligaza	1 µl
vektor	p426GPD	13,3 µl
vključek	<i>npfkA</i>	3,7 µl
pufer	T4 ligazni pufer	2 µl
voda	MQ	/
Skupni volumen	/	20 µl

Preglednica 26: Sestava ligacijske mešanice za kontrolno ligacijo p426GPD (vključek *npfkA*)

Sestavina	Ime	Količina
ligaza	T4 DNA ligaza	1 µl
vektor	p426GPD	13,3 µl
pufer	T4 ligazni pufer	2 µl
voda	MQ	3,7 µl
Skupni volumen	/	20 µl

3.8 TRANSFORMACIJA *E.coli* DH5α

3.8.1 Bakterijska transformacija in kompetenca

Genetska transformacija je proces, pri katerem se prosta DNK vključi v celico prejemnika in prinaša neko genetsko informacijo. Prejemnik lahko novo genetsko informacijo vgradi v lasten genom z rekombinacijo, lahko pa prejme informacijo v obliki plazmida, ki se podvojuje neodvisno od nukleoida. Za celico, ki je sposobna iz okolja prevzeti prosto DNK pravimo, da je kompetentna (Brock in sod., 1994).

Plazmidna vektorja p416GPD, p426GPD z vključkom TE260 oz. *npfkA* in plazmide kontrolne ligacije smo transformirali v komercialno pripravljene visoko kompetentne celice bakterije *E. coli* sev DH5α.

3.8.2 Izvedba transformacije

Kompetentne celice *E.coli* DH5α so bile pripravljene po metodi s CaCl₂ (Seidman in sod., 1997).

Kompetentne celice smo prenesli iz zamrzovalne skrinje (-80 °C) za 30 min na led. V posamezno mikrocentrifugirko z 200 µl predpripravljenih kompetentnih celic smo odpipetirali ves volumen ligacijskih mešanic (20 µl) rekombinantnega plazmida in kontrolne ligacije. Mešnice smo pustili na ledu 30 min, nato smo mikrocentrifugirke prenesli za 4 min na 42 °C. Po inkubaciji smo mikrocentrifugirke zopet prenesli na led za 2 min. Po temperaturnem šoku smo v vsako mikrocentrifugirko dodali 1 ml tekočega LB gojišča (dodan amp s konc. c = 50 mg/ml) in jih za 1 h prenesli v stresalnik na 37 °C in 350 rpm. Po pretečeni uri smo mikrocentrifugirke centrifugirali 3 min na 7000 rpm. Odvečni volumen smo odpipetirali stran, usedlino pa resuspendirali na vibracijskem mešalu. S hokejko smo ves volumen posameznih transformant razmazali na plošče LBA (LB dodan amp). Odpornost proti ampicilinu je kodirana na plazmidu. Plošče smo inkubirali v komori 16-18 h na 37 °C.

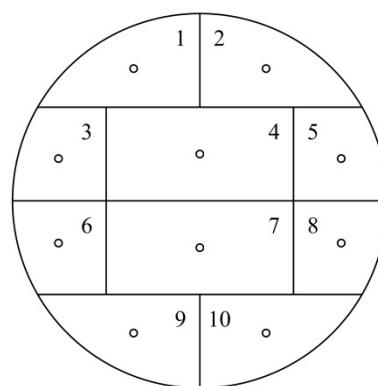
3.8.3 Pregled plošč s transformantami

Po 18 h smo gojitvene plošče pregledali. V kolikor je bila transformacija celic z rekombinantnim plazmidom uspešna, smo na LBA ploščah opazili rast bakterijskih kolonij. LBA plošče s transformantami kontrolne ligacije so morale ostati prazne. S tem smo preverili, da se vektor, ki smo ga odpirali z dvema restriktijskima encimoma ni samodejno ponovno zaprl (neprilegajoči konci plazmida).

3.9 POTRDITEV KONSTRUKTOV

3.9.1 Izvedba PCR za potrditev konstruktov v transformantah

Iz vsake plošče LBA s transformantami, ki so vsebovale rekombinanten plazmid, smo izbrali 10 kolonij, iz katerih smo izolirali plazmidno DNK z vstavljenim konstruktom. Nato smo izvedli PCR, pri kateri smo uporabili enake zač. oligonukleotide kot za namnoževanje posameznega vključka. Pred pripravo reakcijskih mešanic za PCR smo posamezno kolonijo precepili na svežo agarno ploščo. Ploščo smo inkubirali 16-18 h na 37 °C.



Slika 10: Shema nacepitve transformant na LBA ploščo

Po nacepitvi kolonij na agarno ploščo smo preostanek iste bakterijske kolonije prenesli v posamezno mikrocentrifugirko za plazmidno izolacijo. Plazmidno DNK smo izolirali po protokolu opisanem pod točko 3.2. Sestava reakc. mešanice za PCR in potek reakcije pomnoževanja sta podana v spodnjih preglednicah.

Preglednica 27: Sestava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje vsebnosti konstrukta (vključka TE260 v vektorju p416GPD)

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
Matrična DNK	Plazmidna DNK	54,8 ng/µl	1 µl
Začetni olig. 1	TEGI5 (746)	20 pmol/µl	1 µl
Začetni olig. 2	TEGI7 (2196)	20 pmol/µl	1 µl
dNTP	/	2,5 mM	1,6 µl
Mag.ioni	MgSO ₄	10 x	2 µl
PCR pufer	10 x pufer za polimerazo	10 x	2 µl
Polimeraza	PFX platinum	/	1 µl
Voda	MQ	/	10,4 µl
Skupni volumen	/	/	20 µl

Preglednica 28: Temperaturni program PCR (potrditev vključka TE260 v vektorju p416GPD)

Stopnja		Temperatura	Čas
Začetna denaturacija dvov. DNK		94 °C	5 min
30 ciklov	Denaturacija	94 °C	1 min
	Prileganje	55 °C	1 min
	Podaljševanje	68 °C	1,5 min
Zaključevanje reakcije		68 °C	7 min
Hlajenje		4 °C	neomejeno

Preglednica 29: Sestava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje vsebnosti konstrukta (vključek *npfkA* v vektorju p416GPD)

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
Matrična DNK	Plazmidna DNK	46,6 ng/ μ l	1 μ l
Začetni olig. 1	TEGI5 (746)	20 pmol/ μ l	1 μ l
Začetni olig. 2	pfk32 (882)	20 pmol/ μ l	1 μ l
dNTP	/	2,5 mM	1,6 μ l
Mag. ioni	MgSO ₄	10 x	2 μ l
PCR pufer	10 x pufer za polimerazo	10 x	2 μ l
Polimeraza	PFX platinum	/	1 μ l
Voda	MQ	/	10,4 μ l
Skupni volumen	/	/	20 μ l

Preglednica 30: Temperaturni program PCR (potrditev vključka *npfkA* v vektorju p416GPD)

Stopnja		Temperatura	Čas
Začetna denaturacija dvov. DNK		94 °C	5 min
30 ciklov	Denaturacija	94 °C	1 min
	Prileganje	55 °C	1 min
	Podaljševanje	68 °C	2,5 min
Zaključevanje reakcije		68 °C	7 min
Hlajenje		4 °C	neomejeno

Preglednica 31: Sestava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje vsebnosti konstrukta (vključek *TE260* v vektorju p426GPD)

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
Matrična DNK	Plazmidna DNK	60,2 ng/ μ l	1 μ l
Začetni olig. 1	pfk35 (1143)	20 pmol/ μ l	1 μ l
Začetni olig. 2	TEGI9 (2199)	20 pmol/ μ l	1 μ l
dNTP	/	2,5 mM	1,6 μ l
Mag. ioni	MgSO ₄	10 x	2 μ l
PCR pufer	10 x pufer za polimerazo	10 x	2 μ l
Polimeraza	PFX platinum	/	1 μ l
Voda	MQ	/	10,4 μ l
Skupni volumen	/	/	20 μ l

Preglednica 32: Temperaturni program PCR (potrditev vključka *TE260* v vektorju p426GPD)

Stopnja		Temperatura	Čas
Začetna denaturacija dvov. DNK		94 °C	5 min
30 ciklov	Denaturacija	94 °C	1 min
	Prileganje	55 °C	1 min
	Podaljševanje	68 °C	1,5 min
Zaključevanje reakcije		68 °C	7 min
Hlajenje		4 °C	neomejeno

Preglednica 33: Sestava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje vsebnosti konstrukta (vključek *npfkA* v vektorju p426GPD)

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
Matrična DNK	Plazmidna DNK	26,8 ng/ µl	2 µl
Začetni olig. 1	pfk35 (1143)	20 pmol/µl	1 µl
Začetni olig. 2	TEGI10 (2200)	20 pmol/µl	1 µl
dNTP	/	2,5 mM	1,6 µl
Mag. ioni	MgSO ₄	10 x	2 µl
PCR pufer	10 x pufer za polimerazo	10 x	2 µl
Polimeraza	PFX platinum	/	1 µl
Voda	MQ	/	9,4 µl
Skupni volumen	/	/	20 µl

Preglednica 34: Temperaturni program PCR (potrditev vključka *npfkA* v vektorju p426GPD)

Stopnja		Temperatura	Čas
Začetna denaturacija dvov. DNK		94 °C	5 min
30 ciklov	Denaturacija	94 °C	1 min
	Prileganje	55 °C	1 min
	Podaljševanje	68 °C	2,5 min
Zaključevanje reakcije		68 °C	7 min
Hlajenje		4 °C	neomejeno

Uspešnost PCR smo preverili z 1,2 % agarozno gelsko elektroforezo. Iskali smo pomnožek velikosti 1,4 kb (*TE260*) oz. 2,5 kb (*npfkA*).

3.10 NAMNOŽITEV TRANSFORMANT ZA SEKVENCIRANJE

Iz agarne plošče, ki smo jo inokulirali z bakterijskimi kolonijami sočasno s pripravo reakcijskih mešanic za PCR (za potrditev konstruktov), smo izbrali 4 kolonije v katerih smo z elektroforezo dokazali prisotnost vključka *TE260* oz. *npfkA* v posameznem vektorju. Bakterijske kolonije smo namnožili po protokolu pod točko 3.1.

3.11 IZOLACIJA REKOMBINANTNIH PLAZMIDOV ZA SEKVENCIRANJE

Po namnožitvi bakterijskih kolonij, v katerih smo potrdili vsebnost rekombinantnega plazmida, je sledila plazmidna izolacija in priprava raztopin za sekvenciranje (določanje nukleotidnega zaporedja). Izoliranim rekomb. plazmidom smo z Nanodrop spektrofotometrom izmerili koncentracijo.

Reakcijske mešanice za sekvenciranje smo pripravili tako, da so vsebovale 50-100 ng/ μ l plazmidne DNK v 15 μ l mešanice v 2 ml mikrocentrifugirki. V mešanice smo dodali tudi 1 μ l ustreznega zač. oligonukleotida s konc. 15 pmol/ μ l. Reakcijske mešanice s smernim, notranjim in protismernim začetnim oligonukleotidom smo pripravili ločeno.

3.12 PRIPRAVA GOJIŠČ ZA KVASOVKE *S. cerevisiae* SEV HD114 -8D (ZA VNOS KONSTRUKTOV)

3.12.1 Priprava trdnega gojišča YEPGE

Vse sestavine smo zmešali v manjši časi na magnetnem mešalu, da so se popolnoma raztopile. Vsebino smo nato prelili v merilni valj in dopolnili manjkajoči volumen z destilirano vodo do 245 ml. Mešanico smo prelili v 250 ml erlenmajerico in jo zamašili z vato. Gojišče smo avtoklavirali, ga po avtoklaviranju ohladili na približno 50 °C in mu dodali 5 ml etanola. Še toplega smo razlili v petrijevke. 250 ml gojišča zadostuje za pripravo 10 plošč. Plošče smo pustili v digestoriju en dan, da se je agar primerno strdil.

Preglednica 35: Sestava trdnega gojišča YEPGE (za 250 ml oz. 10 plošč)

Sestavina	Masa/Volumen
Kvasni ekstrakt	2,5 g
Baktopepton	2,5 g
Agar	3,75 g
Glicerol	5 ml
dH ₂ O	do 245 ml
Etanol (po avtokl.)	5 ml

3.12.2 Priprava tekočega gojišča YEPGE

Tekoče gojišče smo pripravili v 200 ml erlenmajerici v kateri smo na magnetnem mešalu zmešali zatehtane sestavine in dodali destilirano vodo. Podane količine ustrezajo pripravi 100 ml gojišča YEPGE. Za svoje potrebe smo pripravili 200 ml (20 epruvet z 10 ml gojišča – miniprep).

