

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Marijana Vrdoljak

Kloniranje i ekspresija gena *CgKCS* za elongazu nezasićenih masnih kiselina  
iz grčke režuhe (*Cardamine graeca* L.)

Zagreb, 2011.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kemijsku biologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Boškovića, pod vodstvom dr. sc. Snježane Mihaljević, znan. sur., i prof. dr. sc. Jasne Vorkapić-Furač s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2010./ 2011.

## Popis oznaka, kratica i simbola

AA	arahidonska kiselina, C 20:4 n-6 ( <i>engl.</i> Arachidonic acid)
ACP	proteinski nosač acilne jedinice ( <i>engl.</i> Acil carrier protein)
ALA	$\alpha$ - linolenska kiselina, C 18:3 n-3 ( <i>engl.</i> $\alpha$ -linolenic acid)
ATP	adenozin trifosfat ( <i>engl.</i> Adenosine triphosphate)
CgKCS	3-ketoacil-CoA sintaza iz grčke režuhe <i>Cardamine graeca L.</i>
DHA	dokozaheksaenoična kiselina, C 22:6 n-3 ( <i>engl.</i> Docosahexaenoic acid)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina ( <i>engl.</i> Deoxyribonucleic acid)
EDTA	etildiamintetraoctena kiselina
EPA	eikozapentaenoična kiselina, C 20:5 n-3 ( <i>engl.</i> Eicosapentaenoic acid)
FA	masna kiselina ( <i>engl.</i> Fatty acid)
FAE	elongaza masnih kiselina ( <i>engl.</i> Fatty acid elongase)
FAME	metilni esteri masnih kiselina ( <i>engl.</i> Fatty acid methyl ester)
FFA	slobodne masne kiseline ( <i>engl.</i> Free fatty acids)
GC	plinska kromatografija ( <i>engl.</i> Gas chromatography)
HDL	lipoprotein velike gustoće ( <i>engl.</i> High density lipoprotein)
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
KCS	3-ketoacil-CoA sintaza
LA	linolna kiselina, C 18:2 n-6 ( <i>engl.</i> Linoleic acid)
LB	Luria-Bertani broth
LDL	lipoprotein niske gustoće ( <i>engl.</i> Low density lipoprotein)
MUFA	mononezasićena masna kiselina ( <i>engl.</i> Monounsaturated fatty acid)
PCR	lančana reakcija polimerazom ( <i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction)
PEG	polietilenglikol
PUFA	polinezasićena masna kiselina ( <i>engl.</i> Polyunsaturated fatty acid)
SFA	zasićena masna kiselina ( <i>engl.</i> Saturated fatty acid)
TAE	Tris Acetate EDTA
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometan
VLCFA	masna kiselina vrlo dugog lanca ( <i>engl.</i> Very long chain fatty acid)
VLCMFA	mononezasićena masna kiselina vrlo dugog lanca ( <i>engl.</i> Very long chain monounsaturated fatty acid)

## SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Masne kiseline .....	2
1.2. Biosinteza masnih kiselina .....	4
1.3. Biosinteza dugolančanih masnih kiselina.....	6
1.4. Uloga polinezasićenih masnih kiselina u prehrani .....	9
1.5. Izvori polinezasićenih masnih kiselina u hrani .....	9
1.6. Funkcija polinezasićenih masnih kiselina u organizmu i učinak na zdravlje.....	10
1.7. Uloga mononezasićenih masnih kiselina .....	10
1.8. Nervonska kiselina .....	11
1.9. Novi načini proizvodnje nezasićenih masnih kiselina vrlo dugih lanaca u biljkama	12
<b>2. Opći i specifični ciljevi rada</b> .....	<b>13</b>
<b>3. Materijali i Metode</b> .....	<b>14</b>
3.1. Materijali .....	14
3.1.1. Mikroorganizmi .....	14
3.1.2. Biljna DNA .....	14
3.1.3. Plazmidna DNA (vektori).....	14
3.1.4. Oligonukleotidne početnice ( <i>engl.</i> primeri) .....	16
3.1.5. Hranjive podloge i otopine .....	17
3.1.5.1. Podloge za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	17
3.1.5.2. Podloge za uzgoj kvasca .....	18
3.1.5.3. Otopina za transformaciju stanica kvasca .....	18
3.1.5.4. Otopine za gel-elektroforezu .....	19
3.1.6. Komercijalno dostupni kompleti .....	20
3.1.7. Biljezi .....	20
3.1.8. Enzimi .....	20

3.1.9. Kemikalije .....	21
3.1.10. Uređaji .....	21
3.2. Metode .....	22
3.2.1. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR).....	22
3.2.2. Razdvajanje DNA elektroforezom u agaroznom gelu .....	23
3.2.3. Izolacija i pročišćavanje DNA .....	23
3.2.3.1. Izdvajanje DNA iz agaroznoga gela .....	23
3.2.3.2. Izdvajanje plazmidne DNA.....	24
3.2.3.3. Pročišćavanje PCR produkta .....	24
3.2.4. Kloniranje odsječka DNA u plazmidni vektor s pomoću restrikcijskih enzima ..	25
3.2.5. AT-kloniranje u plazmidni vektor .....	25
3.2.6. Ligacija fragmenata DNA .....	26
3.2.7. Određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA .....	26
3.2.8. Priprema kompetentnih stanica bakterije <i>Escherichia coli</i> za elektroporaciju ...	28
3.2.9. Transformacija .....	28
3.2.9.1. Transformacija kompetentnih bakterija <i>E. coli</i> metodom elektroporacije .....	28
3.2.9.2. Transformacija kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> s pomoću litijevog acetata	28
3.2.10. Indukcija ekspresije gena <i>KCS</i> u kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
3.2.11. Priprema metilnih estera masnih kiselina .....	30
3.2.12. Plinska kromatografija metilnih estera masnih kiselina .....	31
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>32</b>
4.1. Kloniranje gena <i>CgKCS</i> u vektor pGEM-T Easy .....	32
4.1.1. Umnažanje i izdvajanje gena <i>CgKCS</i> pomoću PCR.....	32
4.1.2. Priprema inserta <i>CgKCS</i> i ligacija u vektor pGEM-T Easy.....	33
4.1.3. Transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i> konstruktom pGEM-T Easy/ <i>CgKCS</i> .....	33
4.1.4. Analiza konstrukata pGEM-T Easy/ <i>CgKCS</i> restrikcijskom digestijom i sekvencioniranjem .....	34

4.2. Kloniranje gena <i>CgKCS</i> u vektor pYES2.....	37
4.2.1. Umnažanje gena <i>CgKCS</i> i kreiranje restrikcijskih mjesta reakcijom PCR .....	37
4.2.2. Cijepanje vektora i PCR produkta restrikcijskim endonukleazama .....	37
4.2.3. Ligacija i transformacija stanica bakterije <i>E. coli</i> konstruktom pYES2/ <i>CgKCS</i> .....	38
4.2.4. Analiza transformanata stanica kvasca koje sadrže konstrukt pYES2/ <i>CgKCS</i> ...	39
4.2.5. Analiza slijeda nukleotida konstrukta pYES2/ <i>CgKCS</i> .....	40
4.2.6. Transformacija kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> konstruktom pYES2/ <i>CgKCS</i> .....	41
4.2.7. Heterologna ekspresija gena <i>CgKCS</i> gena u kvascu .....	41
<b>5. Rasprava .....</b>	<b>45</b>
<b>6. Zaključci .....</b>	<b>48</b>
<b>7. Zahvale.....</b>	<b>49</b>
<b>8. Literatura .....</b>	<b>50</b>
Sažetak .....	56
Summary .....	57

## 1. Uvod

---

Masti i ulja prijeko su potrebni sastojci pravilne prehrane jer imaju mnogobrojne važne biološke uloge u organizmu: odličan su izvor energije i esencijalnih nutrijenata (liposolubilnih vitamina, esencijalnih masnih kiselina), služe kao energetska rezerva, poboljšavaju osjećaj okusa i pridonose osjećaju sitosti, a imaju i građevnu ulogu kao sastavni dio svih staničnih membrana.

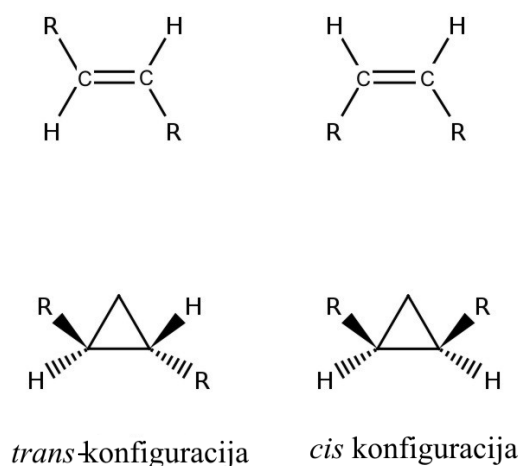
Prema Erkkilä i sur. (2008), visok sadržaj lipida i kolesterola u krvi, ateroskleroza, gojaznost, hipertenzija, koronarne bolesti srca, u najužoj su vezi s vrstom i količinom masti koja se dnevno unosi u organizam. Nedostatak masnih kiselina, kao i njihov suvišak, može imati štetan utjecaj na zdravlje čovjeka. Stoga stručnjaci preporučuju da se u prehrani pretežito koriste biljna ulja bogata nezasićenim mastima, a da ukupni unos masti u prehrani odraslih osoba ne premašuje više od 25–30% energetske vrijednosti dnevnog obroka, s tim da se ukupno 10% namiruje iz masti životinjskog porijekla (zasićenih masti). Tajna pravilne prehrane jest raznolikost i umjerenost, no sveprisutan brzi životni tempo često nam ne ostavlja drugi izbor nego posegnuti za najjednostavnijim rješenjem, koje je često i najlošije. Upravo je zato razvoj funkcionalne hrane danas jedan od najbrže rastućih trendova u prehrambenoj industriji. Termin funkcionalne hrane danas se koristi češće nego ikad prije, a predstavlja hranu s biološki aktivnim djelovanjem, koja pomaže očuvanju zdravlja i utječe na pojedine tjelesne funkcije. Funkcionalna hrana je ona hrana koja osim osnovnih nutrijenata nužnih za rast i razvoj organizma sadržava i sastojke koji poboljšavaju zdravlje ili smanjuju rizik od nastanka bolesti, a konzumira se kao sastavni dio svakodnevne prehrane. Probiotici, prebiotici, omega-3 masne kiseline i vitamini najčešće su aktivne tvari koje danas možemo pronaći u kategoriji funkcionalnih mliječnih proizvoda.

Nervonska kiselina je mononezasićena masna kiselina potrebna za razvitak i funkciju neurološkog sustava svih sisavaca. Prirodan izvor ove kiseline ograničen je na samo nekoliko biljnih vrsta, u kojima nervonska kiselina nastaje izduživanjem lanaca oleinske kiseline, procesom u kojem važnu ulogu imaju enzimi elongaze masnih kiselina. Karakterizacijom i funkcionalnom analizom elongaze masnih kiselina iz više biljnih vrsta omogućen je razvoj novih načina proizvodnje biljnih ulja, obogaćenih nervonskom kiselinom primjenom metoda genetičkog inženjerstva, a za dobrobit zdravlja ljudi i životinja.

## 1.1. Masne kiseline

Masne kiseline su dugolančane karboksilne kiseline koje su građene iz ugljikovog lanca s terminalnom metilnom (CH<sub>3</sub>-) grupom, na jednom, i karboksilnom (-COOH) grupom na drugom kraju lanca. Masne kiseline međusobno se razlikuju prema broju ugljikovih atoma u ugljikovodičnom lancu, te broju, položaju i konfiguraciji dvolančanih (nezasićenih) veza, kao i prisutnost drugih funkcionalnih grupa duž lanca. Prema vrsti kemijskih veza, mogu biti zasićene i nezasićene (Johnson i Devenport, 1971). Masne kiseline, koje su sastavni dio masti i ulja, u prirodnim namirnicama i industrijskim proizvodima mogu se javiti kao slobodne ili esterski vezane u obliku mono-, di- i triglicerida, fosfolipida, lipoproteina ili glikolipida.

Prema nomenklaturi koju je odredila Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC), svaka masna kiselina ima sistematsko ime, prema ugljikovodiku s istim brojem C-atoma, a u ovisnosti o broju dvostrukih veza u molekuli. Najveći broj masnih kiselina ima i svoj uobičajeni naziv koji vrlo često potječe od vrste masti u kojoj te masne kiseline prevladavaju. U stručnoj literaturi masne kiseline obično se obilježavaju u skraćenom obliku, kao omjer broja ugljikovih (C) atoma u molekuli i broja, tj. položaja i konfiguracije dvostrukih veza. Tako je primjerice, skraćeni naziv za linolnu kiselinu 18:2 (9,12), pri čemu naziv opisuje lanac s 18 C atoma i dvije nezasićene veze na položaju C9 i C12 od karboksilnog kraja. U prirodi su najzastupljenije dvostruke veze u *cis*-konfiguraciji, a ako su prisutne dvostruke veze u *trans*-konfiguraciji, obvezno se naznače kao t, tr ili *trans*.



Slika 1. Oblik *cis*- i *trans*- dvostruke veze.



U molekuli zasićenih masnih kiselina (*engl.* Saturated fatty acid ili SFA) svi atomi ugljika međusobno su povezani jednostrukim vezama, a na svakom ugljikovom atomu nalazi se maksimalno mogući broj vodikovih atoma. Takva je struktura stabilna i manje podložna kemijskim reakcijama. Masnim kiselinama može nedostajati jedan par vodikovih atoma u lancu, i u tom slučaju masna kiselina sadržava jednu dvostruku (C=C) vezu te je jednostruko ili mononezasićena (*engl.* Monounsaturated fatty acid, MUFA). Višestruko nezasićene ili polinezasićene masne kiseline (*engl.* Polyunsaturated fatty acid, PUFA) u ugljikovom lancu sadržavaju više od jedne nezasićene ili dvostruke veze. Zbog mogućnosti pucanja dvostrukih veza, nezasićene masne kiseline su nestabilnije, a reaktivnost im raste s porastom broja dvostrukih veza. U Tablici 1. prikazane su najznačajnije masne kiseline, kao i njihova podjela, uobičajene oznake i broj C atoma. Omega ( $\omega$ ) ili n-broj u nomenklaturi polinezasićenih masnih kiselina uveden je radi njihove identifikacije (Holman, 1964), a označava položaj prve dvostruke veze u ugljikovom lancu, brojeno od CH<sub>3</sub> skupine. Osnovni predstavnik skupine omega-6 PUFA je linolna kiselina (LA, C18:2 n-6), a skupine omega-3 PUFA  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA, C18:3 n-3). Zbog nepostojanja enzima potrebnih za oksidaciju masnih kiselina na položaju C3 i C6 od metilnog kraja, čovjek i drugi sisavci ne mogu sintetizirati LA i ALA već ih moraju unositi u organizam putem hrane, što uvjetuje njihovu esencijalnost (Simopoulos, 1991).