Preglednica 36: Sestava tekočega gojišča YEPGE (za 100 ml)

Sestavina	Masa/Volumen
Kvasni ekstrakt	1 g
Baktopepton	1 g
Glicerol	2 ml
dH ₂ O	do 98 ml
Etanol (po avtokl.)	2 ml

3.12.3 Priprava gojišča Sc-ura, GE za gojenje izhodnega seva

Gojišče smo pripravili v 500 ml erlenmajerici, v kateri smo na magnetnem mešalu zmešali zatehtane sestavine in dodali destilirano vodo. Erlenmajerico smo zamašili z vato in avtoklavirali 20 min pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo dodali 10 ml 10 x kvasne dušikove osnove z/ali brez amonijevega sulfata, brez aminokislin in etanol. Podane količine ustrezajo pripravi 100 ml gojišča Sc-ura. Za svoje potrebe smo pripravili 100 ml.

Preglednica 37: Sestava gojišča Sc-ura, GE (za 100 ml)

Sestavina	Masa/Volumen
Sintetični kvasni dopolnilni medij brez uracila (Sigma Y1501)	0,192 g
Glicerol	2 ml
Agar	1,5 g
dH ₂ O	do 88 ml
10 x kvasna dušikova osnova, z/ali brez amonijevega sulfata, brez aminokislin (Sigma Y1251) (po avtokl.)	10 ml
Etanol (po avtokl.)	2 ml

3.12.4 Priprava gojišča Sc-ura z drugimi viri ogljika za testiranje transformant

Gojišče Sc-ura, GE, ki smo ga uporabili za gojenje izhodnega seva kvasovk, smo modificirali tako, da smo glicerol in etanol nadomestili z drugim virom ogljika. Glicerol in etanol sta nefermentativna sladkorja, ki omogočata rast kvasovk *S. cerevisiae* seva HD114-8D, ki nimajo encimov PFK. Sev HD114-8D z vnesenimi konstrukti smo testirali na gojiščih z dodano glukozo, fruktozo in maltotozo.

Pripravili smo gojišča z 1 % sladkorjem. Vsakega po 10 plošč. V 200 ml čaši smo na magnetnem mešalu zmešali vse zatehtane sestavine z 90 ml destilirane vode. Gojišča smo prelili v erlenmajerice, jih zamašili z vato in avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo dodali kvasno dušikovo osnovo, z dodanim amon sulfatom.

Preglednica 38: Sestava gojišča Sc-ura, glukoza; Sc-ura, fruktoza; Sc-ura, maltoza (za 100 ml)

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

3.12.4.1 Priprava založne raztopine amon sulfata

Za pripravo gojišča Sc-ura, glu; Sc-ura, fru ; Sc-ura, mal smo potrebovali 10 x kvasno dušikovo osnovo brez aminokislin (Sigma Y1251) z dodanim amon sulfatom. Zato smo pripravili 250 ml založne raztopine. Raztopino smo sterilno filtrirali z vodno črpalko s filtrom Vacuum filtration system (Sigma - Aldrich, Tewksbury).

Preglednica 39: Sestava založne razt. za Sc-ura, glukoza (za 100 ml)

Sestavina	Masa/Volumen
Kvasna dušikova osnova brez amonijevega sulfata, brez aminokislin (Sigma Y1251)	1,7 g
Amon sulfat	5 g
dH ₂ O	do 100 ml

Vsa gojišča smo pred razlitjem avtoklavirali 20 min pri 100 °C in 1-1,2 bara. Še vroča smo razlili v brezprašni komori in jih pustili, da so se strjevala približno 1 dan.

3.13 NACEPITEV KVASOVKE *S. cerevisiae*

3.13.1 Nacepitev na trdno gojišče

Na gojitveno ploščo YEPGE smo nacepili kvasovko *S. cerevisiae* HD114-8D za transformacijo kvasovke z rekombinantnimi plazmidi (p416GPD+TE260, p416GPD+npfkA, p426GPD+TE260, p426GPD+npfkA). Ploščo smo inkubirali 4 dni na 30 °C.

3.13.2 Nacepitev v tekoče gojišče

Na gojitveni plošči YEPGE smo izbrali kolonijo kvasovk in jo z ezo precepili v 100 ml tekočega gojišča YEPGE. Gojišče s kvasovkami smo inkubirali na stresalniku, na 30 °C, pri 120 rpm do optične gostote OD₆₀₀ = 1 (približno po 26 h). Spektrofotometer smo pred merjenjem umerili s čistim gojiščem, tekočim YEPGE.

3.14 TRANSFORMACIJA KVASOVKE *S. cerevisiae*

3.14.1 Izolacija rekombinantnih plazmidov

Bakterijske kolonije, v katerih smo s sekvenciranjem potrdili ustrezone konstrukte, smo nacepili v 10 ml tekočega gojišča LB z dodanih 10 µl ampicilina (c=50 mg/ml). Gojišča smo inkubirali na stresalniku, 16-18 h na 37 °C. Naslednji dan smo izolirali plazmidno DNK.

3.14.2 Priprava reagentov za transformacijo

3.14.2.1 Priprava 1M raztopine litijevega acetata

Litijev acetat smo pripravili kot 1 M založno raztopino v MQ. Pripravili smo 100 ml raztopine.

Natehtali smo 10,2 g litijevega acetata in dotočili MQ do 100 ml. Raztopino smo sterilizirali s pomočjo injekcije in filtra s premerom por 0,2 µm. Litijev acetat smo shranili v 50 ml sterilne falkonke.

3.14.2.2 Priprava 0,15 M raztopine polietilen glikola

PEG z M_{PEG} = 3350 g/mol smo pripravili kot 50 % (w/v) z MQ in sterilno filtracijo. V 150 ml čašo smo zatehtali 50 g PEG in dodali 35 ml MQ. Raztopino smo mešali na magnetnem mešalu, dokler se PEG ni popolnoma raztoplil. Nato smo vso tekočino prenesli v 100 ml bučko. V bučko smo dodali MQ do 100 ml in raztopino zmešali z obračanjem bučke. Raztopino smo sterilizirali z injekcijo in 0,45 µm filtrom v falkonko. PEG je zelo viskozen, zato je bilo potrebno biti pri pripravi zelo previden. Že majhne variacije v koncentraciji

PEG od koncentracijskega optimuma v transformacijski reakciji (ta je 33 % (w/v)) namreč lahko zmanjšajo produkциjo transformant.

3.14.3 Transformacija

Transformacijo kvasovke *S. cerevisiae* HD114-8D z rekombinantnimi plazmidi s pomočjo litijevega acetata smo izvedli po prilagojenem članku (Gietz in Woods, 2002). 100 ml kulture kvasovk v eksponentni fazи rasti smo razdelili v predhodno ohlajene centrifugirke. Vse nadaljnje korake transformacije smo izvajali na ledu oz. v centrifugi ohlajeni na 4 °C.

Kulturo smo najprej centrifugirali 2 x po 5 min na 3000 x g pri 4 °C. Supernatant smo odlili, usedlino pa resuspendirali v 1 ml MQ in prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko. Mikrocentrif. smo centrifugirali 30 s na 16000 x g pri 4 °C. Supernatant smo ponovno odlili in usedlino resuspendirali v 1 ml MQ. Suspenzijo celic smo razdelili v volumske alikvote po 100 µl in centrif. 30 s na 16000 x g pri 4 °C. Supernatant smo zavrgli in k posamezni usedlini celic dodali 360 µl posamezne transformacijske mešanice. Sestava transf. mešanice je podana v preglednici št. 40.

Preglednica 40: Sestava transformacijske mešanice

Sestavina	Volumen
PEG 3500 50 % (w/v)	240 µl
Litijev acetat 1M	36 µl
ssDNK (2 mg/ml)*	50 µl
Plazmid (1µg) + MQ	34 µl
Skupni volumen	360 µl

* Nosilna ssDNK (2 mg/ml) je bila v sterilnem pufru TE raztopljena natrijeva sol tipa III DNK lososovih testisov (Sigma), ki je bila hranjena na -20 °C v alikvotih po 500 µl in smo jo tik pred dodajanjem v mešanico inkubirali v vodni kopeli pri 100 °C.

Pri transformaciji kvasovk smo izvedli dve negativni kontroli. Pri prvi smo v transformacijski mešanici uporabili oba nerezana plazmida (p416GPD, p426GPD). Za transformante smo pričakovali, da bodo rasle na gojišču Sc – ura, GE; na sladkornih gojiščih pa ne (glikoliza brez genov *pfk* ne more teči).

Kot drugo negativno kontrolo transformacije smo uporabili transformacijsko mešanico brez plazmida. Uporabljen sev kvasovk so avksotrofi za uracil, kar pomeni, da ga same niso sposobne sintetizirati. Za rast in delitev morajo nukleotid pridobiti iz okolja. Ker gojišče Sc – ura, GE ni vsebovalo uracila, smo pričakovali, da kvasovke ne bodo zrasle. Sestava kontrolne transformacijske mešanice je podana v preglednici št. 41.

Preglednica 41: Sestava kontrolne transformacijske mešanice

Sestavina	Volumen
PEG 3500 50 % (w/v)	240 µl
Litijev acetat 1 M	36 µl
ssDNK(2 mg/ml)*	50 µl
<u>MQ</u>	<u>34 µl</u>
Skupni volumen	360 µl

V vsako mikrocentrif. smo odpipetirali 326 µl transform. mešanice in naknadno dodali 34 µl plazmida z ustreznim vključkom. Celice smo resuspendirali na vibracijskem mešalu in inkubirali 40 min pri 42 °C.

Nato smo jih 30 s centrifugirali na 16000 x g pri 4 °C, odstranili supernatant in posamezno usedlino resuspendirali v 1 ml MQ. 200 µl posamezne suspenzije smo s hokejko razmazali na ploščo Sc – ura, GE in plošče inkubirali 1 teden na 30 °C.

3.14.4 Preverjanje uspešnosti transformacije s PCR na osnovi kolonije

Po enotedenski inkubaciji plošč smo uspešnost transformacije preverili s PCR na osnovi kolonije. PCR na osnovi kolonije je v principu enaka klasični PCR, le da pri tej različici dobimo matrično DNK direktno iz bakterijskih oz. kvasnih kolonij. Predhodna izolacija DNK ni potrebna. V ta namen moramo celice prekuhati, da pridobimo celični lizat (Danevčič in sod., 2008) ali jih v 1. ciklu PCR reakcije nekoliko dlje izpostaviti temperaturi denaturacije.

Z vsake gojitvene plošče Sc – ura, GE smo izbrali 3 kolonije in posamezno kolonijo s cepilno zanko prenesli v mikrocentrif. s 25 µl 20 mM NaOH. Suspenzije smo najprej inkubirali v vodni kopeli 6 min na 100 °C. Lizat celic je služil kot vir DNK za PCR na osnovi kolonije.

Preglednica 42: Sestava reakcijske mešanice za PCR na osnovi kolonije

Sestavina	Ime	Koncentracija	Količina
Matrična DNK	Suspenzija kolonije v 25 µl 20 mM NaOH	/	1 µl
Začetni olig. 1	/	100 pmol/µl	0,5 µl
Začetni olig. 2	/	100 pmol/µl	0,5 µl
dNTP	/	5 mM	2 µl
Mag. ioni	MgCl ₂	25 mM	2,5 µl
PCR pufer	PCR buffer for Taq polymerase (brez Mg ionov)	10 x	2,5 µl
Polimeraza	Taq	5 U/µl	0,5 µl
Voda	MQ	/	15,5 µl
Skupni volumen	/	/	25 µl

Kot pozitivno kontrolo smo v isti PCR reakciji pomnoževali tudi izolate rekombinantnih plazmidov, ki smo jih uporabili za transformacijo kvasovk. Založne raztopine plazmidov smo redčili tako, da smo imeli v reakcijski mešanici za PCR približno 30 ng rekomb. plazmida. Koncentracijo plazmida smo določili z Nanodrop spektrofotometrom. Za pomnoževanje smo uporabili enake kombinacije zač. oligonukleotidov kot pri pomnoževanju DNK iz kvasne suspenzije.

Za negativno kontrolo transformacije smo uporabili kolonije seva HD114-8D z vstavljenim praznim plazmidom.

Preglednica 43: Par uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje posameznega konstrukta v vektorju p416GPD oz. p426GPD

Vključek/Vektor	Začetni olig. 1 / Začetni olig. 2
TE260/p416GPD	TEGI5 (746), TEGI7 (2196)
npfkA/p416GPD	TEGI5 (746), pfk32 (882)
TE260/p426GPD	pfk35 (1143), TEGI9 (2199)
npfkA/p426GPD	pfk35 (1143), TEGI10 (2200)

Preglednica 44: Temperaturni program PCR reakcije za preverjanje uspešnosti transformacije

Stopnja	Temperatura	Čas
Liza celic, začetna denaturacija	95 °C	5 min
30 ciklov	Denaturacija	95 °C
	Prileganje	55 °C
	Podaljševanje	72 °C
Zaključevanje reakcije	72 °C	10 min
Hlajenje	4 °C	neomejeno

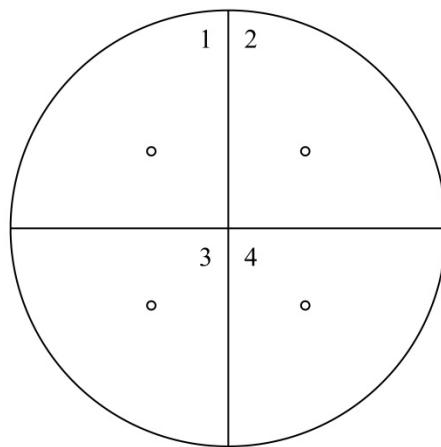
Ustreznost PCR pomnožkov smo preverili z 1,2 % agarozno gelsko elektroforezo.

3.15 GOJENJE KVASOVKE *S. cerevisiae* NA SELEKCIJSKIH GOJIŠČIH

Izmed treh kvasnih kolonij, s katerimi smo izvajali PCR na osnovi kolonije, smo za nadaljnje delo izbrali po eno kvasno kolonijo za vsakega izmed štirih konstruktor. Izbrane kolonije smo iz izvorne plošče Sc – ura, GE precepili v 10 ml tekočega gojišča YEPGE in stresali 70 h na 30 °C in 130 rpm. Po 70 h smo izmerili OD₆₀₀.

Kvasovke smo iz tekočega gojišča YEPGE precepili na gojišče Sc-ura, glukoza; Sc-ura, fruktoza; Sc-ura, maltoza z 1 % sladkorja ter na trdni gojišči YEPGE in Sc – ura, GE.

Plošče smo inkubirali 1 teden na 28 ° C.



Slika 11: Način nacepitve kvasovk s posameznim konstruktom na selekcijska gojišča

Preglednica 45: Oštevilčenje konstrukta na gojitveni plošči

Številka na plošči Konstrukt v kvasni koloniji

- | | |
|---|-----------------------|
| 1 | <i>npfkA /p416GPD</i> |
| 2 | <i>npfkA/p426GPD</i> |
| 3 | <i>TE260/p416GPD</i> |
| 4 | <i>TE260/p426GPD</i> |
-

4 REZULTATI

4.1 KLONIRANJE GENA ZA KRATKI FRAGMENT IN NATIVNI ENCIM PFK1 GLIVE *A. niger*

Gen, ki kodira kratek fragment encima PFK1 *TE260* se je prvotno nahajal v plazmidnem vektorju pALTER, gen za nativni encim pa v vektorju pJJH71 (Usenik, 2011). Ker smo se odločili za zamenjavo vektorjev za izražanje genov, smo posamezen gen pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo. V poliklonskem mestu novega vektorja (p416GPD, p426GPD) smo izbrali primerna restrikcijska encima, s katerima smo vektor kasneje linearizirali. Izbrali smo dva različna encima, da so se pri odpiranju plazmida ustvarili nekompatibilni konci in se vektor brez vključka ne bi mogel več zapreti (kombinacija uporabljenih restrikta je podana v preglednici št. 49). Pred tem smo na spletni strani Webcutter 2.0 preverili, da izbrani restrikcijski encimi ne režejo znotraj posameznega vključka. Po določitvi ustrezne orientacije vključka, smo s PCR metodo v vključke na 5' in 3' koncu uvedli nova restrikcijska mesta, ki se bodo prilegala v rezan tarčni plazmid. Namnoževanje vključkov in uvedbo novih restrikcijskih mest smo izvajali hkrati. Uporabljeni začetni oligonukleotidi so podani v preglednici št. 46.

Preglednica 46: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za namnoževanje skrajšanega in nativnega gena *npfkA*

Vključek / Vektor	Začetni olig. 1/ Začetni olig.2
<i>TE260</i> / p416GPD	TEGI5 (746), TEGI7 (2196)
<i>TE260</i> / p426GPD	pfk35 (1143), TEGI9 (2199)
<i>npfkA</i> / p416GPD	TEGI5 (746), pfk32 (882)
<i>npfkA</i> / p426GPD	pfk35 (1143), TEGI10 (2200)

Preglednica 47: Zaporedja začetnih oligonukleotidov s prilagojenimi restrikcijskimi mesti za ligacijo v plazmid p416GPD

Začetni oligonukleotid	Zaporedje
TEGI5 (t.i. smerni)	5'-CATCGCTCTAGA ATG GCTCCCCCAAGCTCC-3'
TEGI7 (t.i. protismerni)	5'-TTTCAGGATCCT TA CCCAGGATCATAGTGCC-3'
pfk32 (t.i. protismerni)	5'-AGCTGTGGATCCT TA AGCATTCTCAT-3'

Op.: V TEGI5 je odenbeljeno zaporedje za restrikcijsko mesto encima *XbaI*, zeleno je obarvan začetni kodon. V TEGI7 in pfk32 je odenbeljeno restrikcijsko mesto za *BamHI* in modro obarvan stop kodon.

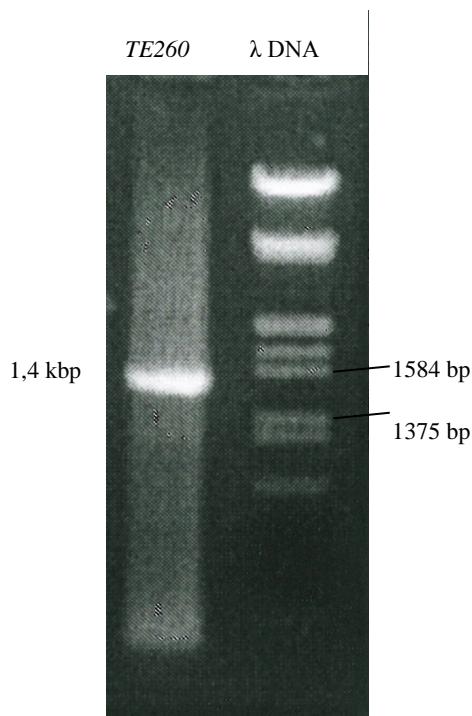
Preglednica 48: Zaporedja začetnih oligonukleotidov s prilagojenimi restrikcijskimi mesti za ligacijo v plazmid p426GPD

Začetni oligonukleotid	Zaporedje
pfk35 (t.i. smerni primer)	5'- AAGTAAGGATCC ATG GCTCCCCCAAGC -3'
TEGI9 (t.i. protismerni primer)	5'-TTTCAAAGCTT TTA CCGGGATCATAGTGCC-3'
TEGI10 (t.i. protismerni primer)	5'-TTTCAAAGCTT TTA AGCATTCTCATAGCAACTC-3'

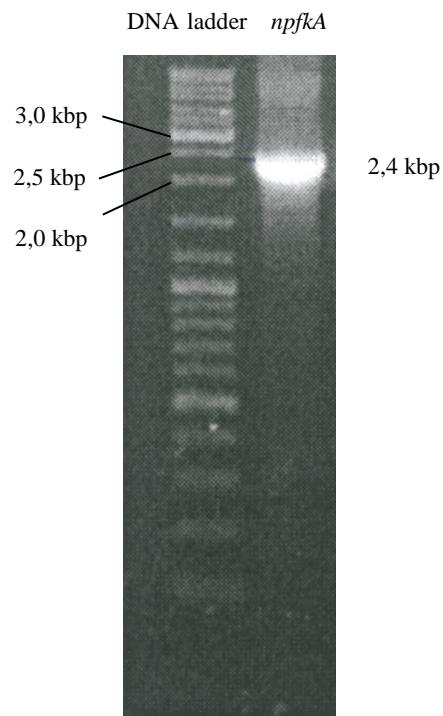
Op.: V pfk35 je odbeljeno zaporedje za restrikcijsko mesto encima *BamHI*, zeleno je obarvan začetni kodon. V TEGI9 in TEGI10 je odbeljeno restrikcijsko mesto za *HindIII* in modro obarvan stop kodon.

Za vnos specifičnih restrikcijskih mest smo zaporedje začetnih oligonukleotidov strukturirali tako, da smo prvih šest baz izbrali naključno, sledilo je zaporedje izbranega restrikcijskega encima, nato začetni kodon ATG oz. stop kodon TAA. Na koncu smo vključili še zaporedje 11 – 19 baz, ki je nalegal na sekvenco, ki smo jo pomnoževali. Temperaturo tališča začetnih oligonukleotidov in s tem temperaturo naleganja pri PCR reakciji smo določili s pomočjo internetne strani promega (Promega, 2014).

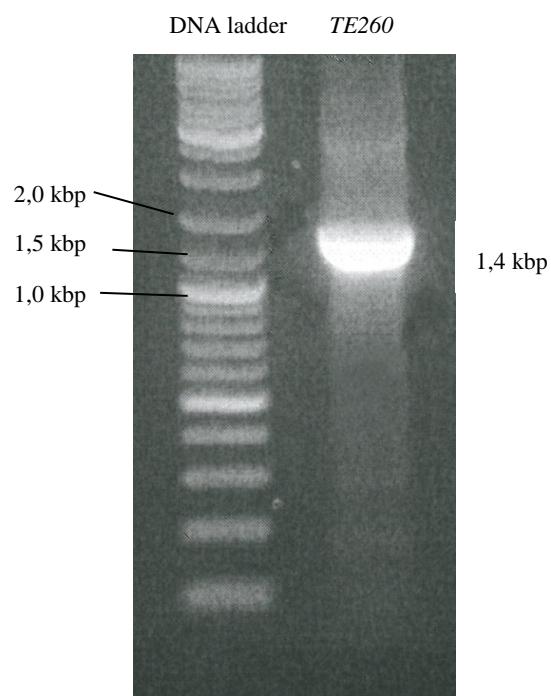
Uspešnost pomnoževanja posameznega vključka smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.