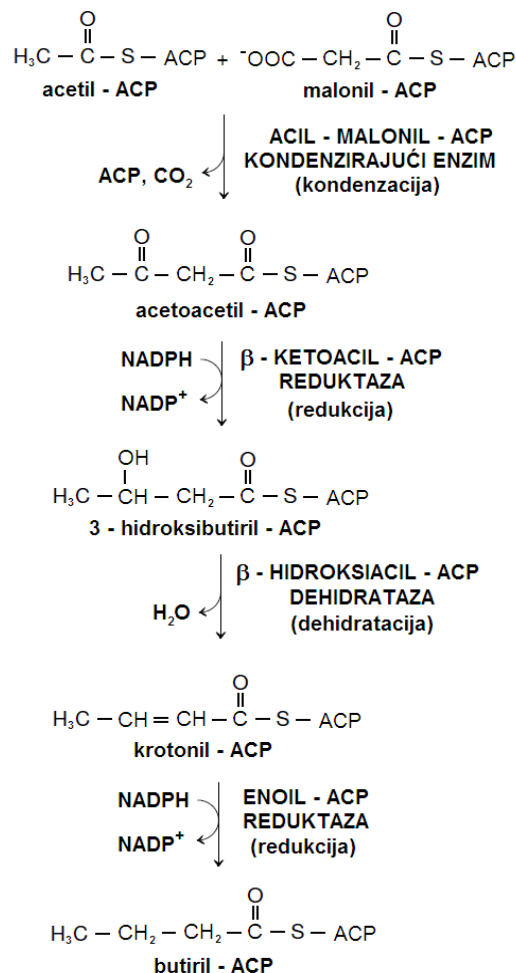
Tablica 1. Podjela masnih kiselina prema broju ugljikovih atoma u ugljikovodičnom lancu te broju, položaju i konfiguraciji dvolančanih (nezasićenih) veza.

Uobičajeni naziv masne kiseline	Kemijski naziv masne kiseline	Broj C atoma i dvostrukih veza
<b>ZASIĆENE MASNE KISELINE</b>		
maslačna	butanska kiselina	4:0
kapronska	heksanska kiselina	6:0
kaprilna	oktanska kiselina	8:0
kaprinska	dekanska kiselina	10:0
laurinska	dodekanska	12:0
miristinska	tetradekanska	14:0
palmitinska	heksadekanska	16:0
stearinska	oktadekanska	18:0
<b>MONONEZASIĆENE MASNE KISELINE</b>		
oleinska	cis-9-oktadecenska	18:1
elaidična	trans-9-oktadecenska	18:1
eruka	cis-13-dokozenka	22:1
nervonska	cis-15-tetrakozaenska	24:1
<b>POLINEZASIĆENE MASNE KISELINE</b>		
linolna	cis,cis-9,12 oktadekadienska	18:2
linolenska	sve cis-9,12,15 oktadekatrienska	18:3
arahidonska	sve cis-5,8,11,14 eikozatetraenska	20:4
EPA	sve cis-5,8,11,14,17 eikozapentaenska	20:5
DHA	sve cis-4,7,10,13,16,19 dokozaheksaenska	22:6

## 1.2. Biosinteza masnih kiselina

Osnovni prekursor za sintezu masnih kiselina je acetil-CoA, aktivirana acetilna jedinica. Acetil-CoA nastaje oksidativnom dekarboksilacijom piruvata u mitohondrijima. Za sintezu masnih kiselina acetil-CoA mora prijeći iz mitohondrija u citosol. Unutrašnja mitohondrijska membrana nije propusna za acetil-CoA, pa se iz mitohondrija u citosol transportira citrat koji se zatim djelovanjem enzima citrat-liaze cijepa na acetil-CoA i oksaloacetat. U citosolu, sinteza masnih kiselina započinje ireverzibilnom reakcijom karboksilacije acetil-CoA u malonil-CoA (Slika 2). Reakcija se odvija pomoću enzima acetil-CoA-karboksilaze koja, kao i piruvat-karboksilaza sadržava prostetsku skupinu biotin. Sintezu zasićenih dugolančanih masnih kiselina katalizira multienzimski kompleks, koji se naziva sintaza masnih kiselina. Međuprodukti sinteze masnih kiselina su kovalentno vezani na proteinski nosač acilne

jedinice (*engl.* Acil carrier protein, ACP) preko sulfidrilnog kraja fosfopanteteinske prostetske skupine. Prva reakcija elongacije je kondenzacija acetil-ACP i malonil-ACP uz otpuštanje CO<sub>2</sub>. Slijede redukcija, dehidracija i ponovna redukcija, prikazane na Slici 2. Dekarboksilacija malonilne jedinice pokretačka je sila za sintezu masnih kiselina, jer se dekarboksilacijom malonilne jedinice oslobađa ona ista energija koja je bila oslobođena cijepanjem ATP-a i uložena u stvaranje nove kovalente veze tj. u nastajanje malonilne jedinice iz acetilne jedinice. Sintaza masnih kiselina odvija se na enzimskom kompleksu sintazi masnih kiselina samo do šesnaestog C-atoma zbog prostornih razloga, tako da je palmitat glavni produkt sinteze masnih kiselina. Palmitat je, nadalje, prekursor za sintezu masnih kiselina duljih od 16 C-atoma i nezasićenih masnih kiselina, koje nastaju djelovanjem drugih enzimskih sustava (sustav elongacije masnih kiselina) koji su vezani na membrani glatkog endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija.



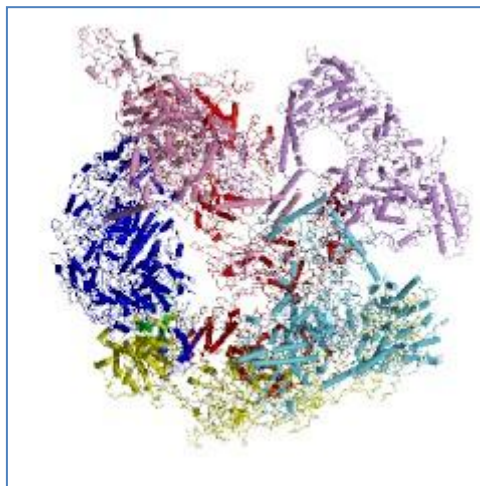
Slika 2. Reakcije sinteze masnih kiselina.

### 1.3. Biosinteza dugolančanih masnih kiselina

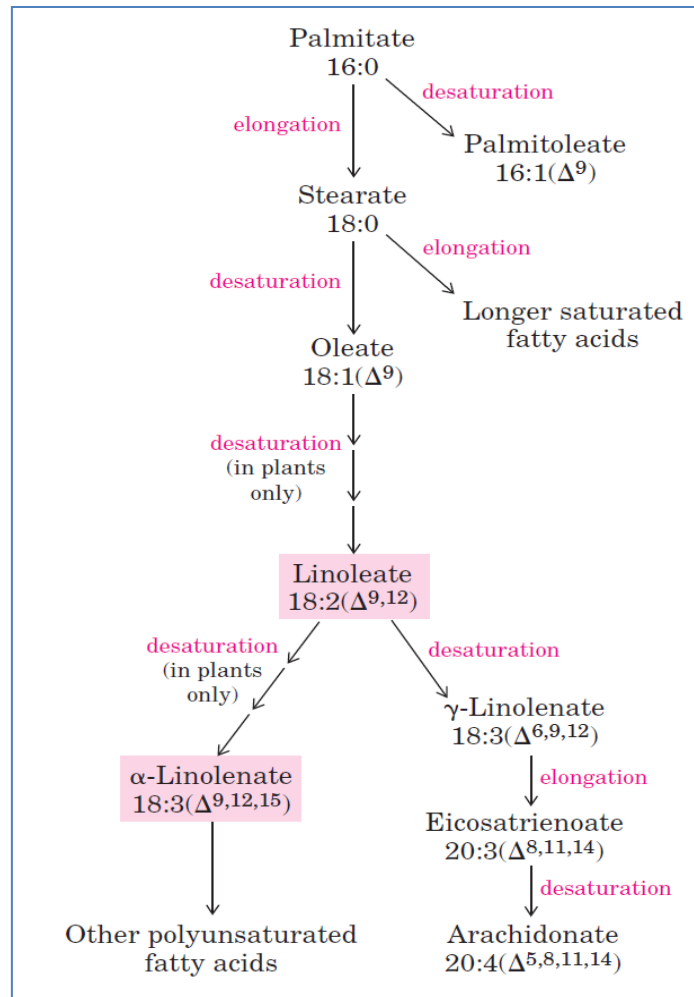
U eukariota se produljenje (elongacija) lanca masnih kiselina duljih od 16 C-atoma događa s pomoću elongacijskog kompleksa (*engl.* fatty acid elongation, FAE) (Slika 3) koji se nalazi na citoplazmatskoj strani membrane endoplazmatskog retikuluma. Prekursor za biosintezu dugolančanih masnih kiselina je palmitat, a u svakom ciklusu elongacije masnih kiselina dodaju se C2 jedinice na postojeći lanac. Donor C2 jedinica je malonil-CoA (Blacklock i Jaworski, 2002; Salas i sur., 2005).

Palmitat podliježe reakcijama dehidrogenacije ili elongacije; dehidrogenacijom nastaju mono- ili polinezasićene masne kiseline. Dehidrogenacijom palmitata nastaje palmitoleat (16:1( $\Delta^9$ )), nezasićena masna kiselina koja ima jednu dvostruku vezu.

Elongacijom palmitata nastaje stearat (18:0) koji daljnjom elongacijom daje dulje zasićene masne kiseline, ili reakcijom dehidrogenacije daje oleat (18:1( $\Delta^9$ )), nezasićenu masnu kiselinu koja ima jednu dvostruku vezu (Slika 4).



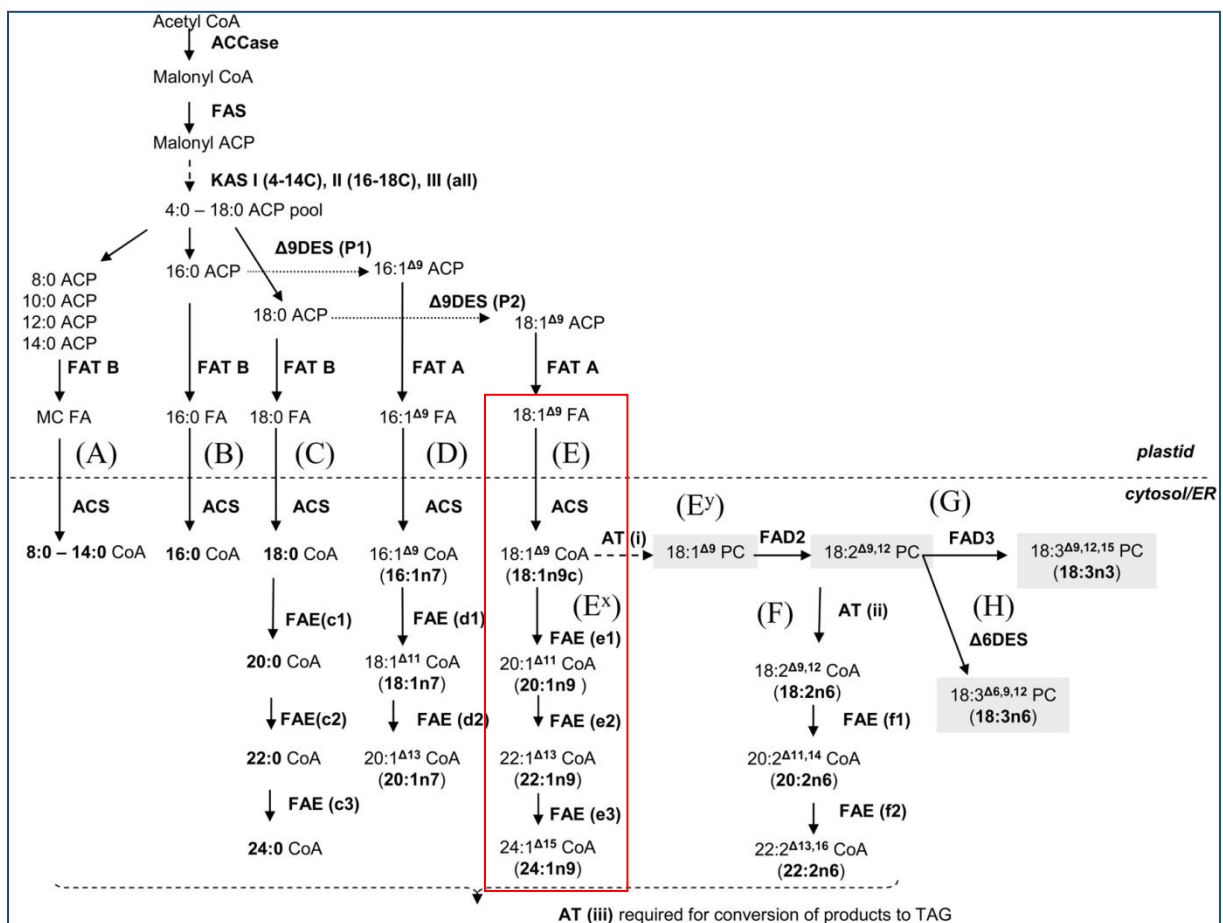
Slika 3. Trodimenzionalna struktura enzima 3-ketoacil-CoA sintaze (*engl.* fatty acid elongase, EC 2.3.1.86) (izvor: European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute, 2011).



Slika 4. Putevi biosinteze dugolančanih masnih kiselina (izvor: Stryer i sur., 2002).

U organizmu LA i ALA mogu se metabolizirati u više polinezasićene masne kiseline djelovanjem desaturacijskih i elongacijskih enzima (Pereira i sur., 2002). Desaturacijski enzimi uvode novu dvostruku vezu u ugljikov lanac dok elongacijski enzimi dodaju dva nova C atoma. Procesima elongacije i desaturacije iz LA nastaju polinezasićene masne kiseline serije n-6, poput arahidonske kiseline (AA, 20:4 n-6), dok iz ALA u organizmu nastaju polinezasićene masne kiseline serije n-3, kao što su eikozapentaenoična (EPA, 20:5, n-3) i dokozaheksaenoična (DHA, 22:6, n-3) kiselina. Metabolički put n-6 i n-3 PUFA sastoji se iz niza naizmjeničnih desaturacija i elongacija, pri čemu između n-6 i n-3 kiselina postoji konkurencija za desaturacijskim enzimima (Simopoulos, 1991). Prvi korak u sintezi AA iz LA i EPA iz ALA je  $\Delta^6$ -desaturacija, i nastavak sinteze ovisi o aktivnosti  $\Delta^6$ -desaturaze, koja pokazuje veći afinitet prema n-3 masnim kiselinama (Simopoulos, 1991; Dommels i sur., 2002).

Četiri reakcije uključene u elongacijski sustav masnih kiselina kod biljaka nalikuju na reakcije koje se odvijaju za vrijeme sinteze masnih kiselina u organizmu čovjeka. Prva reakcija je kondenzacija malonil-CoA s dugim lancem acil-CoA s pomoću enzima 3-ketoacil-CoA sintaze (KCS, katkad se naziva i fatty acid elongase, FAE) i nastaje 3-ketoacil-CoA. Zatim slijedi njegova redukcija s pomoću enzima 3-ketoacil-CoA reduktaze i nastaje 3-hidroksiacil-CoA, koji se dehidratacijom prevodi u 2-enoil-CoA. Zatim slijedi redukcija 2-enoil-CoA što rezultira produživanjem acil-CoA. Tijekom prošlog desetljeća napredak u razumijevanju biosinteze masnih kiselina vrlo dugog lanca postignut je kloniranjem gena *KCS* iz različitih biljaka i provođenjem funkcionalnih ekspresijskih studija (James i sur., 1995.; Lassner i sur., 1996). Te studije su dokazale da je enzim *KCS* taj koji određuje krajnju duljinu lanca masnih kiselina (Kunst i sur., 1992; Millar i Kunst, 1997; Moon i sur., 2001; Mietkiewska i sur., 2004).



Slika 5. Biosintetski putevi masnih kiselina kod biljaka iz porodice *Brassicaceae*. Crveni okvir označava put biosinteze nervonske kiseline (izvor: Barker i sur., 2007).