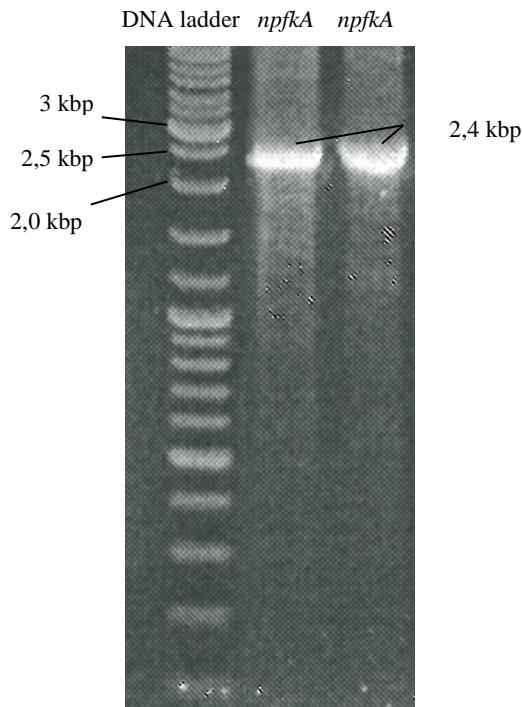
Slika 12: Gelska elektroforeza pomnoženega vključka TE260 za ligacijo v plazmid p416GPD, DNK velikostna lestvica: Lambda DNA / *EcoRI* + *HindIII* Marker (pričakovana velikost na gelu 1369 bp)



Slika 13: Gelska elektroforeza pomnoženega vključka *npfkA* za ligacijo v plazmid p416GPD, DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 2454 bp)



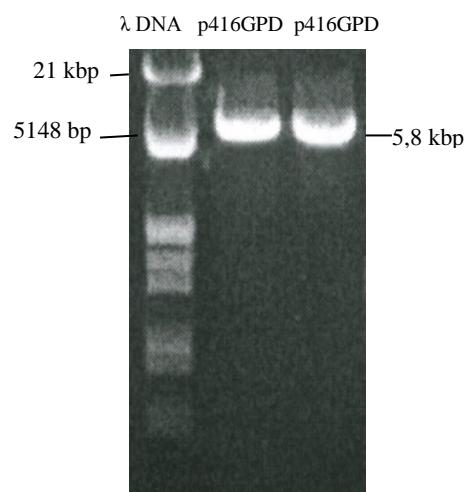
Slika 14: Gelska elektroforeza pomnoženega vključka *TE260* za ligacijo v plazmid p426GPD, DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 1369 bp)



Slika 15: Gelska elektroforeza pomnoženega vključka *npfkA* za ligacijo v plazmid p426GPD, DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 2454 bp)

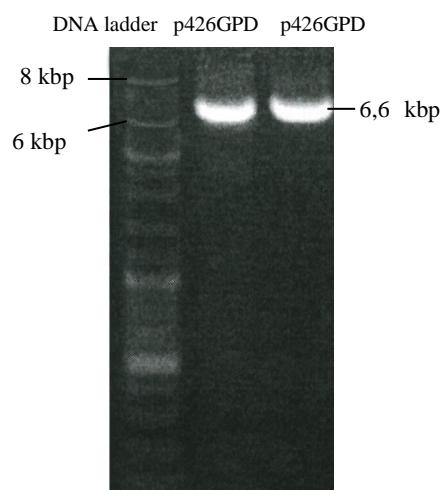
4.2 RESTRIKCIJA VKLJUČKOV IN VEKTORJEV ZA IZRAŽANJE GENOV

Restriktionska encima za odpiranje vektorja p416GPD smo določili z analizo poliklonskih mest s pomočjo internetne strani Addgene. Aplikacija omogoča analizo vnesenega gena – ali izbrani encimi režejo tudi znotraj DNK zaporedja. Za rezanje vektorja p416GPD smo izbrali encima *XbaI* za N terminal in *BamHI* za C terminalni konec. Za restrikcijo obeh vključkov smo uporabili iste encime, da se ustvarijo prilegajoči konci.



Slika 16: Gelska elektroforeza p416GPD po restrikciji z *XbaI* ter *Bam HI*; DNK velikostna lestvica: Lambda DNA / *EcoRI* + *HindIII* Marker (pričakovana velikost na gelu 5,8 kbp)

Za insercijo vključkov v drugi vektor p426GPD smo imeli prav tak namen uporabiti encima *XbaI* ter *BamHI*. Ker v času izvedbe laboratorijskega dela analiza *in silico* (latinska besedna zveza, ki se v naravoslovju nanaša na procese in poskuse, ki potekajo virtualno s pomočjo računalnika - v silicijevem čipu) za ta vektor ni bila na voljo oz. je bila nepopolna, smo se zanašali na znanstveni članek na osnovi katerega smo izvajali delo (Mumberg in sod., 1995). Vendar se je na osnovi agarozne gelske elektroforeze izkazalo, da izbrana encima ne odpreta vektorja, zato smo ju zamenjali za restriktazi *EcoRI* in *HindIII*. Ko smo z omenjenima encimoma rezali vključka pred ligacijo v vektor, je analiza z gelsko elektroforezo pokazala popolnoma razrezana vključka. S pomočjo internetne aplikacije Webcutter 2.0 smo ugotovili, da je za razrez kriv encim *EcoRI*, ki reže znotraj vključkov. Zato smo zamenjali smerni začetni oligonukleotid in uvedli restrikcijsko mesto za *BamHI*. Protismerni začetni oligonukleotid je ostal enak.



Slika 17: Gelska elektroforeza p426GPD po restrikciji z *BamHI* ter *HindIII*; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 6,6 kbp)

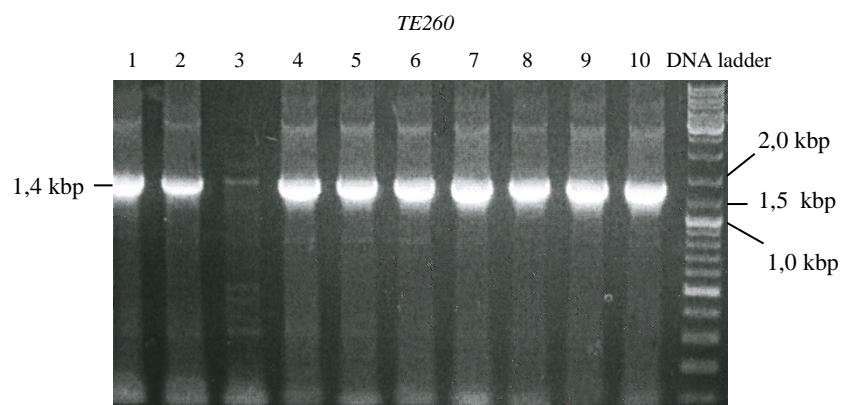
4.3 LIGACIJA IN TRANSFORMACIJA V *E. coli*

Uspešnost ligacije vključka v vektor je potrdila rast transformant na gojišču LBA z dodanim ampicilinom. Zrasle so le tiste transformante bakterije *E. coli*, ki so uspešno prejele plazmid. Na plazmidu je namreč kodirana rezistenca na antibiotik ampicilin. Sočasno z izvedbo transformacije z ligacijskimi mešanicami smo izvedli tudi t.i. kontrolno transformacijo. Služila je kot kontrola ligacije. Kontrolne ligacije so vsebovale le rezan plazmid brez vključkov. Zaradi neprilegajočih se koncev se vektor praviloma ne sme več zapreti. Za nadaljnje delo smo se odločili le, če so bile gojitvene plošče s transformantami števne (od 30 do 300 bakterijskih kolonij) in plošče s transformantami kontrolne ligacije prazne.

4.4 PLAZMIDNA IZOLACIJA IN PCR ZA POTRDITEV KONSTRUKTOV

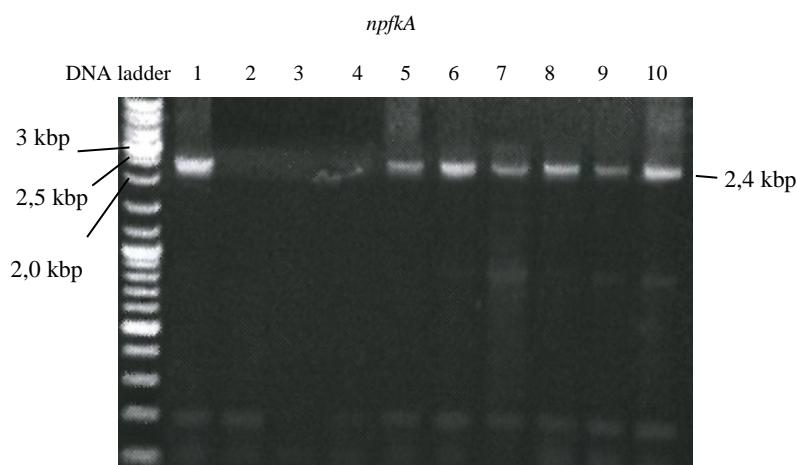
Po ligaciji konstruktov v ekspresijske vektorje smo z ligacijskimi mešanicami transformirali bakterijo *E. coli* DH5α. Iz vsake ligacijske plošče s transformantami smo

izbrali 10 kolonij iz katerih smo izolirali plazmidno DNK. Nato smo izvedli PCR, da smo ugotovili prisotnost vnesenega vključka *TE260* oz. *npfkA*. Za pomnoževanje smo uporabili enake začetne oligonukleotide kot za osnovno namnoževanje konstruktov (glej preglednico 46). Ali posamezne transformante vsebujejo pravi konstrukt, smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.



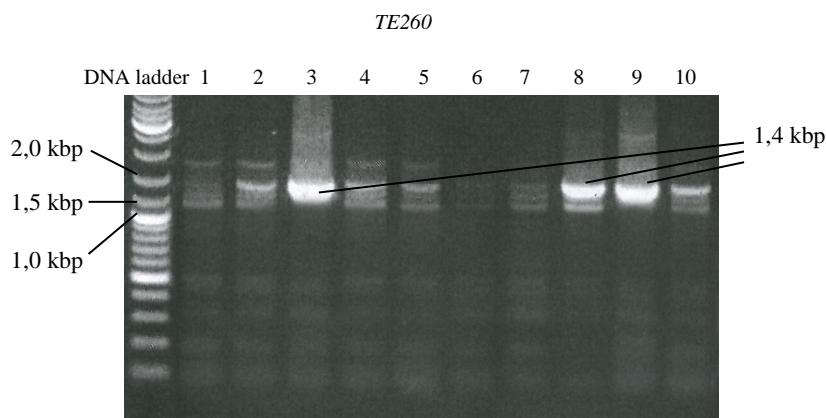
Slika 18: Gelska elektroforeza vključka *TE260* v plazmidu p416GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 1,4 kbp)

Z gelsko elektroforezo smo potrdili devet pozitivnih izolatov, le izolat št. 3 ni vseboval želenega vključka.



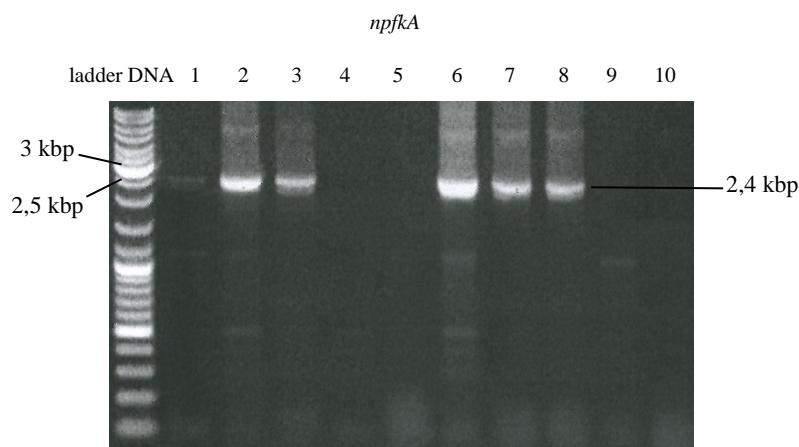
Slika 19: Gelska elektroforeza vključka *npfkA* v plazmidu p416GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 2,4 kbp)

Konstrukt *npfkA* v p416GPD smo zaznali v 70 % testiranih izolatov. Izolati št. 2, 3, 4 niso vsebovali nativnega gena.



Slika 20: Gelska elektroforeza vključka *TE260* v plazmidu p426GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 1,4 kbp)

Prisotnost konstrukta *TE260* v p416GPD smo potrdili v izolatih št. 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10. Za nadaljnje delo smo izbrali plazmidne izolate št. 3, 8 in 9.



Slika 21: Gelska elektroforeza vključka *npfkA* v plazmidu p426GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder (pričakovana velikost na gelu 2,4 kbp)

Gen za nativni encim PFK1 smo dokazali v 50 % izolatov. Pozitivni so bili izolati št. 2, 3, 6, 7, 8.

4.5 POTRDITEV KONSTRUKTOV S SEKVENCIRANJEM

Uspešnost pravilnega namnoževanja vnesenih genov *TE260* in *npfkA* po vnosu v tarčna plazmida p416GPD, p426GPD smo preverili s sekvenciranjem. Pri pripravi mešanic za sekvenciranje smo uporabili enake začetne oligonukleotide, kot v primeru namnoževanja konstrukta in kasneje pri PCR na osnovi kolonije. Pri pripravi mešanic za sekvenciranje genov za nativni encim je bilo potrebno dodati tudi notranji začetni oligonukleotid. Sekvenciranje je namreč zanesljivo le približno 1000 bp od naleganja zač. oligonukleotida.