#### 1.4. Uloga polinezasićenih masnih kiselina u prehrani

Najvažnija novija otkrića na području nutritivne vrijednosti lipida vezana su uz značenje i ulogu polinezasićenih masnih kiselina u prehrani ljudi (Sardesai, 1992a i 1992b). Prema rezultatima znanstvenih istraživanja, neke masne kiseline povišuju koncentraciju serumskog kolesterola, osobito LDL-kolesterola (*engl.* Low Density Lipoproteins), a smanjuju udio HDL-kolesterola (*engl.* High Density Lipoproteins) i time bitno utječu na razvoj ateroskleroze (Ashes i sur., 1979). Nadalje, istraživanja upućuju da na pojavu ateroskleroze i koronarnih bolesti ne utječe samo veći udio zasićenih masnih kiselina nego i veći udio trans-masnih kiselina u obroku (Judd i sur., 1994). Omjer unosa polinezasićenih masnih kiselina/zasićenih masnih kiselina veći od dva, držan kao mjera za optimalan unos masnih kiselina u obroku napušten je, a sve se više prihvaća ideja da je mjera optimalnog unosa masnih kiselina obrokom zapravo omjer eikozapentaenoične, C 20:5 n-3 (*engl.* Eicosapentaenoic acid, EPA) i dokozaheksaenoične, 22:6 n-3 (*engl.* Docosahexaenoic acid, DHA) kiseline (Ravnskov, 1998.; Kratz i sur., 2002.).

Koliki bi trebao biti idealan omjer EPA/DHA još nije utvrđeno, ali se pretpostavlja da je oko 1,6 (Bhattacharya i sur., 2007). Danas je nedostatna prehrana rijedak problem u razvijenim dijelovima svijeta, međutim, bolesti vezane uz prekomjerno konzumiranje hrane i neusklađenost sastava obroka postali su sve češća prijetnja zdravlju i u mlađoj i u starijoj životnoj dobi.

#### 1.5. Izvori polinezasićenih masnih kiselina u hrani

Bogat izvor LA (n-6) u hrani jesu biljne klice i ulja, kao što su suncokretovo, kukuruzno ili sojino. Linolna kiselina iz hrane drži se glavnim izvorom arahidonske kiseline u organizmu. Meso žitaricama tovljenih životinja, kao i žumanjak jajeta također su izravan izvor LA i AA u prehrani ljudi. Osnovna n-3 polinezasićena masna kiselina,  $\alpha$ -linolenska, u prirodi se nalazi u kloroplastu lisnatoga zelenog povrća, te u većoj mjeri također u pojedinim biljnim uljima, kao što su laneno ili repičino ulje. Mesa također sadržavaju određene količine ALA. Vrste masnih morskih riba, kao što su skuša, srdela, tuna, losos i haringa posebno su bogat izvor dugolančanih n-3 EPA i DHA (>18mg/g EPA+DHA; Givens i Gibbs, 2006). U malim količinama dugolančane omega-3 kiseline EPA i DHA prisutne su i u mesu. Meso peradi u pravilu sadržava više EPA i DHA u odnosu na svinjsko i goveđe meso (Givens i Gibbs, 2006). Dugolančane PUFA, kao što su AA (n-6), odnosno EPA (n-6) i DHA (n-3) u tjelesnim tkivima mogu potjecati izravno iz konzumirane hrane ili se metaboliziraju iz svojih prekursora u hrani LA, odnosno ALA. No učinkovitost endogene pretvorbe ALA iz hrane u

EPA i DHA u organizmu odraslog čovjeka nije velika (Burdge i sur., 2003) te se dugolančane n-3 PUFA iz hrane danas također drže esencijalnim masnim kiselinama (Givens i sur., 2006).

#### 1.6. Funkcija polinezasićenih masnih kiselina u organizmu i učinak na zdravlje

U organizmu, PUFA obje n-skupine (LA, ALA, AA, EPA, DHA) dolaze u sastavu fosfolipida svih staničnih membrana, gdje imaju važnu ulogu u održavanju elastičnosti membrana. Strukturni lipidi mozga, moždana opna, retina oka, tkivo testisa i sperma također sadržavaju PUFA, posebice DHA (Simopoulos, 1991 i 1999). U nedostatku PUFA, u membrane se ugrađuje više zasićenih masnih kiselina, čime se smanjuje fluidnost i stabilnost membrana. To može rezultirati povećanom propusnošću tkiva uz gubitak vode i hranjivih tvari i promjene u aktivnosti enzima, prijenosu hormonskih signala i drugim funkcijama staničnih membrana (Wan i sur., 1988). Nadalje, utvrđeno je da PUFA s 20 C atoma: dihomo- $\gamma$  – linolenska (DGLA, C20:3 n-6), arahidonska (AA, C20:4 n-6) i eikozapentaenoična (EPA, C20:5 n-3) imaju važnu funkciju u sintezi eikozanoida u ljudskom organizmu. Eikozanoidi su tkivni hormoni s lokalnim nastajanjem i djelovanjem, koji u različitim tkivima reguliraju brojne fiziološke procese, primjerice upalne procese i imunološki odgovor, sinaptički prijenos i protok iona. Eikozanoidi koji nastaju u krvožilnom sustavu: tromboksani u membranama krvnih pločica (trombocita) i prostaglandini koje proizvodi endotel stijenki krvnih žila, uključeni su u regulaciju protoka krvi i procesa grušanja krvi (Simopoulos, 1991).

#### 1.7. Uloga mononezasićenih masnih kiselina

Većina kardiologa i nutricionista preporučuje korištenje mononezasićenih ulja u prehrani, jer je dokazano da snižavaju razinu lošega LDL kolesterola, a podižu razinu protektivnoga HDL kolesterola. Osim djelovanja na krvožilni sustav, bitno je smanjen broj karcinoma u populacijama koje se hrane mononezasićenim uljima. Novim se tehnologijama, ali i genetskim promjenama tradicionalnih uljarica u njihovim uljima, povećava količina za krvožilni sustav potrebne oleinske kiseline. Takva se ulja već mogu naći na našem tržištu i posebno su označena.



## 1.8. Nervonska kiselina

Nervonska kiselina (24:1  $\Delta^{15}$ ) je mononezasićena masna kiselina (*engl.* Very long chain monounsaturated fatty acid, VLCMFA) prisutna u sfingolipidnoj frakciji bijele tvari mozga i u mijelinskom sloju perifernih živčanih vlakana sisavaca (Martinez i Mougan, 1998). S izuzetkom nervonil-sfingolipida iz skeletnih mišića riba, u namirnicama životinjskog porijekla nema nervonske kiseline. Prirodan izvor ove kiseline tek su neke biljne vrste u kojima nervonska kiselina nastaje produživanjem lanaca oleinske kiseline (18:1), procesom u kojem važnu ulogu imaju enzimi elongaze masnih kiselina (KCS, FAE, EC 2.3.1.86). Interes i potreba za prizvodnjom nervonske kiseline raste otkako je nervonska kiselina predložena kao bioaktivni lipidni dodatak prehrani koji poboljšava razvitak i funkciju neurološkog sustava (Sargent i sur., 1994). Nervonska kiselina preporučuje se u prehrani osoba oboljelih od genetskog poremećaja metabolizma lipidnih peroksisoma (adrenoleukodistrofija), osoba s multiplom sklerozom i prerano rođenoj djeci koja se ne hrane majčinim mlijekom. Promjene u razini nervonske kiseline unutar tkiva povezane su s nekim neurološkim poremećajima (Assies i sur., 2001). Zbog mnogobrojnih pozitivnih učinaka na opću kliničku sliku osoba s raznim neurološkim oboljenjima, postoji sve veći interes za proizvodnju ulja nervonske kiseline s ciljem primjene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Taylor i sur, 2009).

U biljaka sinteza zasićenih masnih kiselina ide uglavnom do stearinske i palmitinske kiseline, a sinteza viših i modificiranih kiselina odvija se naknadno, posebnim reakcijama elongacije i desaturacije. Sastav masnih kiselina karakterističan je za pojedinu uljaricu. Postoji samo nekoliko biljnih vrsta, većina iz porodice *Brassicaceae*, sa znatnim udjelom nervonske kiseline u sjemenskom ulju (Appelqvist, 1976). Grčka režuha (*Cardamina graeca* L.) je jedna od njih; sjeme te biljke sadržava 9,3% eruka kiseline i 54% nervonske kiseline (Jart, 1978). To je mala mediteranska biljka (15-20 cm) koja raste na šumskom području s crvenicom (terra rossa), na dobro zaklonjenom području. Na žalost, zbog malog prinosa sjemena i male ukupne biomase, ova vrsta nije pogodna za masovni uzgoj. No, zbog visoke razine nervonske kiseline u sjemenkama, ova biljka je dobar izvor za izolaciju gena koji kodira enzim elongazu masnih kiselina (KCS), a s ciljem primjene u biotehnološkim procesima proizvodnje nervonske kiseline.

1.9. Novi načini proizvodnje nezasićenih masnih kiselina vrlo dugih lanaca u biljkama

Nezasićene masne kiseline vrlo dugih lanaca imaju važnu ulogu u ljudskom zdravlju i prehrani, pa njihov nedostatak u prehrani, kao i suvišak, mogu imati znatne posljedice na zdravlje čovjeka. Konkretno, fetalni razvoj ovisi o opskrbi n-3 polinezasićenih masnih kiselina. Nezasićene masne kiseline također su se pokazale kao zaštita protiv kardiovaskularnih bolesti i rizika povezanih s metaboličkim sindromom. S obzirom na smanjenje zaliha morske ribe, koja predstavljaj dominantan prirodan izvor n-3 nezasićenih masnih kiselina, potrebno je naći alternativne izvore nezasićenih masnih kiselina. Poboljšanje nutritivnog sastava usjeva može biti povećanje razine endogenih hranjivih tvari (npr. vitamin E) (Cahoon i sur., 2003) ili alternativno uvođenje spojeva koji nisu prirodno prisutni (npr. esencijalnih masnih kiselina) u biljaka (Jaworski i Cahoon, 2003). Transgene biljke koje su genetičkim inženjerstvom promijenjene na taj način da akumuliraju određene spojeve koji su od koristi za ljudsku prehranu i zdravlje počele su se pojavljivati kao održiv alternativni izvor određenih tvari važnih za organizam (Thelen i Olrogge, 2002). Postoji značajan potencijal za korištenje molekularnih tehnika za proizvodnju biljaka koje su promijenjene na taj način da se poboljšava nutritivni sastav njihovih usjeva (Tucker, 2003). Jedan od načina je modificiranje enzima u putu sinteze masnih kiselina (promjene sastava, duljine lanaca i stupnja nezasićenosti), a to se može postići modifikacijom postojećih ili unošenjem novih gena. Uljarice se mogu genetski modificirati kako bi sadržavale veće količine poželjnih masnih kiselina i smanjene količine nepoželjnih (zasićenih) masnih kiselina.

## 2. Opći i specifični ciljevi rada

---

Opći cilj istraživanja koji prelazi okvire ovog rada je uvođenje gena koji kodira za enzim 3-ketoacil-CoA sintazu (KCS) iz grčke režuhe u bundevu golicu (*Cucurbita pepo* L. var *Styriaca*). Sjemenke i ulje bundeve golicice tradicionalno se proizvode u regiji središnje Europe, a karakteristika sjemenki je da nemaju lupinu što u mnogome olakšava proces proizvodnje ulja. Bundeva golica obogaćena nervonskom kiselinom mogla bi predstavljati dobar izvor funkcionalne hrane koja pogoduje zdravlju mozga i živčanog sustava ljudi i životinja.

Kao važan korak prije transformacije biljnih stanica, nužno je provjeriti funkcionalnost izoliranog gena *KCS* iz grčke režuhe. Cilj ovoga rada bio je prirediti plazmidne konstrukte koji sadrže gen *CgKCS*, transformirati stanice kvasca *S. cerevisiae*, te analizirati aktivnost transgena *CgKCS* u stanicama kvasca. Određeni su optimalni uvjeti za razdvajanje masnih kiselina tehnikom plinske kromatografije i dokazana funkcionalnost enzima kojeg kodira transgen *CgKSC*.

### 3. Materijali i Metode

---

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

Za umnažanje plazmida pGEM-T Easy i pYES2 korištena je bakterija *Escherichia coli*, soj DH5 $\alpha$  genotipa *supE44*,  $\Delta$ *lacU169*( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*.

Za prekomjernu ekspresiju transgena *CgKCS* u stanicama kvasca, korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, soj BY4741 genotipa *MATa*; *his3 $\Delta$  1*; *leu2 $\Delta$  0*; *met15 $\Delta$  0*; *ura3 $\Delta$  0* (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis, EUROSCARF).

##### 3.1.2. Biljna DNA

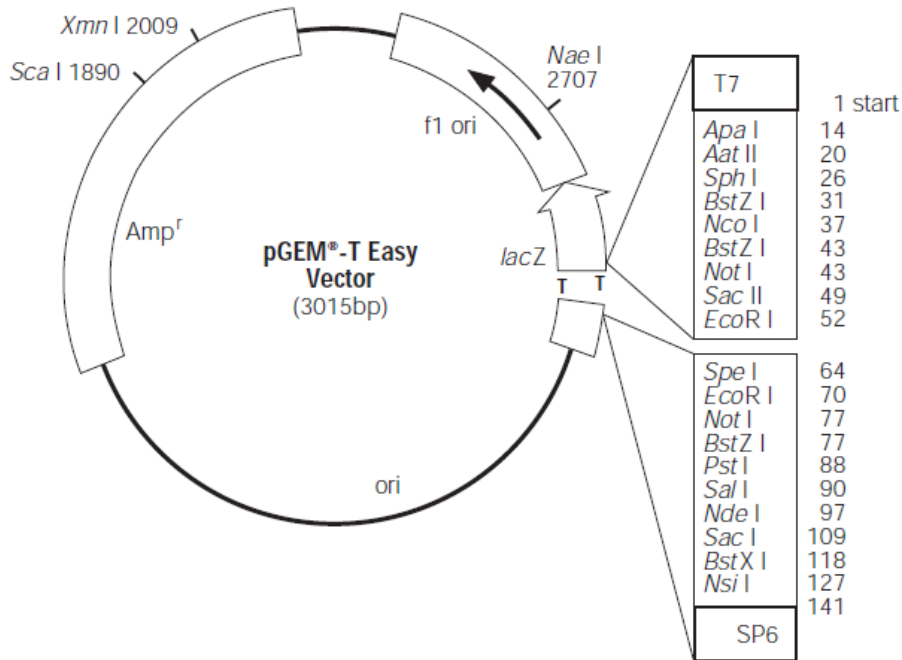
Za umnažanje gena *CgKCS* lančanom reakcijom polimeraze (PCR), korišten je uzorak ukupne genomske DNA iz listova grčke režuhe *Cardamine graeca* (L.), prethodno izoliran u Laboratoriju za kemijsku biologiju (IRB) i pohranjen pri -20 °C.

##### 3.1.3. Plazmidna DNA (vektori)

Za kloniranje i umnožavanje gena *CgKCS* u stanicama bakterije *Escherichia coli* korišten je plazmid pGEM-T Easy (Promega), veličine 3,0 kb (Slika 6), dostupan u linearnoj formi prilagođenoj kloniranju odsječaka dvolančane DNA, umnoženih reakcijom PCR. Plazmid pGEM-T Easy nosi dio gena *lacZ* koji sadržava višestruko mjesto za kloniranje omeđeno promotorima iz bakteriofaga T7 i SP6. Taj dio plazmida čini osnovu za  $\alpha$ -komplementaciju i omogućuje "plavo-bijelu" selekciju transformanata. Plazmid još sadržava gen za rezistenciju na ampicilin (Amp<sup>r</sup>), ishodište replikacije bakteriofaga f1 za umnažanje jednolančane DNA (f1 origin). Klice komplementarne promotorima bakteriofaga T7 i SP6 koriste se za određivanje slijeda nukleotida.