Za sekvenciranje gena *npfkA* dolžine 2454 bp smo dodali notranji smerni zač. oligonukleotid PFKAS (1275).

Preglednica 49: Zaporedje notranjega smernega začetnega oligonukleotida uporabljenega za sekvenciranje gena *npfkA*

Začetni oligonukleotid	Zaporedje
PFKAS (1275) (t.i. notranji smerni)	5'- ATGTGCGCTTCATTACC -3'

Sekvenciranje zaporedij je opravilo podjetje Eurofins Genomics preko spletnega naročila (Eurofins Genomics, 2014).

Pri pripravi mešanic za PCR smo hkrati na svežo ploščo LBA precepili istih deset bakterijskih kolonij, v katerih smo preverjali prisotnost konstrukta. Izmed teh desetih smo glede na pozitivnost rezultata (na agarozni gelski elektroforezi) oz. glede na ustreznost sekvene za nadaljnje delo izbrali kolonije podane v spodnji preglednici.

Preglednica 50: Zaporedna številka kolonije transformant na gojitveni plošči LBA v katerih smo s sekvenciranjem potrdili ustreznost vnešenega konstrukta

Konstrukt v plazmidu	Plazmid izoliran iz bakterijske kolonije z zaporedno št.
<i>TE260</i> v p416GPD	kolonija 7
<i>npfkA</i> v p416GPD	kolonija 1
<i>TE260</i> v p426GPD	kolonija 3
<i>npfkA</i> v p426GPD	kolonija 2

Plazmidom, ki smo jih izbrali za nadaljnje delo smo izmerili koncentracijo z Nanodrop spektrofotometrom za pripravo primernih redčin za transformacijske mešanice. Koncentracije plazmidov s konstruktmi so podane v preglednici št. 52.

Preglednica 51: Založne koncentracije plazmidov s konstruktmi izmerjene z Nanodrop spektrofotometrom

Konstrukt v plazmidu	Izmerjena založna koncentracija
<i>TE260</i> v p416GPD	349,6 ng / μ l
<i>npfkA</i> v p416GPD	526,9 ng / μ l
<i>TE260</i> v p426GPD	304,5 ng / μ l
<i>npfkA</i> v p426GPD	565 ng / μ l

4.6 TRANSFORMACIJA PLAZMIDOV S KONSTRUKTI V KVASOVKO *S. cerevisiae* SEV HD114-8D

Plazmide v katerih smo s sekvenciranjem potrdili pravilno bazno zaporedje, smo uporabili za nadaljnjo transformacijo kvasovk *S. cerevisiae* sev HD114-8D. Netransformirane kvasovke smo iz trdnega gojišča YEPGE prenesli v tekoče gojišče YEPGE. Njihovo rast smo spremljali spektrofotometrično z naraščanjem motnosti gojišča. Kvasovke smo želeli transformirati v eksponentni fazni rasti, zato smo čakali, da njihova optična gostota (OD₆₀₀) doseže vrednost 1. Takšno optično gostoto so dosegli po približno 26 urah.

Transformirane kvasovke smo cepili na gojišče Sc-ura, GE. Rast transformant smo preverili po 1 tedenski inkubaciji.

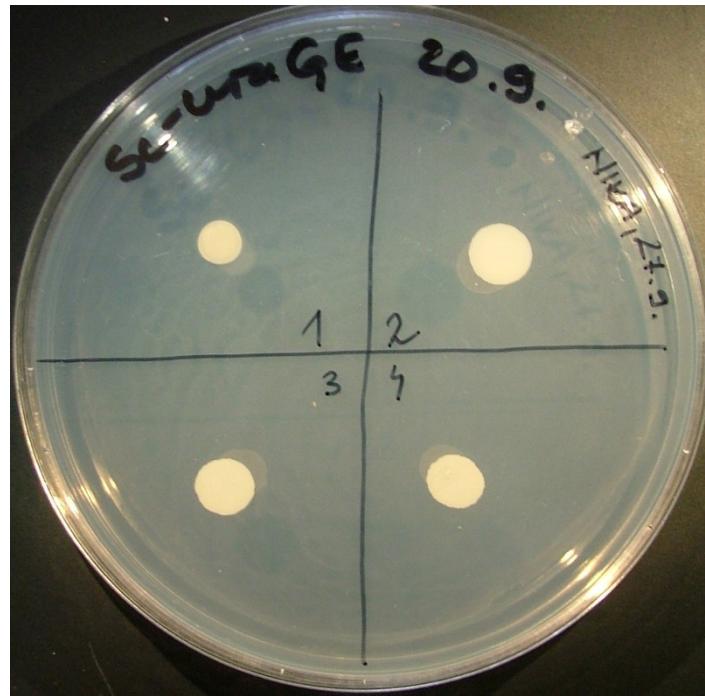
Kot prvo negativno kontrolo transformacije smo uporabili transformacijske mešanice brez plazmida (ni genov *pfk*, ni genov za sintezo uracila). Kontrolna plošča s transformantami brez vstavljenega plazmida je bila brez rasti.

Druga negativna kontrola so bile transformante, ki so vsebovale prazen plazmid p416GPD ali p426GPD (brez genov *npfkA* ali *TE260*). Rasle so na gojišču Sc-ura, GE, ker lahko izkoriščajo nefermentabilna sladkorja glicerol in etanol.

Rast je bila na vseh ploščah s transformantami, ki so prejeli plazmid s konstruktom, lepo vidna. Po enotedenski inkubaciji so bile kolonije na ploščah s transformantami, ki vsebujejo nativne encime PFK skoraj enkrat večje, kot kolonije s kratkim vključkom. Število kolonij transformiranih kvasovk je podano v preglednici št. 52.

Preglednica 52: Število transformant seva HD114 – 8D na gojišču Sc-ura, GE po enotedenski inkubaciji

Transformanta (konstrukt v vektorju)	Št. kolonij
<i>TE260</i> v p416GPD	48
<i>npfkA</i> v p416GPD	62
<i>TE260</i> v p426GPD	54
<i>npfkA</i> v p426GPD	67
negativna kontrola	0
negativna kontrola 2	23



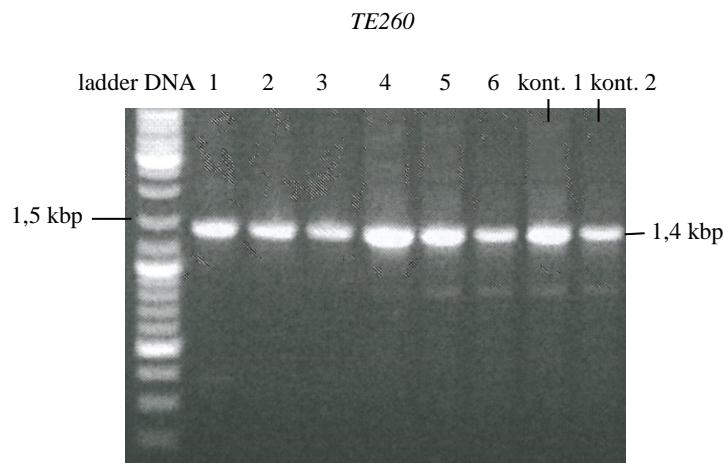
Slika 22: Rast transformant seva HD114–8D z vstavljenim konstruktom: 1= *npfkA* v plazmidu p416GPD, 2= *npfkA* v plazmidu p426GPD, 3= *TE260* v plazmidu p416GPD, 4= *TE260* v plazmidu p426GPD na gojišču Sc-ura, GE

4.7 TESTIRANJE KOLONIJ TRANSFORMANT *S. cerevisiae* S POMOČJO PCR

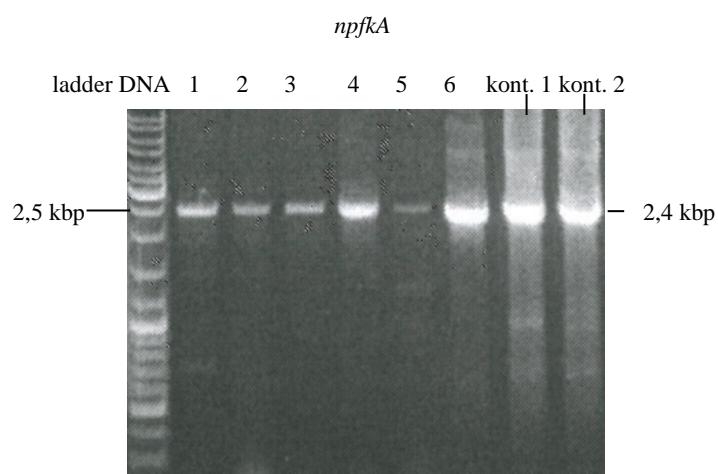
Iz posamezne plošče Sc-ura, GE s transformantami smo za vsak konstrukt izbrali tri kolonije, s katerimi smo izvedli PCR na osnovi kolonije. Ustreznost namnoženih vključkov smo nato preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri pomnoževanju, ter zaporedne številke kolonij s plošče s transformantami so podane v spodnji preglednici.

Preglednica 53: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri PCR na osnovi kolonije za pomnoževanje konstruktov iz kvasovk, ter zaporedje kolonij na transformacijski plošči Sc-ura, GE

Konstrukt v plazmidu	Zaporedna št. kolonije na plošči s transformantami <i>E. coli</i>	Začetni olig. 1/ Začetni olig. 2	Zaporedna št. kolonije na plošči s transformantami HD114-8D
<i>TE260</i> v p416GPD	kolonija 7	TEGI5 (746), TEGI7 (2196)	kolonije 1, 2, 3
<i>npfkA</i> v p416GPD	kolonija 1	TEGI5 (746), pfk32 (882)	kolonije 4, 5, 6
<i>TE260</i> v p426GPD	kolonija 3	pfk35 (1143), TEGI9 (2199)	kolonije 7, 8, 9
<i>npfkA</i> v p426GPD	kolonija 2	pfk35 (1143), TEGI10 (2200)	kolonije 10, 11, 12



Slika 23: Gelska elektroforeza; s PCR na osnovi kolonije preverjamo velikost vnešenih konstruktov v transformiranih kvasovkah. Lise 1, 2, 3 vsebujejo vključek *TE260* v p416GPD (kolonije 1, 2, 3). Lise 4, 5, 6 vsebujejo isti vključek v p426GPD (kolonije 7, 8, 9) (pričakovana velikost na gelu 1,4 kbp). Kontroli 1 in 2 sta vključek *TE260* v izoliranem plazmidu p416GPD oz. p426GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder



Slika 24: Gelska elektroforeza; s PCR na osnovi kolonije preverjamo velikost vnešenih konstruktov v transformiranih kvasovkah. Lise 1, 2, 3 vsebujejo vključek *npfkA* v p416GPD (kolonije 4, 5, 6). Lise 4, 5, 6 vsebujejo isti vključek v p426GPD (kolonije 10, 11, 12) (pričakovana velikost na gelu 2,4 kbp). Kontroli 1 in 2 sta vključek *npfkA* v izoliranem plazmidu p416GPD oz. p426GPD; DNK velikostna lestvica: DNA ladder

4.8 PRIPRAVA TRAJNE KULTURE

Po potrditvi ustrezne velikosti vključkov v kvasnih transformantah smo pripravili trajne kulture. Kvasno kolonijo s posameznim vključkom smo prenesli iz gojitvene plošče Sc-ura, GE v tekoči Sc-ura-GE. Kvasovke smo stresali, dokler niso dosegle eksponentne faze rasti (pri OD_{600} 1). Nato smo transformante prenesli v mikrocentrifugirko in ji dodali 50 % glicerol v razmerju 1:1. Končna koncentracija glicerola je bila 25 %. Kulture smo shranili v tekočem dušiku v trajni zbirki Kemijskega inštituta.

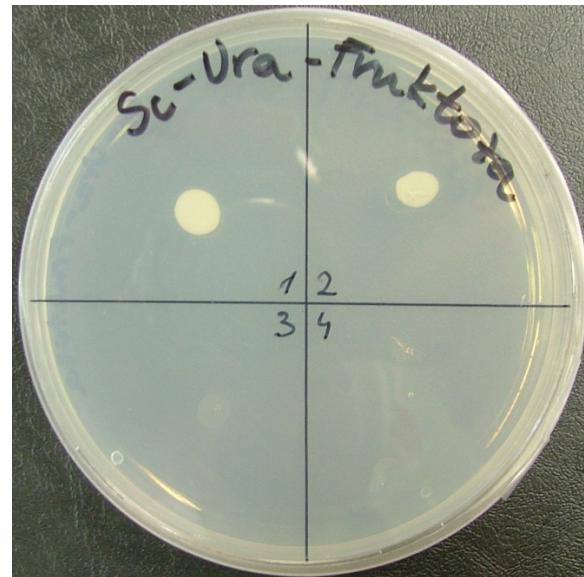
4.9 KONTROLA RASTI TRANSFORMANT NA RAZLIČNIH GOJIŠČIH

S testom rasti na ploščah Sc-ura, GE preverimo, kako so se vneseni heterologni geni vklopili v metabolizem kvasovke *S. cerevisiae*. Kvasovke so uspešno prejele plazmidno DNK, zato lahko rastejo na gojišču brez uracila (zapis za sintezo uracila prenesen na plazmidu). Vendar rast na tem gojišču še ni pokazatelj ali so konstrukti funkcionalni. To preverimo na gojiščih v katera so dodani različni sladkorji. Pričakujemo rast transformant z nativnimi PFK, ki imajo dejavno glikolizo. Celice s skrajšanimi *npfkA* (*TE260*) pa bodo rasle le, če se je encim izrazil, pravilno zvili v holoencim in se uspešno vključil v glikolizo.

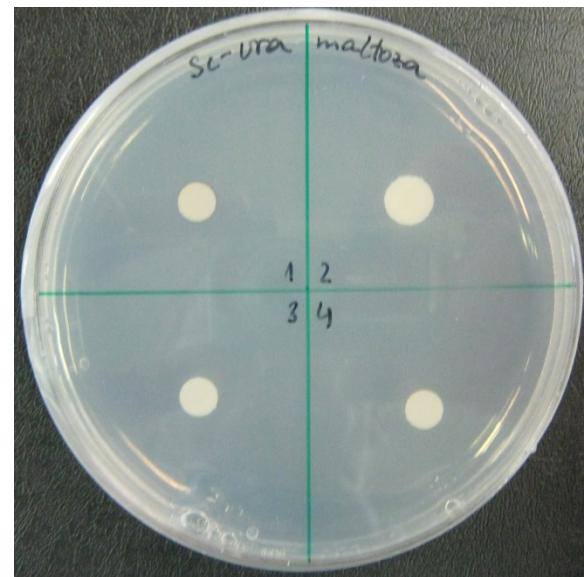
Primerjali smo rast transformant z nativnim encimom in njegovo skrajšano verzijo ter vzporedno zmožnost rasti na treh različnih sladkorjih (glukozi, fruktozi in maltozi).



Slika 25: Rast transformant seva HD114–8D z vstavljenim konstruktom: 1= *npfkA* v plazmidu p416GPD, 2= *npfkA* v plazmidu p426GPD, 3= *TE260* v plazmidu p416GPD, 4= *TE260* v plazmidu p426GPD na gojišču Sc-ura, glukoza



Slika 26: Rast transformant seva HD114–8D z vstavljenim konstruktom: 1= *npfkA* v plazmidu p416GPD, 2= *npfkA* v plazmidu p426GPD, 3= *TE260* v plazmidu p416GPD, 4= *TE260* v plazmidu p426GPD na gojišču Sc-ura, fruktoza



Slika 27: Rast transformant seva HD114–8D z vstavljenim konstruktom: 1= *npfkA* v plazmidu p416GPD, 2= *npfkA* v plazmidu p426GPD, 3= *TE260* v plazmidu p416GPD, 4= *TE260* v plazmidu p426GPD na gojišču Sc-ura, maltoza

Transformante, ki vsebujejo plazmide z genom za nativni encim (oznaka 1 in 2) rastejo na vseh treh sladkornih gojiščih. V velikosti kvasnih kolonij med posameznim sladkorjem ni bistvenih razlik (nekoliko večje so kolonije na glukoznem gojišču). Prav tako ni razlik v velikosti kolonij glede na uporabljen vektor za izražanje genov.

Kvasovke, ki so prejele gen za kratek fragment so rasle le na maltoznem gojišču. Med kolonijami z vnešenim p416GPD in p426GPD ni bilo razlik v velikosti. Na hitro metabolizirajočih sladkorjih ni bilo rasti.

5 RAZPRAVA

Ne glede na kompleksnost živega bitja, bodisi da opazujemo preproste enoceličarje ali visoko razvite sesalce je pot razgradnje sladkorjev v celicah relativno podobna. Sladkorji se po vstopu v celico razgradijo na monosaharide ter fosforilirajo. Nato so pripravljeni za nadaljnjo razgradnjo in prestrukturiranje tekom glikolize. Presnovna pot vedno vodi k nastanku piruvata, ATP in NADH. Nadaljna usoda piruvata je odvisna od tega ali glikoliza poteka v celicah aerobov ali anaerobov. Pri aerobih se bo piruvat pretvoril v acetil-CoA in vstopil v CCK. V anaerobnem okolju pa se piruvat reducira v različne fermentativne produkte.

Osrednji encim glikolize je protein 6-fosfofrukto-1-kinaza, ki fosforilira molekulo fruktoze-6-fosfat. Za izvedbo fosforilacije potrebuje molekulo ATP in Mg^{2+} ione. Evkariontski encim ima vezavna mesta za šest različnih ligandov. Dva liganda sta substrata, ki se vežeta v aktivno mesto encima (fruktoza-6-fosfat in ATP), ostali štirje so alosterični efektorji. Celica nadzira hitrost pretoka metabolitov skozi glikolizo s povratno inhibicijo encima PFK1. Prvi inhibitor je molekula ATP, katerega koncentracija v celici neposredno odraža energijsko stanje celice. Kadar je v celici ATP dovolj njegov presežek inhibira PFK1 in celica glikolizo ustavi. S tem se prepreči nadaljnja poraba sladkorjev v aerobnih pogojih.

Drugi inhibitor s podobnim mehanizmom delovanja je citrat. Citrat je intermedijat, ki nastaja v Krebsovem ciklu in preko inhibicije PFK1 povezuje glikolizo ter CCK. Ko CCK proizvede dovolj prekurzorjev za biosinteze potrebe celice, presežek citrata inhibira PFK1 in glikoliza se upočasni. Celice s tem preprečijo nepotrebno razgradnjo glukoze za napajanje CCK v kolikor to ni potrebno.

Pred nekaj leti so raziskovalci v glivi *A. niger* odkrili skrajšano različico encima PFK1. Kratkemu fragmentu so določili velikost le 49 kDa (Legiša in Mlakar; 2006). Ta naj bi nastal s proteolitično cepitvijo proteaz skozi daljše časovno obdobje. Neaktiven fragment, ki ima odcepljen C term. konec naknadno fosforilira proteinska kinaza odvisna od cAMP. Tarča kinaze je treoninski ostanek v aktivnem mestu encima. Po fosforilaciji je fragment aktiviran (Capuder in sod., 2011).

V industriji se gliva *A. niger* uporablja za pridobivanje citronske kisline. Gliva je sposobna pretvoriti kar 80 % saharoze v končni produkt (Legiša in Mattey; 2007). Povečan pretok metabolitov skozi glikolizo in s tem povečano napajanje CCK je mogoče zaradi spremenjenih alosteričnih lastnosti kratkega fragmenta. Kratek fragment je namreč neobčutljiv na inhibicijo s citratom. Presežek citrata ne deluje več kot varovalo pred metabolnim stresom, temveč pripomore k večjim izkoristkom substrata (Legiša in Mesojednik, 2005).

V diplomski nalogi smo žeeli modificirani gen *pfkA* izraziti v kvasovki *S. cerevisiae* z izbitimi lastnimi geni *pfk*. *In vitro* pripravljen gen *pfkA* izvira iz glive *A. niger*, vendar je s 3' konca skrajšan za približno 1000 bp. Na ta način so bila pri encimu, ki ga kodira skrajšan gen odstranjena vezavna mesta za citrat. Iz sekvence so bili odstranjeni tudi introni ter uvedena mutacija T89E. Gre za zamenjavo treoninskega AK ostanka na 89 mestu z negativno nabito glutaminsko kislino. Negativno nabita AK izniči potrebo po

kompleksnih posttranslacijskih modifikacijah- aktivaciji kratkega fragmenta s fosforilacijo (Capuder in sod., 2009).

Z uporabo različnih vektorjev za izražanje genov smo želeli povečati raven izražanja kratkega fragmenta. Dosedanje raziskave so namreč pokazale večjo nestabilnost kratkih fragmentov PFK1 v primerjavi z nativnim encimom. Nestabilnost kratkih fragmentov naj bi bila posledica odcepa precejšnjega dela C terminalnega konca nativnega holoencima. Distalni deli C terminalnega konca naj bi bili odgovorni za stabilizacijo tetramerne kvartarne strukture (Edelmann in sod., 2000). Glede na strukturni 3D model evkariontskih encimov PFK1 je razvidno, da se dimerni strukturi združujeta v aktiven tetramer preko C terminalnih delov molekul. To pomeni, da so kraši fragmenti, ki izgubijo C terminalni del dimerni (Banaszak in sod., 2011). V dimernem stanju je močno podvržen hitri disociaciji in s tem izgubi aktivnosti (Šmerc in sod., 2011). Potem, ko encim sprostimo iz celic v pufer se encimska aktivnost po desetih minutah popolnoma izgubi (Usenik, 2011). V raztopini pride verjetno do vrinjenja molekul vode med podenoti encima in s tem do disociacije holoencima na monomere. *In vivo* so ocenjene celične koncentracije proteina PFK1 150 mg/ml, koncentracije kratkega fragmenta v homogenatu v pufru pa le 1-5 mg/ml (Rohwer in sod., 2000).

Aktivne kratke fragmente PFK1 je mogoče pridobiti na dva različna načina. Obstajata namreč dva mehanizma, kako celice obe variaciji encima proizvedejo. *In vivo* v celicah *A. niger* pride do posttranslacijske modifikacije- krašjanja C terminalnega dela tetramernega proteina, drugi način pa je z vnosom modificiranega (skrajšanega) gena v celice, ki omogočajo sintezo kratkih monomer. Monomere se morajo izražati v koncentraciji, ki omogoča sestavo v aktiven dimer.

Gen za kratek fragment ter gen za nativni encim PFK1 smo vstavili v dva različna kvasna vektorja – p416GPD in p426GPD. Oba vektorja vsebujeta močan konstitutivni promotor GPD (Mumberg in sod., 1995). Predvidevali smo, da bo močan promotor prispeval k dvigu nivoja izražanja.

Med seboj se vektorja razlikujeta v številu kopij plazmida na celico. p416GPD je centromerni plazmid, ki se v celicah ohranja v nizkem številu kopij (le 1 do 3 na celico) (Sherman, 1998). p426GPD je 2 μ plazmid in je v celici vedno prisoten v velikem številu kopij (60 do 100 na celico) (Bruschi in Storici, 1997).

Vektor p426GPD z visokim nivojem izražanja je bil uporabljen kot rezervni načrt, za primer, da bi bila produkcija monomer z vektorjem p416GPD prenizka. Večje število podenot naj bi povečalo možnost sestave v aktiven holoencim in s tem vklop kratkega fragmenta v glikolizo.

Plazmide smo najprej namnožili v bakteriji *E. coli*. Ko smo z gelsko elektroforezo in s sekvenciranjem potrdili ustrezeno velikost in bazno zaporedje konstruktov smo plazmide vnesli v sev kvasovke *S. cerevisiae* HD114-8D. Sev nima lastnih genov *pfk*, zato ni sposoben rasti na gojiščih z enostavnim virom ogljika, kot so fermentativni sladkorji. Lahko raste na gojiščih z nefermentabilnimi sladkorji, zato je izhodni sev lahko rastel le na gojišču z dodanim glicerolom in etanolom.