Sojevi *E. coli* koji su korišteni kao kompetentne stanice pri transformaciji proizvode samo C-terminalni dio enzima  $\beta$ -galaktozidaze. Kad je vektor koji sadržava skraćeni derivat gena *lacZ* (*lacZ'*), koji kodira N-terminalni  $\alpha$ -peptid  $\beta$ -galaktozidaze ugrađen u kompetentnu stanicu koja ima nekompletan *lacZ* gen, produkcija  $\alpha$ -peptida  $\beta$ -galaktozidaze komplementirat će s nekompletnom  $\beta$ -galaktozidazom u stanicama domaćina i nastat će aktivna  $\beta$ -galaktozidaza, koja će reagirati sa X-galom i proizvesti plavo obojenje. Kako se područje za višestruko kloniranje u vektorima nalazi unutar gena *lacZ'*, kloniranje inserta u to mjesto razorit će gen.

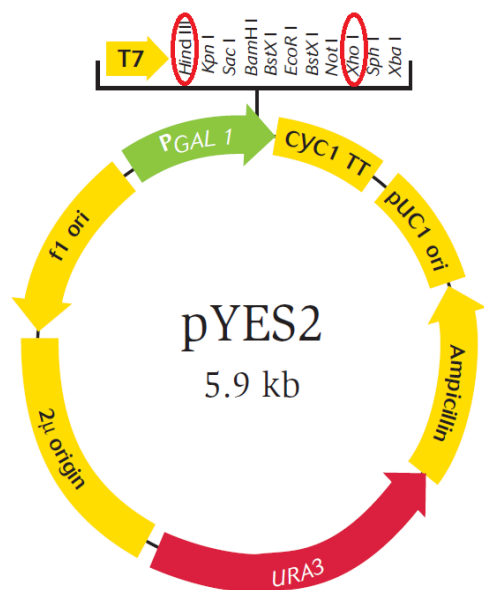
U tom slučaju neće se stvarati  $\alpha$ -peptid i aktivna  $\beta$ -galaktozidaza, pa rekombinanti neće moći razgrađivati X-gal. Kolonije koje nose ugrađeni odsječak DNA su bijelo obojene, a one bez ugrađenog odsječka DNA plavo.



Slika 6. Vektor pGEM-T Easy (Promega) korišten za kloniranje gena *CgKCS*. U višestrukome mjestu za kloniranje označena su mjesta za restriksijske enzime s pomoću kojih je moguće izrezati insert iz vektora.

Za transformaciju stanica kvasca korišten je plazmid pYES2 (Invitrogen), veličine 5,9 kb (Slika 7), dizajniran za inducibilnu ekspresiju rekombinantnih proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Plazmid pYES2 sadržava sekvencu URA3 koja je korištena kao selekcijski biljeg za selekciju transformanata kvasca genotipa, *ura3Δ0*. Nadalje, plazmid pYES2 sadržava GAL1 promotor za prekomjernu ekspresiju rekombinantnog proteina u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, koji se inducira s pomoću galaktoze kao induktora, utišava s pomoću glukoze kao represora. Nadalje, sadržava mjesto za vezanje aktivatora GAL4, CYC1 terminatorski nukleotidni slijed koji je odgovoran za završetak transkripcije, promotor za vezanje T7 RNA polimeraze te višestruko mjesto za kloniranje koje sadržava jedanaest palindromskih nukleotidnih sljedova koje prepoznaju specifične restriksijske endonukleaze. U ovom radu pri kloniranju gena *CgKCS* korištene su restriksijske endonukleaze *HindIII* i *XhoI*.

Ovaj plazmid može se umnožiti i u bakteriji *Escherichia coli* zahvaljujući odgovarajućem ishodištu replikacije (*ori*), a kako sadržava i gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin, selekcija transformiranih bakterija moguća je na hranjivoj podlozi s dodatkom ampicilina.



Slika 7. Vektor pYES2 (Invitrogen) korišten za ekspresiju gena *CgKCS*. U višestrukome mjestu za kloniranje označena su mjesta za restriksijske enzime *HindIII* i *XhoI* s pomoću kojih je transgen kloniran u vektor.

#### 3.1.4. Oligonukleotidne početnice (*engl.* primeri)

U ovom radu korišteno je 7 različitih oligonukleotida (tablica 2), od kojih su početnice CEL 1 i CEL 4 korištene za umnažanje gena *KCS* na kalupu biljne DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR), početnice CGY2F i CGY2R za kloniranje gena *KCS* u vektor pYES2, a početnice T7pro i CYC1 za određivanje primarnog slijeda nukleotida gena *CgKCS* kloniranog u vektor pYES2. Za određivanje primarnog slijeda nukleotida *CgKCS* kloniranog u vektor pGEM-T Easy korištene su početnice T7pro i SP6.

Tablica 2. Oligonukleotidi korišteni kao početnice.

POČETNICE	REDOSLIJED NUKLEOTIDA UNUTAR POČETNICA
<b>CEL 1</b>	5'-ATGACGTCCATTAACGTAAAGCTCC-3'
<b>CEL 4</b>	5'-TTAGGACCGACCGTTTTGGGC-3'
<b>CGY2F</b>	5'-CCCAAGCTTACCATGATGACGTCCATTAACGTA-3'
<b>CGY2R</b>	5'-CCGCTCGAGATCTTAGGACCGACCGTTTT-3'
<b>T7pro</b>	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'
<b>CYC 1</b>	5'-GCGTGAATGTAAGCGTGAC-3'
<b>SP6</b>	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'

Početnica CGY2F sintetizirana je tako da na početku gena *KCS* dodaje restrikcijsko mjesto za restrikcijsku endonukleazu *HindIII*, a dodana je i Kozakova sekvenca (start kodon) zato što vektor pYES2 ne sadržava start kodon (ATG) za inicijaciju transkripcije. Početnica CGY2R sintetizirana je tako da na kraju gena dodaje restrikcijsko mjesto za restrikcijsku endonukleazu *XhoI*.

### 3.1.5. Hranjive podloge i otopine

Sve hranjive podloge i otopine autoklavirane su 15 min pri 120 °C i nadtlaku od 1 atmosfere ili su pripremane iz steriliziranih otopina i sterilne deionizirane vode. Za pripremu krutih hranjivih podloga, tekućim podlogama prije autoklaviranja dodano je 20 g/L agara.

#### 3.1.5.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

##### Kompleksna hranjiva podloga (LB):

bakto tripton (engl. <i>bacto tryptone</i> )	10 g/L
ekstrakt kvasca (engl. <i>bacto yeast extract</i> )	5 g/L
natrijev klorid	10 g/L

##### Bogata hranjiva podloga (SOC):

bakto tripton (engl. <i>bacto tryptone</i> )	20 g/L
ekstrakt kvasca (engl. <i>bacto yeast extract</i> )	5 g/L
natrijev klorid	0,5 g/L
kalijev klorid	0,186 g/L
MgSO <sub>4</sub>	2,4 g/L
glukoza	4 g/L

##### Podloga sa ampicilinom:

Ampicilin je dodan u prethodno ohlađenu autoklaviranu podlogu do konačne koncentracije od 100 µg/mL uporabom matične otopine koncentracije 100 mg/mL sterilizirane filtracijom kroz filter s porama veličine 0.22 µm (*Millipore*).

##### Podloga LB za plavo bijeli odabir:

Na krutu hranjivu podlogu LB s antibiotikom ampicilinom razmazano je 100 µL IPTG (0,5 mM) i 20 µL (80 µg/mL) X-Gal sterilnim staklenim štapićem i čuvano na 4 °C.

### 3.1.5.2. Podloge za uzgoj kvasca

#### Bogata hranjiva podloga (YPD):

bakto pepton (engl. <i>bacto peptone</i> )	20 g/L
ekstrakt kvasca (engl. <i>bacto yeast extract</i> )	10 g/L
glukoza	20 g/L

Hranjiva podloga (bez glukoze) sterilizirana je autoklaviranjem 20 minuta na 120 °C, nakon čega je dodana glukoza prethodno sterilizirana filtriranjem kroz filter veličine pora 0,22 µm, ili autoklaviranjem.

#### Minimalna hranjiva podloga (engl. synthetic dropout; SD):

izvor dušika iz kvasca bez aminokiselina (engl. <i>yeast nitrogen base</i> )	6,7 g/L
glukoza	20 g/L

Minimalna hranjiva podloga osim navedenih sastojaka sadržava i aminokiseline: arginin, cistein, leucin, lizin, treonin i triptofan (0,1 g/ L); asparaginsku kiselinu, histidin, izoleucin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin i valin (0,05 g/ L) i nukleinsku bazu adenin (0,1 g/ L). Kod pripreme selektivne hranjive podloge za uzgoj kvasca koji sadržava plazmid pYES2 izostavlja se dodatak nukleinske baze uracila.

Za krutu YPD i SD podlogu dodano je 20 g/ L agara. Glukoza i galaktoza posebno su sterilizirane filtriranjem ili autoklaviranjem.

### 3.1.5.3. Otopina za transformaciju stanica kvasca

#### Otopina za transformaciju s pomoću litijevog acetata

PEG <sub>3350</sub>	240 µL
Litijev acetat 1 M pH 7,0-7,5 mL	36 µL
DNA-nosača (DNA sperme haringe otopljena u TE-puferu)	10 µL
plazmidna DNA	2,2 µL
dH <sub>2</sub> O	71,8 µL

Otopina za transformaciju priprema se od prethodno steriliziranih otopina.

#### Otopina litijevog acetata

100 mM Litijev acetat, pH 7,5  
5 mM Tris-HCl, pH 7,5  
0,5 mM EDTA



#### 3.1.5.4. Otopine za gel-elektroforezu

Pufer za gel-elektroforezu priprema se u koncentriranom obliku, te se naknadno razrjeđuje destiliranom vodom do željene koncentracije. Nije ga potrebno sterilizirati.

##### TAE-pufer (50x):

Tris	242 g
ledena octena kiselina	57,1 mL
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	100 mL
destilirana voda do 1000 mL	

##### TBE-pufer (5x):

Tris	54 g
Borna kiselina	27,5 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	20 mL
destilirana voda do 1000 mL	

##### Agarozni gel:

Priprema se otapanjem agaroze u 0,5xTBE ili 0,5xTAE-puferu (1x) kojeg se pripremi razrjeđivanjem 5 x koncentrirane matične otopine pufera. Koncentracija agaroze u gelu može biti 7 do 20 g/L, ovisno o potrebi.

##### Boja za nanošenje uzorka:

brom-fenol-plavo	2,5 g/L
ksilen-cijanolo	2,5 g/L
ficoll 400	250,0 g/L

Otopina se ne sterilizira i čuva se pri 4 °C.

##### Etidijev bromid:

Matična otopina priprema se u koncentraciji od 500 µg/mL, ne sterilizira se i čuva pri 4 °C u tamnoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 100 µL matične otopine u 100 mL destilirane vode te se čuva u tamnoj posudi za bojenje gelova.

##### X-Gal :

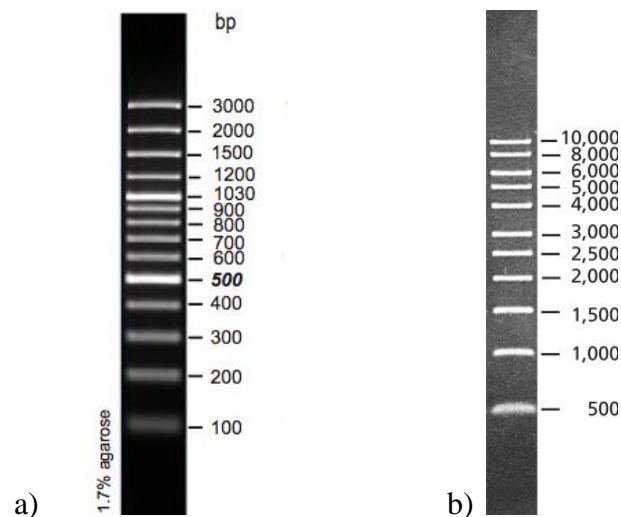
5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid	100 mg
N,N'-dimetil-formamid	2 mL

### 3.1.6. Komercijalno dostupni kompleti

Za izolaciju i pročišćavanje DNA i PCR produkta iz otopine i gela korišten je komplet NucleoSpin<sup>R</sup> Extract II (*Machery-Nagel*), a pri izolaciji plazmidne DNA korišten je komplet GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep kit (*Sigma*).

### 3.1.7. Biljezi

Pri razdvajanju DNA u agaroznom gelu korišteni su ljestvičavi biljezi DNA s razlikom u veličini odsječaka od po 100 parova baza (*Fermentas*, Slika 8a) i 500 parova baza (*Sigma*, Slika 8b).



Slika 8. Ljestvičavi biljezi DNA: a) veličina odsječaka DNA od 100 bp (*Fermentas*), b) veličina odsječaka DNA od 500 bp (*Sigma*).

### 3.1.8. Enzimi

Za provođenje PCR reakcije korištena je *Taq* polimeraza (*Fermentas*) s pripadajućim puferom i otopinom magnezijevog sulfata.

Za provjeru uspješnosti kloniranja gena *CgKCS* u vektor pGEM-T Easy korištene su restrikcijske endonukleaze *EcoRI* i *NotI* (*Fermentas*) s pripadajućim puferima.

Za kloniranje gena *CgKCS* u vektor pYES2 korištene su restrikcijske endonukleaze *HindIII* i *XhoI* (*Fermentas*) s pripadajućim puferima.

Za ligaciju plazmidnog vektora i inserta korištena je T4 DNA ligaza (*Invitrogen*) s pripadajućim puferom.

### 3.1.9. Kemikalije

Standardne kemikalije korištene u izradi ovog rada (kurzivom su označeni proizvođači): agar (*Sigma*), agarozna (*Sigma*), aminokiseline (*Sigma-Aldrich*), ampicilin (*Boehringer Mannheim*), Bacto Agar (*Difco*), Bacto Tryptone (*Difco*), Bacto Yeast Extract (*Difco*), Borna kiselina (*Kemika*), DNA sperme haringe (*Boehringer Mannheim GmbH*), D-glukoza (*Sigma-Aldrich*), etanol (*Kemika*), galaktoza (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), heksan (*Kemika*), izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (*Ambion*), izvor dušika iz kvasca bez aminokiselina (*BD Difco*), Kalijev klorid (*Kemika*), litijev acetat dihidrat (LiOAc), magnezijev sulfat (*Kemika*), metanol (*Kemika*), klorovodična kiselina (HCl) (*Kemika*), Natrij-hidroksid (*Kemika*), Natrij klorid (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*), Sumporna kiselina (*Kemika*), Supelco<sup>TM</sup> Component FAME mix (*Sigma*), polietilenglikol (*Sigma*), redestilirana voda

### 3.1.10. Uređaji

- BioSpec-nano (Shimadzu)
- Centrifuge 5415 C (Eppendorf)
- Centrifuge 5415 R (Eppendorf)
- Gene Pulser X Cell Electroporation System (Bio-Rad)
- GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (Applied Biosystems)
- High resolution 2D gel and blot imaging system (SynGene)
- Model J2-21 Centrifuge (Beckman)
- Multifuge 3 S-R (Heraeus)
- Run One<sup>TM</sup> Electrophoresis Cell (Embi Tec)
- Spektrofotometar Bio Spec – 1601 E (Shimadzu)
- stolna centrifuga (*Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka*)
- Termokupelj (Sutjeska)
- Transilluminator (UVP, INC)
- Tresilica (Shel Lab)
- Varian CP-3800

### 3.2. Metode

Većina metoda korištenih u ovom radu standardne su metode molekularnog kloniranja, detaljno opisane u sveučilišnom priručniku "Metode u molekularnoj biologiji" (Ambriović-Ristov i sur., 2007).

#### 3.2.1. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (PCR, *engl.* Polymerase Chain Reaction) je metoda umnažanja određenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro* uporabom specifičnih početnica. PCR je brza, osjetljiva i specifična metoda. Da bi se određeni odsječak DNA umnožio metodom PCR potrebno je poznavati slijed nukleotida u odsječku DNA koji se umnaža. Pri umnažanju odsječka DNA koriste se dvije početnice komplementarne s krajevima ciljne regije DNA koju želimo umnožiti.

Pri umnažanju gena *CgKCS* na kalupu genomske DNA iz biljke režuhe, standardna reakcijska smjesa volumena 100  $\mu\text{L}$  sadržavala je u konačnim koncentracijama 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  genomske DNA koja je služila kao kalup u reakciji, 0,4  $\mu\text{M}$  svake od dviju oligonukleotidnih početnica CEL 1 i CEL 4, 0,2 mM smjese deoksiribonukleotida, 2,5  $\text{U}/\mu\text{L}$  Taq polimeraze (Fermentas), 1x PCR pufera bez  $\text{Mg}^{2+}$ , 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  i redestiliranu vodu ( $\text{reH}_2\text{O}$ ).

Standardna reakcijska smjesa za umnažanje *CgKCS* gena iz plazmidnog konstrukta pGEM-T Easy/*CgKCS* volumena 50  $\mu\text{L}$  sadržavala je (u konačnim koncentracijama): 1  $\text{ng}/\mu\text{L}$  plazmidne DNA koja je služila kao kalup u reakciji, 0,4  $\mu\text{M}$  svake od dviju oligonukleotidnih početnica, 0,2 mM smjese deoksiribonukleotida, 2,5  $\text{U}/\mu\text{L}$  Taq polimeraze (Fermentas), 1x PCR pufera bez  $\text{Mg}^{2+}$ , 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  i redestiliranu vodu ( $\text{reH}_2\text{O}$ ).

Reakcija se sastoji od tri dijela koji se odvijaju u ciklusima: (1) faza denaturacije dvolančane DNA; (2) faza sparivanja početnica i (3) faza produljivanja lanca DNA (Tablica br). Za provedbu reakcije korišten je uređaj GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (*Applied Biosystems*).

U ovom radu metoda PCR korištena je za umnažanje željenog gena za potrebe kloniranja i pri provjeri uspješnosti kloniranja.

Tablica 3. Uvjeti pri kojima je provedena PCR-reakcija.

Faza PCR-reakcije		vrijeme	temperatura (°C)
početna denaturacija DNA		3 min	95
30 ciklusa	denaturacija DNA	30 s	90
	sparivanje početnica	30 s	62
	sinteza DNA	1 min	72
završna sinteza DNA		5 min	72

### 3.2.2. Razdvajanje DNA elektroforezom u agaroznom gelu

Elektroforezom nazivamo migraciju (putovanje) električki nabijenih čestica kroz otopinu zbog djelovanja električnog polja. Elektroforeza u agaroznom gelu standardna je metoda za brzu i jednostavnu analizu DNA (identifikaciju, razdvajanje, određivanje količine i pročišćavanje DNA). Najvažniji čimbenici koji utječu na učinkovitost razdvajanja DNA su koncentracija agaroze, molekularna veličina i konformacija DNA, jakost i smjer električnog polja, prisutnost interkalirajućih boja (etidijevog bromida) te sastav pufera za elektroforezu. Elektroforezu DNA u agaroznom gelu moguće je provoditi u nativnim uvjetima (u kojima DNA prolazi kroz gel u dvolančanom obliku) ili denaturirajućim uvjetima (u kojima DNA prolazi kroz gel u jednolančanom obliku). Agarozni gelovi razdvajaju molekule DNA veličine od nekoliko stotina do više od 20.000 parova baza. Korišteni su gelovi sa 0,7-1,2% agaroze, ovisno o veličini fragmenata. Molekula DNA vidljiva je u gelu zahvaljujući interkalaciji etidijevog bromida u DNA koji fluorescira pod UV-svjetlom (312 nm).

U ovom radu dvolančana DNA razdvajana je gel-elektroforezom u 0,7-1,2 % agaroznom gelu pripremljenom u 0.5% TBE ili TAE puferu. Uzorci DNA pomiješani su s bojom za nanošenje uzoraka u odnosu 6:1 i nanoseni pipetom u jažice na gelu uronjenom u pufer za elektroforezu (istovjetnom puferu za pripremu agaroznog gela). Elektroforeza je najčešće provedena pri naponu od 50 V u vremenu od pola sata (ovisno o koncentraciji agaroze i veličini fragmenata DNA koji se analiziraju). Nakon provedene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini etidijevog bromida 5 do 10 minuta, osvijetljen UV svjetlom na transiluminatoru i fotografiran u uređaju (SynGene).

### 3.2.3. Izolacija i pročišćavanje DNA

#### 3.2.3.1. Izdvajanje DNA iz agaroznoga gela

Fragmenti su razdvojeni na gel elektroforezi na 1% agaroznom gelu u TAE puferu. Gel je zatim obojan u etidijevom bromidu, a odsječak DNA s pomoću skalpela izrezan iz gela na transiluminatoru pod UV svjetlom. Za izdvajanje DNA iz agaroznog gela upotrijebljen je komercijalni komplet NucleoSpin<sup>R</sup> Extract II proizvođača Macheray-Nagel. Prema uputama proizvođača, gel je otopljen u 200 µL NT pufera, na svakih 100 mg agaroznog gela dodano je 200 µL NT pufera, a potom je uzorak inkubiran pri 50 °C u termokupelji 5–10 min, uz povremeno miješanje na vorteks-miješalici. Otopljeni uzorak nanosen je na kolonu, centrifugiran 1 min na 10.000 rpm, a sakupljeni eluat odbačen. DNA vezana na koloni isprana

je sa 600  $\mu\text{L}$  pufera NT3 centrifugiranjem 1 min na 10.000 rpm. Postupak je ponovljen s 200  $\mu\text{L}$  pufera NT3 da bi se uklonile zaostale kaotropne soli. DNA je otpuštena s kolone nanošenjem 30  $\mu\text{L}$  elucijskog pufera. Uzorak je inkubiran na sobnoj temperaturu 10 min kako bi povećali prinos pročišćene DNA, a nakon toga centrifugiran 2 min na 10.000 rpm.

### 3.2.3.2. Izdvajanje plazmidne DNA

Izdvajanje plazmidne DNA iz bakterija provođeno je primjenom komercijalnog kompleta Gene Elute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep kita (Sigma). Prekonoćna kultura transformanata rashlađena je pri 4 °C, nakon toga stanice su prebačene u epicu od 2 mL i centrifugirane 2 min na 10.000 rpm, supernatant se odbacuje, a postupak je ponovljen. Na talog stanica dodano je 200  $\mu\text{L}$  resuspenzijske otopine te je lagano promiješano okretanjem. Nakon toga bakterijske stanice su lizirane inkubacijom u 200  $\mu\text{L}$  otopine za lizu tijekom 5 min pri sobnoj temperaturi. Nakon toga dodano je 350  $\mu\text{L}$  otopine za neutralizaciju i centrifugirano 10 min na 10 000 rpm. Neutralizirani bakterijski lizat (750  $\mu\text{L}$ ) nanesen je na vlažnu kolonu i centrifugiran 1 min na 10.000 rpm. Zatim je na kolonu dodano 750  $\mu\text{L}$  otopine za ispiranje (Wash solution) i ponovno centrifugirano 1 min na 10.000 rpm. Kolona je postavljena u novu epicu (1,5 mL), a DNA vezana na kolonu otpuštena je dodatkom 30  $\mu\text{L}$  elucijske otopine i centrifugiranjem na 10 000 rpm u trajanju od 1 min. Eluat je spremljen na -20 °C.

### 3.2.3.3. Pročišćavanje PCR produkta

Za pročišćavanje PCR produkta upotrijebljen je komercijalni komplet NucleoSpin<sup>R</sup> Extract II proizvođača Macheray-Nagel. Prema uputama proizvođača, na svakih 100  $\mu\text{L}$  PCR reakcije dodano je 200  $\mu\text{L}$  NT pufera. Uzorak je nanesen na kolonu, centrifugiran 1 min na 10.000 rpm, a sakupljeni eluat odbačen. DNA vezana na koloni isprana je sa 600  $\mu\text{L}$  pufera NT3 centrifugiranjem 1 min na 10.000 rpm. Postupak je ponovljen sa 200  $\mu\text{L}$  pufera NT3 da bi se uklonile zaostale kaotropne soli. DNA je otpuštena s kolone nanošenjem 30  $\mu\text{L}$  elucijskog pufera. Uzorak je inkubiran na sobnoj temperaturu 10 min kako bi povećali prinos pročišćene DNA, a nakon toga centrifugiran 2 min na 10 000 rpm.

### 3.2.4. Kloniranje odsječka DNA u plazmidni vektor s pomoću restrikcijskih enzima

Kloniranje odsječka DNA postupak je koji obuhvaća obradu plazmidne DNA (plazmid, vektor) i odsječka DNA (insert) koji želimo klonirati restrikcijskim enzimima, zatim njihovo spajanje (ligaciju) u novu molekulu rekombinantnog plazmida, transformaciju bakterija rekombinantnim plazmidom i, na posljetku, odabir "pozitivnih" kolonija (onih koje posjeduju ciljani rekombinantni plazmid). Navedeni postupak ugradnje odsječka DNA u plazmidnu DNA omogućuje manipulaciju i analizu kloniranog odsječka.

Restrikcijske endonukleaze su bakterijski enzimi koji cijepaju dvolančanu DNA unutar specifičnih palindromskih sekvencija, ostavljajući tupe ili ljepljive 5' ili 3' krajeve. U ovom radu, pri cijepanju PCR produkta i plazmida, korištene su *HindIII* i *XhoI* restrikcijske endonukleaze (Invitrogen), a pri provjeri kloniranja *CgKCS* gena u vektor pGEM-T Easy korištene su restrikcijske endonukleaze *EcoRI* i *NotI*.

*HindIII* 5' A ↓ AGCTT 3'

*XhoI* 5' C ↓ TCGAG 3'

*EcoRI* 5' G ↓ AATTC 3'

*NotI* 5' G ↓ CGGCCGC 3'

### 3.2.5. AT-kloniranje u plazmidni vektor

AT-kloniranje je specifična vrsta kloniranja odsječka DNA, najčešće dobivenog metodom PCR. Ova vrsta kloniranja zasniva se na svojstvu *Taq* DNA polimeraze da na 3' kraj PCR odsječka spontano dodaje A-deoksinukleotid. Istu reakciju može katalizirati i terminalna transferaza. Takav produkt moguće je klonirati u linearizirani T-vektor koji na krajevima ima komplementarni 3' T-deoksinukleotid produžetak. Postupak koji se koristi za dobivanje T-vektora za AT kloniranje uključuje obradu plazmidnog vektora DNA endonukleazom koja radi ravne krajeve dvolančane DNA te *Taq* DNA polimerazom uz dodatak dTTP, koja dodaje T-deoksinukleotidni produžetak. Postojanje nesparenog T-deoksinukleotida na oba kraja vektora istodobno onemogućuje zatvaranje vektora i olakšava spajanje s insertom koji ima nespareni A-deoksinukleotid na 3' kraju.

U ovom radu metoda AT-kloniranja korištena je za kloniranje i umnožavanje *CgKCS* gena u pGEM-T Easy vektoru.

### 3.2.6. Ligacija fragmenata DNA

Ligacija fragmenata DNA postupak je kojim se povezuju krajevi DNA nastali cijepanjem s restriksijskim endonukleazama, a odvija se s pomoću enzima T4 DNA ligaze. Ovaj enzim međusobno spaja kompatibilne ljepljive ili tupe krajeve DNA odsječaka. T4 DNA ligaza katalitira stvaranje fosfodiesterskih veza između 5' fosfata jednog lanca DNA i 3' hidroksilnog kraja drugog DNA lanca.

Ligacijska smjesa iz kompleta pGEM-T Easy vector system (Promega) sastojala se od: odsječka DNA s genom *KCS* na koji je prethodno reakcijom PCR dodan A-deoksinukleotid na 3' kraju, lineariziranoga plazmidnog vektora pGEM-T Easy (u molarnom omjeru 3,5:1), T4 DNA ligaze (0,1 jedinice/ $\mu$ L ligacijske smjese) i pripadajućeg pufera. Pozitivna kontrola reakcije ligacije umjesto fragmenta DNA s genom *KCS* sadržavala je kontrolni insert DNA, dok negativna kontrola reakcije ligacije nije sadržavala insercijsku DNA.

Ligacijska smjesa za kloniranje u plazmidni vektor pYES2 sastojala se od fragmenta DNA s genom *KCS* (gen *KCS* pocijepan s restriksijskim enzimima *Hind*III i *Xho*I) i lineariziranoga plazmidnog vektora pYES2 (u molarnom omjeru 3:1), T4 DNA ligaze (0,1 jedinice/ $\mu$ L ligacijske smjese, Invitrogen) i pripadajućeg pufera. Priređena reakcijske smjese inkubirane su oko 12 sati pri 4 °C.

### 3.2.7. Određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA

Metodu za određivanje slijeda nukleotida (sekvencioniranje) u molekuli DNA koja je danas u uporabi razvio je sredinom sedamdesetih godina 20. stoljeća Frederick Sanger sa suradnicima u Cambridgeu. Kao kalup za sintezu DNA koristi se jednolančana DNA dobivena denaturacijom dvolančane plazmidne DNA, a oligonukleotidi komplementarni DNA služe kao početnice za započinjanje sinteze komplementarnog lanca. Kad se u rastući lanac DNA ugradi 2',3'- dideoksinukleotid (ddNTP), dolazi do zaustavljanja sinteze DNA, jer se ne može ostvariti esterska veza sa sljedećim (novim) nukleotidom. Tako sinteza novih lanaca završava na različitim mjestima te nastaju fragmenti DNA različitih dužina. Korištenjem smjese sva četiri dNTP i jednog ddNTP dobije se u četiri odvojene reakcije kompletna informacija o slijedu nukleotida u analiziranoj DNA. Novosintetizirani lanci moraju biti radioaktivno ili fluorescentno obilježeni, što se postiže obilježavanjem oligonukleotidne početnice ili ugradnjom jednog ili sva četiri obilježena ddNTP-a. Smjesa fragmenata razdvaja se visokonaponskom elektroforezom u denaturirajućem poliakrilamidnom gelu. Uređaji za određivanje slijeda nukleotida najnovije generacije gotovo su u potpunosti automatizirani. To su uređaji koji umjesto elektroforeze u tankim gelovima poliakrilamida koriste kapilarnu



elektroforezu (uzorci se nakon završene reakcije razdvajaju putujući kroz vrlo dugu i tanku kapilaru) i “četverbojnu biokemiju“ (svaki ddNTP obilježen je drugom fluorescencijskom bojom, tako da se reakcija provodi u istoj mikroepreveti), što bitno pojednostavnjuje rukovanje i skraćuje vrijeme potrebno po jednom uzorku, kao i ljudski rad.

Za potrebe ovog istraživanja, primarna struktura DNA ili sekvenciranje provedeno je u DNA servisu „Macrogene“ (Koreja).

Dobivene sekvence DNA analizirane su na osobnom računaru koristeći program BioEdit (Biological sequence alignment editor for Windows 95/98/NT/2000/XP; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) te uspoređene s poznatim slijedom nukleotida gena *CgKCS* (pristupni broj za GenBank: EU871788.1). Višestruke usporedbe nukleotidnih slijedova analizirane su s pomoću programa ClustalW (European Bioinformatics Institute; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) te su uspoređene s genom *CgKCS* iz banke gena. S pomoću programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, MD, USA; <http://ncbi.nlm.nih.gov>) tražene su homologije s genima pohranjenima u bankama podataka.