Transformante z vstavljenimi rekombinantnimi plazmidi so na gojišču Sc-ura, GE različno uspešno rasle. Po enotedenski inkubaciji plošč smo opazili, da so kolonije transformant z vstavljenim genom za nativni encim skoraj enkrat večje od kolonij transformant z vstavljenim skrajšanim genom (ne glede na to ali je bil gen vstavljen v vektor p416GPD ali p426GPD). Razlike v rasti transformant na tem gojišču nismo pričakovali. Glicerol kot substrat namreč vstopa v glikolizo za encimom PFK1. Najprej ga glicerol kinaza fosforilira v glicerol-3-fosfat. Nato s pomočjo encima glicerol fosfat dehidrogenaze poteče oksidacija v dihidroksi aceton fosfat. Šele v tej stopnji lahko vstopi v glikolizo kot substrat za encim triozna fosfat izomerazo (Garret in Grisham, 2010). Posledično oblika encima PFK1 (nativna ali skrajšana različica) ne bi smela vplivati na sposobnost rasti transformant na tem gojišču.

Za preverjanje funkcionalnosti konstruktov smo vse različice transformant gojili na treh različnih sladkorjih (1 % glukozi, 1 % fruktozi in 1 % maltozi). Pričakovali smo rast vseh transformant z vstavljenim genom za nativni PFK z aktivno glikolizo. Težje pa je bilo predvidevati, kako uspešen bo pri vključevanju v metabolizem kratek fragment PFK1. Kvasovke bodo predvidoma lahko izrabljale sladkorje iz gojišča le v primeru, da se je gen za kratek fragment prepisal, pravilno sestavil v dimerno strukturo in uspešno vključil v glikolizo.

Sklepali smo, da bodo vse transformante najbolje rasle na glukoznih gojiščih, saj je glukoza monosaharid, ki ga kvasovke preferenčno izkoriščajo. Fruktoza je prav tako monosaharid, ki lahko brez težav vstopa v glikolizo. Potrebna je le fosforilacija na mestu C-1 z encimom fruktokinaza in razcep molekule s fruktozo-1-fosfat aldolazo. Tako nastaneta intermediata glikolize dihidroksi aceton fosfat in gliceraldehid (Garret in Grisham, 2010). Nekoliko počasnejšo rast smo predvidevali le na maltoznem gojišču. Maltoza je disaharid, sestavljen iz dveh glukoznih enot, zato je potrebna predhodna hidroliza molekule pred vstopom v glikolizo.

Po enotedenski inkubaciji plošč na 30 °C smo zaznali rast transformant na vseh treh sladkornih gojiščih. Kvasovke, ki so bile transformirane s plazmidom p416GPD oz. p426GPD, ki sta vsebovala zapis za nativen encim PFK1 glive *A. niger*, so rasle na vseh treh sladkornih gojiščih.

Po tednu dni med velikostjo kolonij na posameznem sladkorju ni bilo razlik, prav tako ni bilo bistvenih razlik med velikostjo kolonij transformant, ki so prejele plazmid p416GPD oz. p426GPD. S tem lahko potrdimo, da sta se oba vnesena gena pravilno prepisala, sestavila v funkcionalen encim in vklopila v metabolizem kvasovk.

Transformante s konstruktom TE260 v p416GPD oz. p426GPD so rasle le na gojišču z dodano maltozo. Možen razlog je, da visoko izražanje podenot encima v kombinaciji s hitro presnavljajočima sladkorjem (glukozo, fruktozo) v celicah kvasovk predstavlja premočan metabolni stres. Verjetno pride do porušenja ravnotežja NADH/NADPH. Visoko aktiven kratek fragment deluje kot anapleurotična reakcija. Pospeši presnovo preko glikolize na račun metabolnega pretoka preko pentozna fosfatne poti. Rezultat je več nastalega NADH in manj NADPH (Garret in Grisham, 2010).

Molekuli NADH in NADPH sta prosto gibljiva elektronska prenašalca. Vedno prenašata po dva elektrona (vezana na dva vodikova atoma) na naslednji elektronski akceptor v verigi. Takšen prenos atomov imenujemo dehidrogenacija. Kljub enakemu redoks potencialu imata prenašalca NADH in NADPH v celicah različno vlogo. NADH je vpletен v katabolne reakcije, kjer se energija sprošča, NADPH pa sodeluje predvsem v biosintezih- anabolnih reakcijah. Zato razmerje NADH/NADPH določa razmerje med katabolnimi in anabolnimi reakcijami v celici, ki je ključno za normalno delovanje celice (Garret in Grisham, 2010).

Kvasovka *S. cerevisiae*, ki smo jo izbrali kot gostitelja za izražanje rekombinantnih plazmidov, ne vsebuje transhidrogenaze (dos Santos in sod., 2004). Transhidrogenaza je encim, ki pretvarja NADH v NADPH. Tako kvasne celice nimajo na voljo popravljalnega mehanizma, ki bi v celici zopet vzpostavil pravilno ravnotežje med obema nukleotidoma. Prav transhidrogenaza je eden od mehanizmov, ki v humanih celicah omogočajo popravilo porušenega razmerja NADH/NADPH, ki je verjetno posledica povečanega metabolnega toka skozi glikolizo. Prav tako kvasne celice ne vsebujejo NADP⁺ specifičnega maličnega encima v citosolu, ki pretvarja malat v piruvat, CO₂ in reducirani koencim NADPH. To je encim, ki pri rakastih celicah bistveno pripomore uravnovešenju NADH/NADPH (Thompson in sod., 2008).

Razlaga, zakaj transformante rastejo na maltozi in ne na glukozi oz. fruktozi, bi lahko bila povezana z njeno strukturo. Maltoza je disaharid, sestavljen iz dveh enot glukoze, ki se s hidrolizo v citosolu počasi sproščajo. Do razlike v rasti med sladkorji bi lahko prišlo zaradi prehitre presnove glukoze in fruktoze, medtem ko se mora maltoza v citosolu najprej razgraditi in posledično se vnos glukoze v glikolizo nekoliko upočasni in s tem zmanjša stres v celici.

Izražanje kratkega fragmenta PFK1 z vektorjem p416GPD in p426GPD v kombinaciji s t.i. »hitro hrano« za kvasovke (glukoza, fruktoza) očitno privede do premočnega metabolnega stresa za celico. Prehitra presnova sladkorjev predvidoma vodi do poplave metabolitov v celici ter tudi do povišanega nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Povišana koncentracija ROS deluje s povratno inhibicijo na piruvat kinazo (pretvarja fosfoenolpiruvat v piruvat in ATP) in ustavi glikolizo. To je obrambni mehanizem, ki onemogoči prekomerno tvorbo ROS (Bluemlein in sod., 2012). ROS lahko sprožijo tudi programirano celično smrt- apoptozo (Legiša, 2014).

Na osnovi pridobljenih podatkov ne moremo zaključiti, katera oblika encima omogoča hitrešo rast kvasovk in produkcijo etanola v anaerobnih pogojih. Prav tako iz pridobljenih rezultatov ne moremo zaključiti kateri sladkor transformante hitreje metabolizirajo oz. ali med njimi sploh obstajajo razlike. V ta namen bi morali študijo razširiti in spremljati rast transformant v tekočem gojišču z različnimi sladkorji kot virom ogljika. Spektrofotometrično bi lahko spremljali naraščanje optične gostote gojišča in na ta način pridobili rastne krivulje ter izračunali generacijske čase za posamezno transformanto. Na

podlagi teh informacij bi lahko sklepali o vplivu oblike encima PFK1 in izbire substrata na hitrost glikolize in posledično na rast celic.

6 SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo želeli z izbiro primernega promotorja in plazmida zagotoviti zadostno izražanje monomer kratkega fragmenta PFK1 za spontano združevanje v funkcionalen holoencim in njegovo vključitev v metabolizem kvasovke. Pričakovali smo, da bodo transformante *S. cerevisiae* z aktivnim modificiranim encimom PFK1 na določenih sladkorjih rasle bolje kot kvasovke z nativnim encimom.

V ta namen smo pripravili štiri različne rekombinantne plazmide. Ker smo želeli dvigniti raven izražanja nativnega proteina in kratkega fragmenta PFK1 glive *A. niger* smo gene vnesli v plazmida p416GPD ter p426GPD in jih namnožili v bakteriji *E. coli*. Po potrditvi ustreznosti konstruktov s sekvenciranjem smo jih s plazmidi transformirali v kvasovke *S. cerevisiae* sev HD114-8D z izbitimi lastnimi geni *pfk*. Prišli smo do naslednjih zaključkov:

- Funkcionalnost encimov, ki jih kodirata gena *TE260* in *npfkA* ter ustrezen vklop v metabolizem kvasovke smo testirali na gojiščih s tremi različnimi sladkorji: glukozo, fruktozo in maltozo. Vse transformante, ki so vsebovale gen *npfkA* v vektorju p416GPD ali p426GPD so rasle na vseh treh virih ogljika enako uspešno. To je bil dokaz, da se je gen pravilno prepisal v funkcionalen encim.
- Kvasovke, ki so bile transformirane z vektorjem p416GPD oz. p426GPD, ki je vseboval gen *TE260*, so rasle le na gojišču Sc-ura z dodano maltozo. Sklepamo, da je odsotnost rasti na gojiščih z glukozo in fruktozo posledica metabolnega stresa zaradi previsoke ekspresije kratkega fragmenta PFK1 in posledično prehitre presnove enostavnih sladkorjev.
- Maltoza je disaharid, sestavljen iz dveh glukoznih podenot, ki se v citosolu sproščajo s hidrolizo. Presnova je zato nekoliko počasnejša. Sklepamo, da je zato metabolni stres v celici manjši v primerjavi z enostavnimi sladkorji.
- Na podlagi teh testov nismo mogli zaključiti kateri od encimov omogoča hitrejšo presnovo sladkorjev oz. kateri sladkor je za metabolizem s kratkim fragmentom primernejši.

7 POVZETEK

Glikoliza predstavlja univerzalno metabolno pot razgradnje različnih sladkorjev in poteka v prokariontih, evkariontih, aerobih oz. anaerobih praktično enako. Sestavlja jo deset kemičnih reakcij, ki jih lahko razdelimo v tri faze in vodijo do nastanka piruvata. Nadaljnja usoda piruvata je različna. Pri aerobih se pretvorí v acetil-CoA, ki se preko številnih vmesnih intermediatov oksidira v Krebsovem ciklu. V anaerobnih pogojih se piruvat reducira v različne fermentativne produkte.

Tok intermediatov skozi glikolizo pogojuje število nastalih molekul ATP ter redoks stanje NADH/NAD⁺. Zato je glikoliza močno regulirana na različnih nivojih. Poglavitno vlogo za nadzor pretoka skozi glikolizo ima encim PFK1, ki katalizira ireverzibilno fosforilacijo fruktoze-6-fosfat v fruktozo-1,6-difosfat. Za delovanje potrebuje substrat ATP in Mg²⁺ ione.

Evkariantske fosfofruktokinaze so se razvile iz bakterijskih predhodnikov s podvojitvijo in združevanjem dveh genov. Tekom evolucije so razvile šest vezavnih mest za različne ligande. Fruktoza-6-fosfat in ATP sta substrata in se vežeta v aktivno mesto encima. ATP v presežnih koncentracijah deluje kot inhibitor PFK1, s podobnim mehanizmom deluje nanj tudi citrat. Molekuli AMP in fruktoza-2,6-difosfat delujeta na encim stimulativno.

Raziskovalci so v glivi *A. niger* odkrili krajšo obliko encima odporno na inhibicijo s citratom. Ta odpornost omogoča izrabljanje glive za industrijsko pridobivanje citronske kisline z visokimi izkoristki izhodnega substrata.

V diplomski nalogi smo žeeli *in vitro* pripravljen skrajšan gen *pfkA* glive *A. niger* izraziti v kvasovki *S. cerevisiae*. Uporabili smo kvasni sev HD114-8D z izbitimi lastnimi geni *pfk*.

Dosedanje raziskave so pokazale, da je kratek fragment PFK1 izredno občutljiv na razredčevanje. Dimer v homogenatu v pufru v nekaj minutah disociira in encim izgubi aktivnost (Šmerc in sod., 2011). Da bi povečali koncentracijo monomer kratkega fragmenta PFK1 in s tem možnost za sestavo v funkcionalen encim smo se odločili za zamenjavo vektorjev za izražanje genov. Izbrali smo kvasna plazmida p416GPD in p426GPD z močnim konstituitivnim promotorjem in velikim številom kopij. Rekombinantne plazmide z genom za nativni PFK1 in njegov kratek fragment smo namnožili v bakteriji *E. coli*, nato pa jih transformirali v kvasovko *S. cerevisiae*.