**Cardamine graeca 3-ketoacyl-CoA synthase mRNA, complete cds**

GenBank: EU871788.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

---

[Go to:](#)

LOCUS EU871788 1521 bp mRNA linear PLN 05-JUL-2009  
DEFINITION Cardamine graeca 3-ketoacyl-CoA synthase mRNA, complete cds.  
ACCESSION EU871788  
VERSION EU871788.1 GI:214014103  
KEYWORDS .  
SOURCE Cardamine graeca  
ORGANISM [Cardamine graeca](#)  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;  
rosids; malvids; Brassicales; Brassicaceae; Cardamineae; Cardamine.

Slika 9. Dokazivanje identiteta izoliranog gena *CgKCS* u programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, MD, USA; <http://ncbi.nlm.nih.gov>). Visok stupanj homologije (99 %) potvrđen s nukleotidnim slijedom kodirajuće DNA iz grčke režuhe pohranjenom u banci podataka GenBank pod pristupnim brojem EU871788.

### 3.2.8. Priprema kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* za elektroporaciju

Unos strane DNA u stanice moguć je ako stanice podvrgnemo bilo kemijskom, toplinskom ili električnom šoku. Kompetencija se odnosi na pripremu stanične membrane koja tim postupkom postaje propusna za veće molekule.

Stanice bakterije *E. coli* uzgojene su u tekućoj hranjivoj podlozi LB preko noći. Nakon toga 1 mL prekonoćne kulture precijepljen je u 100 mL svježeg LB hranjive podloge te uzgojen na tresilici, 3 h na 37 °C i pri 250 rpm. Tijekom uzgoja provedena su kontinuirana spektrofotometrijska mjerenja optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm. Kada je iznos apsorbancije dosegnuo vrijednost od 0,6 (stanice u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta), uzgoj je prekinut i stanice su ohlađene na ledu 20 minuta. Ohlađene stanice centrifugirane su 10 minuta, pri 3500 rpm pri 4 °C. Bakterijske stanice zatim su resuspendirane u 100 mL sterilnog 10%-tnog glicerola. Stanice su zatim centrifugirane 10 minuta, pri 3500 rpm pri 4 °C. Supernatant je odbačen, a postupak ispiranja ponovljen sa sve manjim volumenima 10% -tnog glicerola: 50 mL, 20 mL, 2 mL i konačno 1 mL. Dobivena kultura razdijeljena je u alikvote od 40 µL, naglo smrznuta u tekućem dušiku i pohranjena pri –80 °C.

### 3.2.9. Transformacija

#### 3.2.9.1. Transformacija kompetentnih bakterija *E. coli* metodom elektroporacije

Elektroporacija je metoda koja koristi kratki električni puls visoke voltaže koji stvara pore u bakterijskoj staničnoj stijenci. Nastanak kratkotrajnih pora omogućuje ulazak strane DNA u bakterijsku stanicu. U prethodno pripremljeni alikvot kompetentnih stanica bakterije *E. coli* u volumenu od 40 µL dodan je 1 µL ligacijske smjese. Dobivena smjesa stavljena je u ohlađenu kivetu za elektroporaciju, te podvrgnuta električnom pulsom od 2500 V, otporu od 400 Ω i kapacitetu od 25 µF. Za elektroporaciju korišten je uređaj Gene Pulser Xcell (*Bio-Rad*, Hercules, CA, SAD). Nakon elektroporacije, stanice su regenerirane jedan sat u bogatoj hranjivoj podlozi SOC (37 °C, 250 rpm), te naciepljene na krutu selektivnu hranjivu podlogu LB s antibiotikom ampicilinom.

#### 3.2.9.2. Transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* s pomoću litijeveg acetata

Unos DNA u kvašćevu stanicu, odnosno transformacija kvasca, provedena je s pomoću litijeveg acetata metodom Gietz-a i sur. (1992). Sve korištene otopine prethodno su sterilizirane. Pojedinačna kolonija s krute YPD podloge naciepljena je u 50 mL tekuće YPD

podloge te je inkubirana preko noći pri 30 °C u tresilici. Gustoća kulture (stanica) određena je spektrofotometrijski pri 600 nm, te su pri apsorpciji od 0,7 stanice sabrane centrifugiranjem 10 min pri 4 °C i pri brzini od 4000 rpm, potom isprane s 25 mL sterilne destilirane vode, te ponovno centrifugirane. Stanični talog resuspendiran je u 1 mL otopine LiOAc (100 mmol/L), potom centrifugiran 15 s pri maksimalnoj brzini (stolna centrifuga *Eppendorf AG*, Hamburg, Njemačka), te ponovno resuspendiran u 0,4 mL LiOAc (100 mmol/L) snažnim miješanjem, a suspenzija podijeljena u alikvote od 50 µL koji su stavljeni na led. U suspenzije stanica zatim je dodano 360 µL otopine za transformaciju stanica (sastav opisan u poglavlju 3.1.5.3.) 240 µL PEG 3350 ( $\varphi = 0,5$ ), 36 µL otopine LiOAc (1 mol/L), 25 µL otopine *ss*-DNA (10 mg/mL) (prethodno prokuhane 5 min, zatim naglo ohlađene) te 1 µg plazmidne DNA. Ovako priređene smjese snažno su miješane 1 min na vrtložnoj miješalici, te su potom inkubirane 30 min na 30 °C uz lagano miješanje. Nakon inkubacije, transformacijske smjese podvrgnute su temperaturnom šoku pri 42 °C u trajanju od 20 min, zatim sabrane centrifugiranjem 15 s na 4000 rpm. Supernatant je uklonjen pipetom, a zaostali talog resuspendiran u 100 µL sterilne destilirane vode, a suspenzija transformiranih stanica nacijepljena na selektivnu krutu podlogu i uzgajana pri 28 °C, a rezultati transformacije očitani su nakon 2 do 3 dana. Uzgojem na SD-Ura podlozi s galaktozom, rasti će samo oni kvasci koji su uspješno transformirani plazmidom pYES2.

### 3.2.10. Indukcija ekspresije gena KCS u kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Transformacija stanica kvasca *S. cerevisiae* soja BY4741 rekombinantnim plazmidom pYES2 u koji je ugrađen gen za *KCS*, provedena je metodom s pomoću litijeveg acetata kako je opisano u poglavlju 3.2.9.2. Suspenzija transformiranih stanica nacijepljena je na SD-Ura krutu podlogu s glukozom, i uzgajana 48-96 sati pri 30 °C, pri čemu rastu kvasci transformirani rekombinantnim plazmidom pYES2. Gen *KCS* se unutar plazmidnog vektora pYES2 nalazi pod kontrolom inducibilnog promotora GAL1. Transkripcija s GAL1 promotora kod laboratorijskog soja *Saccharomyces cerevisiae* reprimirana je u prisutnosti glukoze. Transkripcija se može inducirati na taj način da se iz podloge za uzgoj kvasca ukloni glukoza i doda galaktoza kao izvor ugljika. Premještanje kvasca iz podloge s glukozom u podlogu s galaktozom uzrokuje derepresiju GAL1 promotora i inducira se ekspresija. Nakon inkubacije, kolonije su presađene na način da se sterilnim nastavkom za pipetu povuče preko ploče s kolonijama, koje se nasade na novu SD-Ura krutu podlogu s glukozom, i uzgajaju u istim uvjetima. Pojedinačna kolonija s ploče nacijepljena je u 15 mL SD-Ura podloge sa

glukozom, te inkubirana 48 sati u standardnim uvjetima. Mjerenjem apsorbancije pri 600 nm, određena je gustoća kulture, na osnovi čega je izračunato koliki volumen kulture je potrebno alikvotirati, kako bi nakon inokulacije u podlogu s galaktozom gustoća stanica odgovarala apsorbanciji od 0,4. Tako izračunati volumen kulture centrifugiran je 15 min pri 3000 rpm i 4 °C. Talog stanica potom je pažljivo resuspendiran u sterilnoj destiliranoj vodi i ponovno centrifugiran pri istim uvjetima. Sakupljene stanice resuspendirane su u određenom volumenu tekuće SD-Ura podloge s galaktozom, te je priređena suspenzija stanica inokulirana u preostali volumen iste tekuće podloge, čime je započela ekspresija gena za *KCS* koja je pod kontrolom *GAL1* promotora. Uzgoj je nastavljen preko noći na 30 °C i 300 rpm. Prekonoćna kultura centrifugirana je 15 min pri 3000 rpm na 4 °C. Talog je zatim ispran u destiliranoj sterilnoj vodi i ponovno centrifugiran. Sakupljeni talog stanica je čuvan pri –80 °C.

### 3.2.11. Priprema metilnih estera masnih kiselina

Transesterifikacija (metanoliza) je postupak pri kojem masne kiseline prelaze u oblik metilnih estera (Fatty Acid Methyl Ester, FAME). U tom se obliku određuje sastav masnih kiselina metodom plinske kromatografije (Gas Chromatography, GC). Pri transesterifikaciji dolazi do kidanja postojećih esterskih veza u frakcijama lipida (triacilglicerol/triglicerid, kolesterol-ester/esterificirani kolesterol, fosfolipid) i stvaranja esterskih veza između masnih kiselina iz tih frakcija, kao i slobodnih masnih kiselina i metanola, pri čemu se stvaraju metilni esteri masnih kiselina (FAME). Kako se masne kiseline karakterizirane visokom polarnošću, malim tlakom para i visokom tendencijom stvaranja vodikovih veza vrlo teško se izravno određuju plinskom kromatografijom (Carvalho i Malcata, 2005). Stoga GC analizi prethodi derivatizacija masnih kiselina u hlapljivije i stabilnije derivate kao što su metil-, etil-, propil-, isopropil- i butilestri (Brondz, 2002). Esterifikacijom se poboljšava konfiguracija pikova, separacija i osjetljivost detektora.

Na talog stanica kvasca, koje se nalaze u stacionarnoj fazi rasta (vrijednost apsorbancije od 1,4 pri valnoj duljini od 600 nm) dodano je 5 mL sterilne vode. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4000 rpm, a supernatant je pažljivo uklonjen. Na talog stanica dodano je 2 mL metanolne-KOH (10% KOH u 5% vodenoj otopini metanola), stanice su zatim razbijene s pomoću ultrazvuka (sonikacija), a zatim je provedena saponifikacija 2 h pri 80 °C u termokupelji. Korištene su staklene epruvete s čepom da se spriječi isparavanje. Nakon saponifikacije stanice su ohlađene na ledu. Da bismo uklonili vodenu fazu dodano je 1 ml sterilne vode i 2 mL heksana, suspenzija je promiješana na vrtložnoj miješalici, a zatim centrifugirana 10 min na 4000 rpm, a nakon toga je uklonjena organska faza; postupak je

ponovljen tako da je dodano 2 puta po 2 ml heksana. Na vodenu fazu dodano je 400  $\mu$ L koncentrirane HCl što je uzrokovalo prelazak masnih kiselina u organsku fazu. Ponovno je dodano 2 mL heksana, ali u ovom koraku se masne kiseline nalaze u organskoj fazi. Organska faza je dekantirana i premještena u čistu staklenu epruvetu, heksan je propuhan u struji dušika. Na talog je dodano 1 mL metanolne- $H_2SO_4$  (1%  $H_2SO_4$  u metanolu) i 30 min inkubirano u kupelji pri 60 °C. Nakon inkubacije dodano je 1 mL 0,9% (m/v) vodene otopine NaCl i 1 mL heksana te je uzorak zatim promiješan na vrtložnoj miješalici. Organska faza je prebačena u čistu epicu, heksan je propuhan u struji dušika. Na talog je dodano 100  $\mu$ L heksana. Ovako pripremljen uzorak bio je spreman za analizu plinskom kromatografijom.

### 3.2.12. Plinska kromatografija metilnih estera masnih kiselina

Analiza metilnih estera masnih kiselina provedena je plinskom kromatografijom na aparatu Varian CP-3800, koji je bio dostupan ljubaznošću dipl. ing. Rudolfa Posavca (Teva, Pliva). Uređaj je bio opremljen s autoinjektorom, plameno-ionizacijskim detektorom na kapilarnoj koloni DB-FFAP (Agilent Technologies), duljine 30 m i unutarnjeg promjera kolone 0,32 mm te debljine aktivnog sloja 0,5  $\mu$ m uz sljedeće temperaturne uvjete: početna temperatura kolone 120 °C, zagrijavanje 120 °C do 235 °C; temperatura injektora 220 °C, temperatura detektora 280 °C. Kao plin nosač korišten je dušik uz protok 68,9 kPa. Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je na temelju vremena retencije, usporedbom s poznatim standardima. Kao standard upotrebljavana je komercijalno dostupna smjesa 37 metilnih estera masnih kiselina (Supelco).

Tablica 7. Temperaturni programi i kolone korištene pri analizi metilnih estera masnih kiselina.

Parametri	temperaturni program 1	temperaturni program 2
<b>kolona</b>	Agilent HP-5	Agilent DB-FFAP
<b>temperatura injektora</b>	220 °C	220 °C
<b>početna temperatura</b>	140 °C (5 min)	120 °C (5 min)
<b>porast temperature</b>	4 °C /min (140-180 °C)	4 °C /min (120-180 °C)
	1 °C /min (180-240 °C)	1 °C /min (180-235 °C)
<b>krajnja temperatura</b>	240 °C	235 °C
<b>vrijeme trajanja analize</b>	80 min	75 min

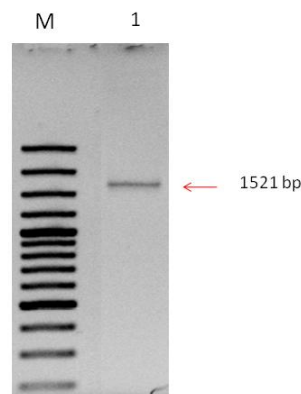
## 4. Rezultati

---

### 4.1. Kloniranje gena *CgKCS* u vektor pGEM-T Easy

#### 4.1.1. Umnažanje i izdvajanje gena *CgKCS* pomoću PCR

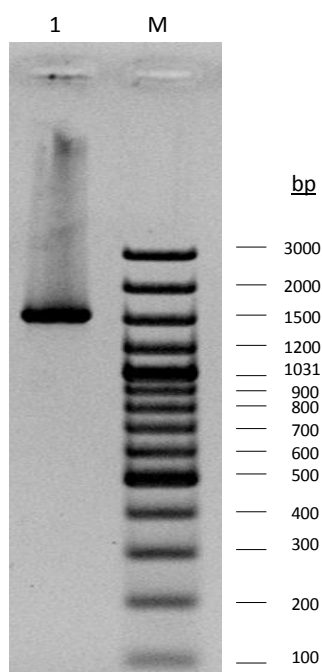
Za umnažanje gena *CgKCS* kao kalup za PCR reakciju služila je genomska DNA izdvojena iz listova vrste *Cardamine graeca* L. Gen *CgKCS* nema introna, a transkripcijski je aktivan samo tijekom sazrijevanja sjemenki te nije bilo potrebno kao kalup za umnažanje koristiti cDNA. Uporabom početnica CEL1 i CEL4 (opisanih u poglavlju 3.1.4.) nakon reakcije PCR u standardnim uvjetima, utvrđena je prisutnost samo jednog PCR produkta veličine 1.5 kb (Slika 10). Veličina produkta odgovarala je očekivanoj veličini cjelovitog gena *CgKCS* od 1521 bp (GenBank: EU871788.1).



Slika 10. Umnažanje gena *CgKCS* reakcijom PCR uporabom genomske DNA iz vrste *Cardamine graeca* L. kao kalupa i para početnica CEL1/CEL4. (1) Produkt reakcije umnažanja razdvojen je na 1.2% agraroznom gelu; (M) Ljestvičavi biljeg DNA (100 bp). Strjelicom je označen fragment veličine od 1521 bp.

#### 4.1.2. Priprema inserta *CgKCS* i ligacija u vektor pGEM-T Easy

PCR-produkt izdvojen je iz agaroznoga gela i pročišćen na NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II koloni (Macherey-Nagel), a rezultat pročišćavanja i izolacije fragmenta provjeren je gel-elektroforezom (Slika 11). Nakon određivanja koncentracije izdvojenog odsječka DNA, provedena je ligacija u vektor pGEM-T Easy (Promega). Paralelno su provedene i pozitivne i negativne kontrole reakcije. Pozitivna kontrola reakcija sadržavala je 4 ng kontrolnog inserta DNA (dio kompleta). Negativna kontrola sadržavala je 50 ng pGEM-T Easy vektora, ali nije sadržavala insert.



Slika 11. Produkt PCR reakcije nakon pročišćavanja na koloni. Na slici su označeni Ljestvičavi biljeg DNA (100 bp) "M", a PCR produkt brojem "1". Naznačene su i veličine fragmenata biljega.

#### 4.1.3. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *E. coli* konstruktom pGEM-T Easy/*CgKCS*

Kompetentne stanice bakterije *E. coli* soja DH5 $\alpha$  transformirane su s 3  $\mu$ L ligacijske smjese metodom elektroporacije (poglavlje 3.2.9.1.), te nacijepljene na krutu selektivnu hranjivu podlogu LB s dodatkom ampicilina, IPTG i X-Gal. Ugradnja inserta DNA provjerena je selekcijom plavo-bijelih kolonija, od kojih su bijele sadržavale ugrađeni insert DNA. Nakon prekonocnog uzgoja na selektivnim pločama pri 37 °C na ploči s transformantima naraslo je 9

plavih i 11 bijelih kolonija. Na ploči s pozitivnom kontrolom naraslo je 11 plavih i 17 bijelih, na ploči s negativnom kontrolom 1 plava kolonija, a bijele nisu porasle.

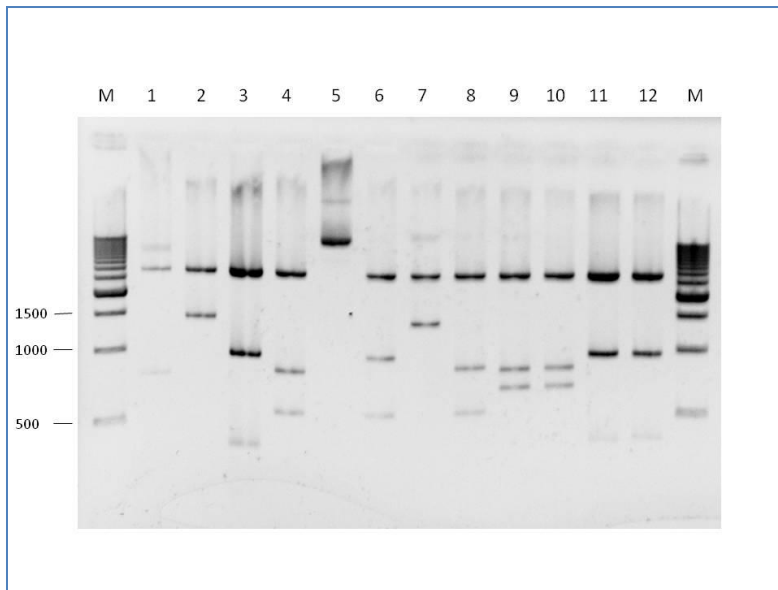
#### 4.1.4. Analiza konstrukata pGEM-T Easy/*CgKCS* restriksijskom digestijom i sekvencioniranjem

Nekoliko bijelih kolonija s ploča s transformantima pojedinačno je nacijepljeno u 5 mL LB tekuće podloge preko noći na 37 °C. Nakon toga provedena je izolacija rekombinantnog plazmida i analiza veličine ugrađenog inserta digestijom plazmida restriksijskim enzimima.

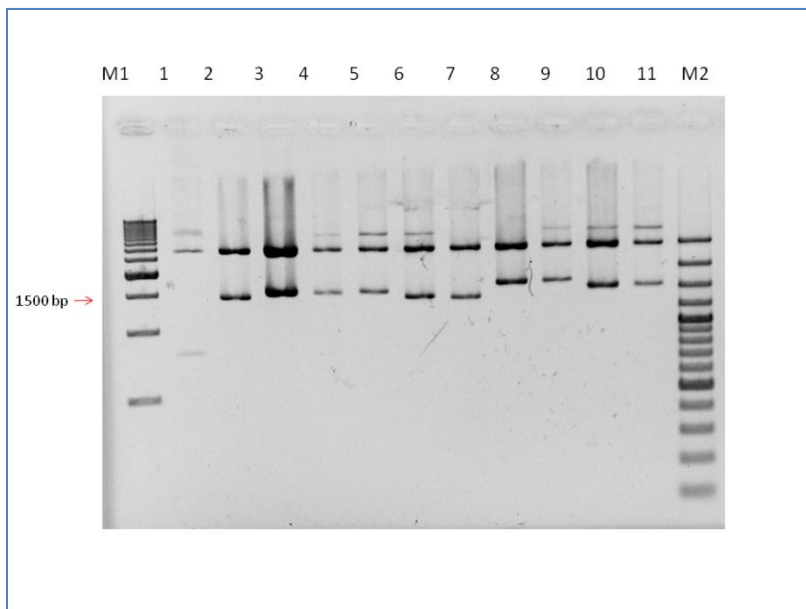
S pomoću restriksijskog enzima *EcoRI* moguće je izrezati insertiranu DNA iz vektora pGEM-T Easy, ali restriksijski enzim *EcoRI* cijepa i unutar gena *CgKCS* što je provjereno s pomoću programa za analizu restriksijskih mjesta ([www.restrictionmapper.org](http://www.restrictionmapper.org)) koristeći sekvencu gena *CgKCS* preuzetu iz banke gena (pristupni broj za GenBank: EU871788.1). Kao rezultat cijepanja gena *CgKCS* mogu nastati tri odsječka veličina 197, 367, i 957 bp (Slika 12). Zbog toga je bilo potrebno provesti i analizu pomoću restriksijskog enzima koji ne cijepa sekvencu gena *CgKCS*, a njegovo restriksijsko mjesto se nalazi u poliklonirajućem mjestu plazmida, kao što je restriksijski enzim *NotI* (Slika 13).

Rezultati digestije pokazali su da je kod nekih plazmida došlo do ugradnje manjeg fragmenta DNA. Rezultati nakon cijepanja s pomoću restriksijskog enzima *EcoRI* pokazali su da bi jedino uzorci označeni na Slici 12. pod brojem 2, 3, 6, 11 i 12 mogli odgovarati slici kakvu dobijemo cijepanjem gena *CgKCS*. Nakon što je konstrukt pGEMT-Easy/*CgKCS* pocijepan restriksijskom endonukleazom *NotI*, odabrani su uzorci pod brojem 2, 3, 6, 11 i 12 i poslani na sekvencioniranje.





Slika 12. Elektroforeza odsječaka DNA u 1,2% agaroznom gelu dobivenih nakon digestije izoliranih plazmida s restrikcijom *EcoRI*. Na slici su označeni 100 bp DNA ladder slovom "M", neporezani plazmid označen je pod brojem 5, a plazmidi pocijepani s restrikcijom *EcoRI* od 1 do 4 i od 6 do 12.



Slika 13. Elektroforeza odsječaka DNA u 1,2% agaroznom gelu dobivenih nakon digestije izoliranih plazmida s restrikcijom *NotI*. Na slici su označeni 100 bp DNA ladder slovom "M2", 500 bp DNA ladder slovom "M1", a plazmidi pocijepani s restrikcijom *NotI* pod brojevima od 1-12.

Za analizu slijeda nukleotida u insertu DNA ugrađenom u plazmidni vektor odabrano je pet uzoraka izoliranih plazmida. Analizom slijeda nukleotida DNA (servis Macrogene, Koreja) potvrđen je identitet i integritet gena *CgKCS* kloniranog u plazmid pGEMT Easy. Rezultati analize prikazani su u Tablici 5, potvrđena je visoka homologija (99%) nukleotidnog slijeda inserirane DNA sa sekvencom za gen *CgKCS*, pohranjenom u banci gena Gen Bank (pristupni broj: EU871788.1). Okvir čitanja nije se promijenio. Nakon svih provedenih analiza, za daljnja istraživanja odabrana su dva bakterijska klona (3, 11) koja su sadržavala plazmid s pravilno ugrađenim genom *CgKCS*.

Tablica 5. Analiza nukleotidnog slijeda konstrukata pGEMT-Easy/*CgKCS* upotrebom početnica T7 ili SP6.

konstrukt	početnica	duljina čitanja (bp)	pristupni broj homologne sekvence*	duljina gena (bp)	homologija (%)
<b>2</b>	<b>T7</b>	899	EF494127.1	1180	82
	<b>SP6</b>	876	AC084241.1 AC084241	14879	85
<b>3</b>	<b>T7</b>	902	EU871788.1	1521	99
	<b>SP6</b>	878	EU871788.1	1521	99
<b>6</b>	<b>T7</b>	950	nd	nd	nd
	<b>SP6</b>	877	AK333117.1	3213	100
<b>11</b>	<b>T7</b>	900	EU871788.1	1521	99
	<b>SP6</b>	879	EU871788.1	1521	99
<b>12</b>	<b>T7</b>	775	nd	nd	nd
	<b>SP6</b>	875	EU871788.1	1521	94

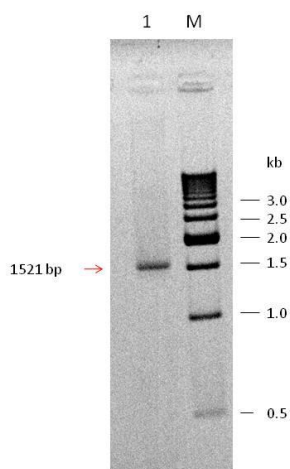
\* prema nomenklaturi GenBank

nd – nije utvrđen

## 4.2. Kloniranje gena *CgKCS* u vektor pYES2

### 4.2.1. Umnažanje gena *CgKCS* i kreiranje restrikcijskih mjesta reakcijom PCR

Pri umnožavanju gena *KCS*, kao kalup korišten je konstrukt pGEM-T Easy/*CgKCS* koji sam prethodno kreirala. U PCR reakciji korištene su početnice CGY2F i CGY2R. Nakon reakcije PCR u standardnim uvjetima, produkt reakcije razdvojen je na 0,8% agaroznom gelu, te je utvrđena prisutnost samo jednog PCR produkta veličine 1.5 kb (Slika 14). Veličina produkta odgovarala je očekivanoj veličini cjelovitoga gena *CgKCS*.



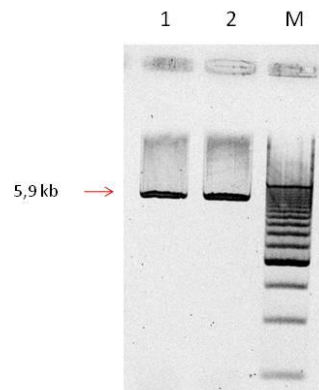
Slika 14. Produkt PCR reakcije. Biljeg DNA Ladder označen je slovom "M", a PCR produkt brojem "1". Veličine fragmenata biljega kreću se od 500 do 10000 pb, a posebno su označeni fragmenti veličina od 500 do 3000 pb.

### 4.2.2. Cijepanje vektora i PCR produkta restrikcijskim endonukleazama

PCR produkt dobiven pomoću reakcije PCR, u kojoj su korištene početnice CGY2F i CGY2R, a kao kalup konstrukt pGEM-T Easy/*CgKCS*, pročišćen je na NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II koloni (Macheray-Nagel) te pocijepan restrikcijskim enzimima *Hind*III i *Xho*I. Uspješnost razgradnje PCR produkta nije bilo moguće provjeriti elektroforezom zbog premale razlike u parovima baza između nerazgrađenog i razgrađenog fragmenta, te je produkt razgradnje izravno pročišćen na koloni za pročišćavanje PCR produkata (NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II koloni, Macheray-Nagel).

Za razgradnju binarnog vektora pYES2 upotrijebljeni su isti restrikcijski enzimi kao i za obradu PCR-produkta, restrikcijske endonukleaze *Hind*III i *Xho*I. Nakon reakcije razgradnje u

trajanju od tri sata pri 37 °C, uspješnost cijepanja plazmida provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 15). Nakon provjere uspješnosti razgradnje pripremljen je preparativni agarozni gel iz kojega je izoliran željeni linearizirani vektor metodom opisanom u poglavlju 3.2.3.1. i pročišćen je na NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II koloni prema prethodno opisanoj metodi (3.2.3.3.).



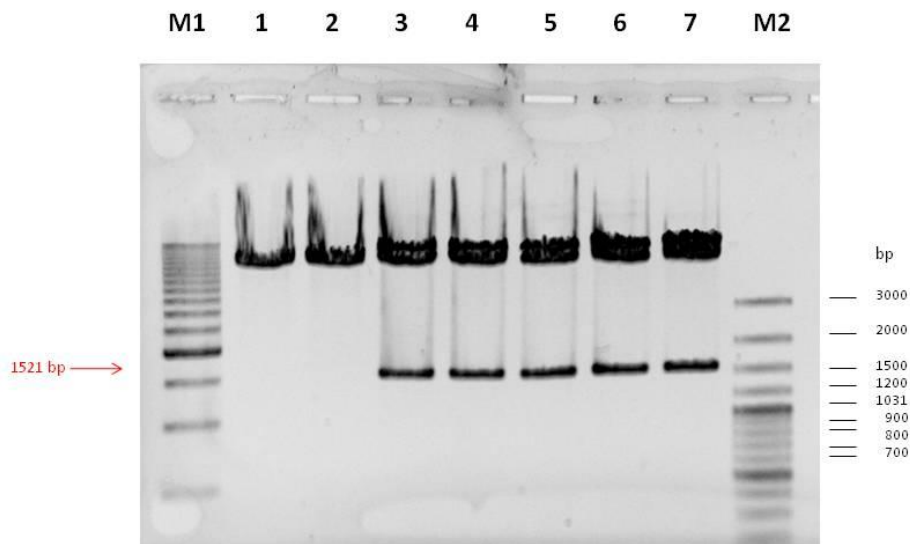
Slika 15. Razgradnja vektora pYES2 restrikcijским endonukleazama *Hind*III i *Xho*I. Uzorak 1 i 2 - vektor pYES2 nakon razgradnje restrikcijским endonukleazama; M - ljestvičavi DNA-biljeg (500 bp).

#### 4.2.3. Ligacija i transformacija stanica bakterije *E. coli* konstruktom pYES2/*CgKCS*

Ligacijska smjesa ukupnog volumena od 20  $\mu$ L sadržavala je 72 ng lineariziranog vektora, 70 ng fragmenta DNA i T4 DNA ligazu (0,1 jedinice/ $\mu$ L ligacijske smjese) s pripadajućim puferom. Nakon prekonoćne reakcije ligacije pri 4 °C, kompetentne stanice bakterije *E. coli* soja DH5 $\alpha$  transformirane su sa 3  $\mu$ L ligacijske smjese metodom elektroporacije, te naciepljene na krutu selektivnu hranjivu podlogu LB s dodatkom ampicilina. Nakon prekonoćnog uzgoja na selektivnim pločama s ampicilinom pri 37 °C naraslo je 20 transformanata (pYES2/*CgKCS*).

#### 4.2.4. Analiza transformanata stanica kvasca koje sadrže konstrukt pYES2/*CgKCS*

Iz nekoliko bakterijskih kolonija naraslih na selektivnoj podlozi s ampicilinom izolirani su plazmidi. Da bismo provjerili koji od izoliranih plazmida sadržavaju željeni gen za KCS, plazmid je pocijepan s restriksijskim endonukleazama *Hind*III i *Xho*I, a za provjeru veličina nastalih fragmenata korišten je linearizirani vektor pYES2. Rezultati elektroforeze odsječaka DNA u 0,7% agaroznom gelu dobivenih nakon digestije izoliranih plazmida s restriksijskim enzimima *Hind*III i *Xho*I prikazani su na Slici 16. Uzorci prikazani na slici pod brojevima od 3–7 sadržavaju insert koji odgovara veličini gena *CgKCS*.