Uspešnost transformacije smo preverjali na gojišču Sc-ura, GE. Ker je izbrani sev kvasovk avksotrof za uracil, so na ploščah zrasle le tiste celice, ki so prejele plazmid. Na plazmidu je bil namreč kodiran gen za sintezo uracila.

Ali se je genski konstrukt pravilno prepisal in zvit v delajočo tetramerno (kratek fragment PFK1 v dimerni) obliko smo preverili z rastjo transformant na gojiščih Sc-ura z dodanimi tremi različnimi viri ogljika (glukozo, fruktozo, maltozo). Transformante, ki so vsebovale konstrukt *npfkA* v plazmidu p416GPD oz. p426GPD so rasle na vseh treh gojiščih. Transformante, ki so vsebovale gen za kratek fragment TE260 v plazmidu p416GPD oz. p426GPD, so rasle le na maltoznem gojišču. Sklepamo, da je zaradi povečanega izražanja podenot kratkega fragmenta PFK1 in uporabe sladkorjev, ki se hitro presnavljajo, prišlo do prevelikega metabolnega stresa v celici. Prehiter tok skozi glikolizo vodi do poplave

metabolitov in porušitve ravnotežja NADH/NADPH. Nastajajo ROS, ki delujejo inhibitorno na glikolizo in lahko povzročijo programirano smrt celice.

Izsledki nam ne omogočajo osnovati zaključkov katera oblika encima omogoči hitrejši razvoj kvasovk. Prav tako lahko le sklepamo kateri vir ogljika transformante hitreje presnavljajo oz. kakšen vpliv ima uporabljen vir ogljika na potek glikolize. V ta namen bi bilo potrebno raziskavo razširiti. Za natančnejšo primerjavo delovanja nativnega encima in kratkega fragmenta PFK1 bi morali transformante nacepiti v tekoča minimalna gojišča z različnimi fermentativnimi mono ali dimernimi sladkorji ter njihovo hitrost rasti zasledovati z merjenjem naraščanja motnosti v substratu.

8 VIRI

Addgene. 2014a. Vector database: plasmid p416GPD. Cambridge, Addgene: 1 str.
<https://www.addgene.org/vector-database/1630/> (februar 2014)

Addgene. 2014b. Vector database: plasmid p426GPD. Cambridge, Addgene: 1 str.
<https://www.addgene.org/vector-database/1632/> (februar 2014)

Atlas R.M., Bartha R. 1998. Microbial ecology: Fundamentals and applications. 4th ed. San Francisco, Benjamin Cummings Publishing: 231-233

Banaszak K., Mechlin I., Obmolova G., Oldham M., Chang S.H. 2011. The crystal structures of eucaryotic phosphofructokinase from baker's yeast and rabbit skeletal muscle. *Journal of Molecular Biology*, 407, 2: 284-297

Bensaad K., Tsuruta A., Selak M.A., Vidal M.N., Nkano K. 2006. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, 126, 1: 107-120

Bluemlein K., Glückmann M., Grüning N.M., Feichtinger R., Krueger A., Wamelink M., Lehrach H., Tate S., Neureiter D., Kofler B., Ralser M. 2012. Pyruvate kinase is a dosage-dependant regulator of cellular amino acid homeostasis. *Oncotarget*, 3, 11: 1356-1369

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

Boyer R. 2002. Interactive concepts in biochemistry. Phosphofructokinase. New York, John Wiley & Sons Publishers, Inc.: 1 str.

http://www.wiley.com/college/boyer/0470003790/structure/pfk/pfk_intro.htm (maj 2014)

Boles E., Heinisch J.J., Timpel C. 1996. A yeast phosphofructokinase insensitive to the allosteric activator fructose 2,6-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 27: 15928-15933

Brock D.T., Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1994. Biology of microorganisms. 7th ed. Upper Saddle River, Prentice-Hall International, Inc: 900 str.

Bruschi C.V., Storici F. 1997. Molecular engineering with the FRT sequence of the yeast 2 μ m plasmid: [*cir*] segregant enrichment by counterselection for 2 μ m site-specific recombination. *Gene*, 195, 2: 245-255

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

Dogša I., Danevčič T., Stres B., Hofferle Š., Mandič Mulec I. 2008. Mikrobiološko-molekularni praktikum-laboratorijske vaje za biotehnologe. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 39 str.

http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2751/Fiziologija_BTHv1.2.pdf (februar 2014)

Dos Santos M., Raghevendran V., Kotter P., Olsson L., Nielsen J. 2004. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. *Metabolic Engineering*, 6, 4: 352-363

Dunaway G.A., Kasten T.P., Sebo T., Trapp R. 1988. Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochemical Journal*, 251, 3: 677-683

Edelmann A., Kirchberger J., Naumann M., Kopperschlager G. 2000. Generation of catalytically active 6-fosfofructokinase from *Saccharomyces cerevisiae* in a cell-free system. *European Journal of Biochemistry*, 267, 15: 4825-4830

Elson A., Levanon D., Brandeis M., Dfini M., Bernstein Y. 1990. The structure of human liver-type phosphofructokinase gene. *Genomics*, 7, 1: 47-56

Emerk K., Frieden C. 1974. The effect of trypsin treatment on rabbit muscle phosphofructokinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 164: 233-240

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 Biophysical Research Communications*, 198, 3: 990-998

EUROFINS. 2014. Custom DNA sequencing. Ebersberg, Eurofins Genomics: 1 str.

<https://ecom.mwgdna.com/register/index.tcl> (februar 2014)

Evans P.R., Schirmer T. 1990. Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. *Nature*, 343: 140-145

Garrett H.R., Grisham C.M. 2010. *Biochemistry*. 4th ed. Boston, Brooks/Cole: 1059 str.

GENEON. 2014. Phage lambda DNA *EcoRI/HindIII* digest ready to use. Ludwigshafen am Rhein, GeneOn: 1 str.

<http://www.taq-dna.com/phage-lambda-dna-ecori-2fhindiii-digest-ready-to-use- 139.html> (februar 2014)

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

Gottschalk M.E., Latshaw S.P., Kemp R.G. 1983. Retention of allosteric properties in an inactive, proteolyzed form of phosphofructokinase. *Biochemistry*, 22: 1082-1087

- Gunasekera D., Kemp R.G. 2002. Evolution of the allosteric ligand sites of mammalian phosphofructo-1-kinase. *Biochemistry*, 41: 9426-9430
- Habison A., Kubicek C.P., Roehr M. 1979. Phosphofructokinase as a regulatory enzyme in citric acid producing *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, 5: 39-42
- Habison A., Kubicek C.P., Roehr M. 1983. Partial purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 209: 669-676
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144: 646-674
- Heiman M. 1997. Webcutter 2.0. New Haven, Yale: programska oprema
<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> (februar 2014)
- Kopperschlaeger G., Baer J., Stellwagen E. 1993. Limited proteolysis of yeast phosphofructokinase. Sequence location of cleavage sites created by the action of different proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 217: 527-533
- 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.
- Legiša M., Mattey M. 2007. Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 29: 181-190
- Legiša M., Mesojednik S. 2005. Posttranslational modification of 6-phosphofructo-1-kinase in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3: 1425-1432
- Legiša M., Mlakar T. 2006. Citrate-resistant form of 6-phosphofructo-1-kinase from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7: 4515-4521
- Legiša M., Usenik A. 2010. Evolution of allosteric citrate binding sites on 6-phosphofructo-1-kinase. *PLoS ONE*, 5, 11: e15447, doi: 10.1371/journal.pone.0015447: 8 str.
- Legiša M. 2014. Similarities and differences between cancer and yeast carbohydrate metabolism. V: Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism. Piškur J., Campagno C. (eds.). Berlin, Springer: 121-140
- Marin-Hernandez A., Rodriguez-Enriquez S., Gonzalez-Vital P.A., Flores-Rodriguez F.L., Macias-Silva M. 2006. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS Journal*, 273, 9: 1975-1988

Mumberg D., Mueller R., Funk M. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156: 119-122

Nevoigt E. 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 3: 379-412

NIPPON GENETICS. 2014. DNA ladder (molecular weight marker). Dueren, Nippon Genetics Europe GmbH: 1 str.

<http://www.nippogenetics.eu/dnarma-electrophoresis/dna-ladder-molecular-weight-marker/> (februar 2014)

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

Potočnik U., Repnik K. 2014. Molekularna biologija in molekularna genetika, navodila za vaje. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 44 str.

PROMEGA. 2014. BioMath calculators: Tm for oligos. Madison, Promega: programska oprema

<http://www.promega.com/a/apps/biomath/?calc=tm> (maj 2014)

QIAGEN. 2008. Qiaquick spin handbook. Hilden, Sample and Assay Technologies: 44 str.
<http://sevierlab.vet.cornell.edu/resources/EN-QIAquick-Spin-Handbook.pdf> (februar 2014)

Reinhart G.D., Lardy H.A. 1980. Rat liver phosphofructokinase: kinetic and physiological ramifications of the aggregation behavior. *Biochemistry*, 19, 7: 1491-1495

Rohwer J.M., Meadow N.D., Roseman S., Westerhoff H.V., Postma P.W. 2000. Understanding glucose transport by the bacterial phosphoenolpyruvate: glycone phosphotransferase system on the basis of kinetic measurements *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 45: 34909-34921

Seidman C.E., Struhl K., Sheen J., Jessen T. 1997. Introduction of plasmid DNA into cells. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 10 str.

http://download.bioon.com.cn/upload/month_0902/20090219_2a78cc69f2d643aa5a5cR8RvyIwLam0k.attach.pdf (junij 2014)

Sherman F. 1998. An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Rochester, University of Rochester Medical School: 43 str.

<http://www.urmc.rochester.edu/biochemistry-biophysics/images/Saccharomyces-Cerevisiae-Yeast-Intro.pdf> (junij 2014)

Stall G.E., Kalff A., Heesbeen E.C., van Veelen C.W., Rikksen G. 1987. Subunit composition, regulatory properties and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas. *Cancer Research*, 47, 19: 5047-5051

Suelter C. H. 1985. A practical guide to enzymology. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 288 str.

Swietach P., Vaughan-Jones R.D. Harris A.L. 2007. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26, 2: 299-310

Šmerc A., Legiša M., Sodja E. 2011. Posttranslational modification 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.

Tevž G., Benčina M., Legiša M. 2010. Enhancing itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 1657-1664

Thompson C.B., DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliov G. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*, 7: 11-20

Ullmann A. 2014. Louis Pasteur. V: Encyclopedia Britannica Online. Chicago, Encyclopedia Britannica, Inc.: 4 str.

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/445964/Louis-Pasteur> (julij 2014)

Usenik A. 2011. Izražanje nativnega in mutiranih genov 6-fosfofrukto-1-kinaze glive *A. niger* v bakteriji *Escherichia coli* in *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 129 str.

Valaitis A.P., Foe L.G., Kemp R.G. 1987. Desensitization os muscle phosphofructokinase to ATP inhibition by removal of a carboxyl-terminal heptadecapeptid. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 5044-5048

Vora S., Oskam R., Stall G.E. 1985. Isoenzymes of phosphofructokinase in the rat. Demonstration of the three non-identical subunits by biochemical, immunochemical and kinetic studies. *Biochemical Journal*, 229, 2: 333-341

Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 3191: 309-314

Yamasaki T., Nakajima H., Kono N., Hotta K., Yamada K. 1991. Structure of the entire human muscle phosphofructokinase-encoding gene: a two promoter system. *Gene*, 104, 2: 277-282

ZAHVALA

Želela bi se zahvaliti mojemu dragemu možu Juretu. Hvala za vso pomoč, motivacijo in spodbudne besede – zaradi tebe vem, da mi lahko uspe karkoli.

Hvala tudi moji hčerkici Gaji – ti si razlog, da je moj svet mavričen.

Posebna zahvala gre mojim drugim staršem Metki in Tomažu... Hvala, ker sta mi vsa ta leta stala ob strani! Se prevozila na stotine kilometrov, natisnila nešteto strani, se z mano jezila in smejala, me bodrila in mi vedno namenila prijazno besedo. Zaradi vaju vem, kaj je pravi pomen družine.

Moji sestrici Živi – hvala, ker si mi vedno prižgala lučko na koncu tunela!