Slika 16. Restriksijska analiza plazmida pYES2/*CgKCS* izoliranih iz transformanata kvasca. Uzorci 1–7 su plazmidi razgrađeni restriksijskim endonukleazama *Hind*III i *Xho*I. M1 - Biljeg 500 bp DNA biljeg; M2 - biljeg 100 bp DNA biljeg. Strjelice označavaju očekivane veličine fragmenata.

#### 4.2.5. Analiza slijeda nukleotida konstrukta pYES2/*CgKCS*

Orijentacija i okvir čitanja za gen *CgKCS*, insertiran u pYES2 provjereni su analizom nukleotidnog slijeda u servisu Macrogen (Južna Koreja). Nukleotidni slijed DNA analiziran je na osobnom računaru koristeći program BioEdit (Biological sequence alignment editor for Windows 95/98/NT/2000/XP; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Rezultat analize prikazan je u Tablici 6. S pomoću programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, MD, USA; <http://ncbi.nlm.nih.gov>) potvrđena je visoka homologija (99%) nukleotidnog slijeda insertirane DNA sa sekvencom za gen *CgKCS* pohranjenom u banci gena Gen Bank (pristupni broj: EU871788.1). Od 4 analiziranih konstrukata, odabrana su 2. Okvir čitanja nije se promijenio.

Tablica 6. Analiza nukleotidnog slijeda konstrukata pYES2/*CgKCS* upotrebom početnica T7 ili CYC1.

konstrukt	početnica	duljina čitanja (bp)	pristupni broj homologne sekvence*	duljina gena (bp)	homologija (%)
<b>YS1</b>	T7	950	EU871788.1	1521	98
	CYC1	950	EU871788.1	1521	99
<b>YM2</b>	T7	950	EU871788.1	1521	99
	CYC1	950	EU871788.1	1521	99

\* prema nomenklaturi GenBank

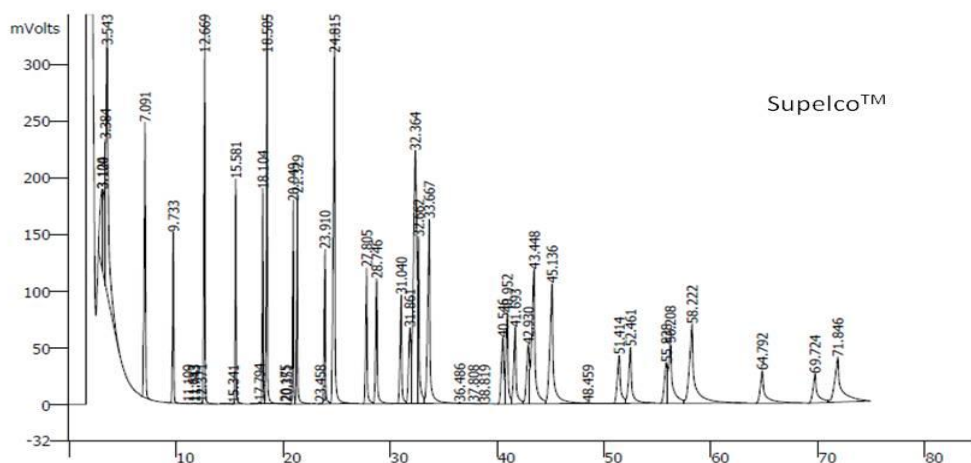
#### 4.2.6. Transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* konstruktom pYES2/CgKCS

Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj BY4741 transformirane su s 1-2 µg plazmida pYES2/CgKCS ili pYES2 koji ne sadržava insert CgKCS. Stanice su zatim nacijepljene na krutu selektivnu podlogu bez uracila (SD-Ura) za selektivan uzgoj stanica kvasca transformiranih plazmidom pYES2 ili pYES2/CgKCS. Nakon dva dana uzgoja pri 28 °C naraslo je 8 kolonija transformiranih konstruktom pYES2/CgKCS, tj. tri kolonije transformiranih plazmidom pYES2.

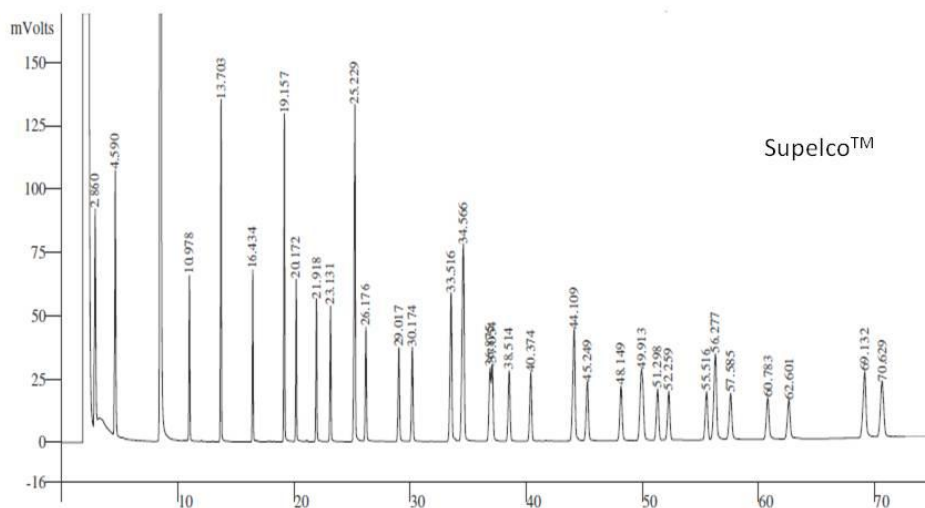
#### 4.2.7. Heterologna ekspresija gena CgKCS gena u kvascu

Ekspresija gena CgKCS u stanicama kvasca inducirana je premještanjem transformiranih stanica kvasca iz uzgoja u tekućoj podlozi s glukozom u tekuću podlogu s galaktozom. Stanice su uzgojene do stacionarne faze, a talog stanica je saponificiran i provedena je transesterifikacija (metanoliza), postupak pri kojem masne kiseline prelaze u oblik metilnih estera.

Analizom estera masnih kiselina razdvojenih plinskom kromatografijom dokazan je promijenjeni profil masnih kiselina u kvasca transformiranih konstruktom pYES2/CgKCS u odnosu na kromatogram kvasca koji je sadržavao samo pYES2 (Slika 19). Također je i optimizirano razdvajanje standardnog uzorka – smjese sa 37 komponenata (Supelco™ Component FAME mix, Sigma) (Slika 17 i 18).

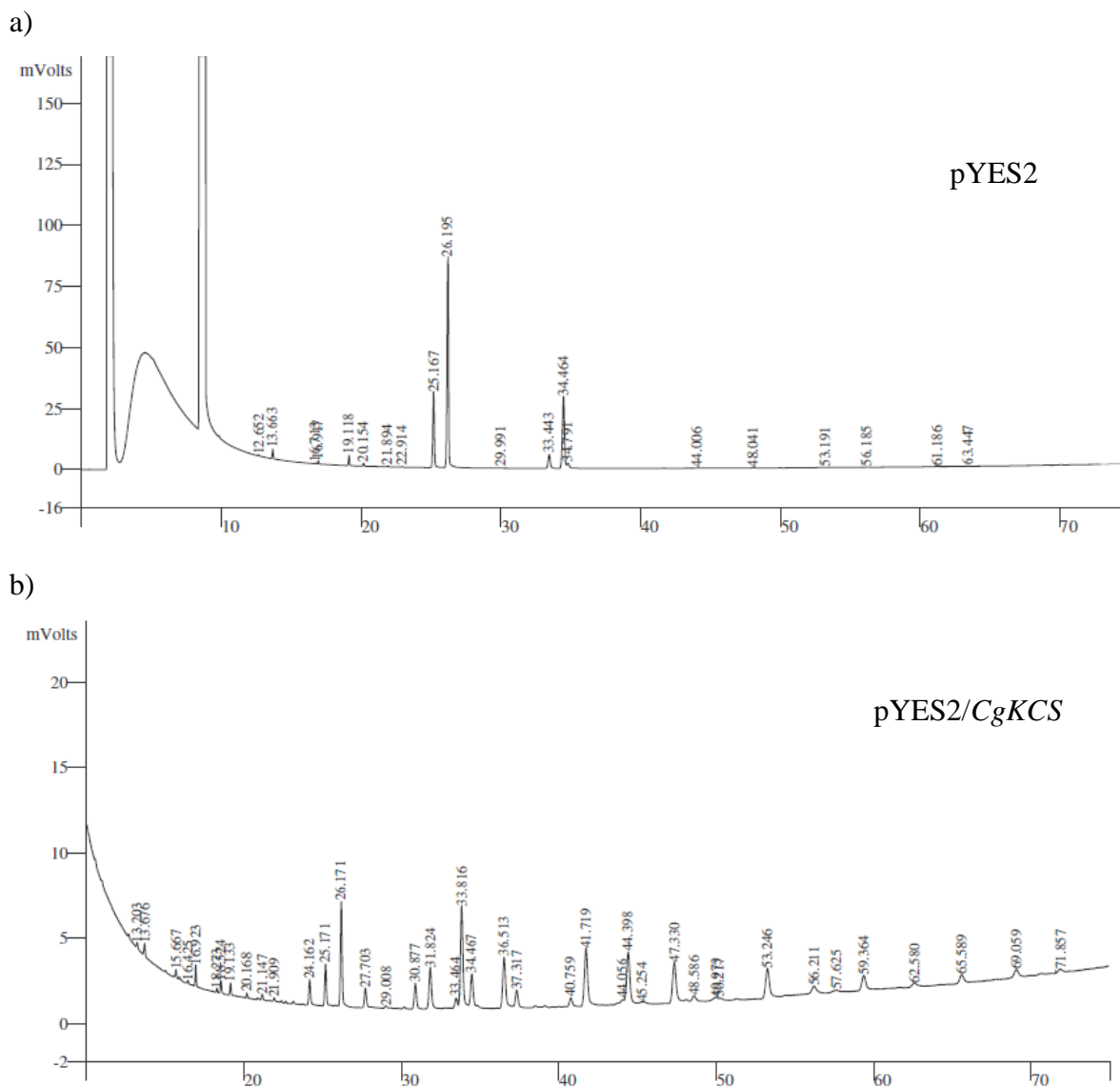


Slika 17. Kromatogram standarda od 37 esterificiranih masnih kiselina (Supelco™ Component FAME mix, Sigma) razdvojen na koloni HP-5 (Agilent) pri temperaturi od 140-240 °C i vremenu trajanja analize od 80 min.



Slika 18. Kromatogram standarda od 37 esterificiranih masnih kiselina (Supelco™ Component FAME mix, Sigma) razdvojen na koloni DB-FFAP (Agilent) pri temperaturi od 120-240 °C i vremenu trajanja analize od 75 min.





Slika 19. Usporedba profila metilnih estera masnih kiselina frakcije ukupnih lipida izoliranih iz transformanata kvasca *S. cerevisiae*: a) kvasac transformiran plazmidom pYES2 koji ne sadrži gen *CgKCS* (kontrola); b) kvasac transformiran konstruktom pYES2/*CgKCS*. Uzorci su razdvojen na koloni DB-FFAP (Agilent) pri uvjetima kao na Slici 18.

Tablica 7. Usporedba udjela pojedinih masnih kiselina u uzorcima iz kvasca transformiranog plazmidom pYES, sa ili bez gena *CgKCS*.

Naziv masne kiseline	pYES2 (kontrolni uzorak)		pYES2/ <i>CgKCS</i>	
	RT	udio ( % )	RT	udio ( % )
<b>laurinska (12:0)</b>	13,663	1,47	13,676	0,75
<b>tridekanska (13:0)</b>	16,713	0,10	16,425	0,18
<b>miristoleinska (14:1)</b>	19,118	1,56	19,133	0,65
<b>miristinska (14:0)</b>	20,154	0,46	20,168	0,26
<b>pentadekanska (15:0)</b>	21,894	0,15	21,909	0,21
<b><i>cis</i>-10- pentadekanska (15:1)</b>	22,914	0,10		—
<b>palmitinska (16:0)</b>	25,167	16,72	25,171	3,16
<b>palmitoleinska (16:1)</b>	26,195	49,35	26,171	8,66
<b>heptadekanska (17:0)</b>		—	29,008	0,27
<b><i>cis</i>-10- heptadekanska (17:1)</b>	29,991	0,09		—
<b>stearinska (18:0)</b>	33,443	4,34	33,464	1,07
<b>oleinska (18:1)</b>	34,464	23,58	34,467	4,71
<b>linoleaidinska (18:2,<i>n6t</i>)</b>		—	36,513	7,07
<b>linolna (18:2<i>n6c</i>)</b>		—	37,313	2,29
<b>arahinska (20:0)</b>	44,006	0,09	44,056	0,89
<b>behenska (22:0)</b>		—	49,973	0,74
<b>lignocerinska (24:0)</b>	56,185	0,08	56,211	1,72
<b>nervonska (24:1)</b>		—	69,059	1,52

RT - vrijeme pojavljivanja (*engl.* retention time)

udio(%) - udjel pojedinih masnih kiselina

## 5. Rasprava

---

Postoji samo nekoliko biljnih vrsta, većinom iz porodice *Brassicaceae*, koje u sjemenkama sadžavaju ulje sa znatnim udjelom nervonske kiseline (Appelqvist, 1976). Te vrste (grčka režuha (*Cardamine graeca* L.), mjesečnica (*Lunaria annua* L.), crveni javor, konoplja i druge) nisu najbolji izvor za proizvodnju ulja zbog slabog i neredovitog prinosa sjemena. Zamjenski izvor mogle bi biti neke ekonomski prihvatljive uljarice čije bi ulje bilo obogaćeno nervonskom kiselinom putem ekspresije rekombinantne elongaze masnih kiselina (KCS, FAE). Prema Sargentu i sur. (1994), potencijalna tržišta potiču stvaranje novih rafiniranih ulja obogaćenih nervonskom kiselinom za potrebe istraživanja učinka takvih ulja na zdravlje čovjeka i životinja. Uvođenjem gena *KCS* iz vrste *Lunaria annua* u uljarice iz roda *Brassica*, povećana je količina nervonske kiseline u sjemenskom ulju (Guo i sur., 2009). Nedavno izoliran gen za *KCS* iz grčke režuhe u transgeničnim biljkama vrste *Brassica carinata* pokazao se još aktivnijim u odnosu na gen *KCS* iz vrste *L. annua* (Taylor i sur., 2009). Interes i potreba za proizvodnjom nervonske kiseline raste otkako je nervonska kiselina predložena kao bioaktivni lipidni dodatak prehrani koji poboljšava razvitak i funkciju neurološkog sustava (Sargent i sur., 1994).

Krajnji cilj istraživanja koji prelazi okvire ovog rada je uvođenje gena *KCS* iz grčke režuhe u bundevu golicu (*Cucurbita pepo* L. var *Styriaca*). Sjemenke i ulje bundeve golice tradicionalno se proizvode u regiji središnje Europe, a karakteristika sjemenki je da nemaju lupinu što u mnogome olakšava proces proizvodnje ulja. Sjeme bundeve predstavlja izuzetno bogat i cijenjen izvor hranjivih ulja, fitosterola, proteina, cinka i vitamina E, ali ne sadrži nervonsku kiselinu. Udio nezasićenih masnih kiselina u ulju bundeve iznosi čak 82% (Fruhirth i Hermetter, 2007), od čega 33% otpada na oleinsku kiselinu, direktan prekursor nervonske kiseline. Nakon postupka obrade sjemenki genetski modificirane bundeve, u rafiniranom ulju i pripravcima koji sadrže izdvojenu nervosku kiselinu, nema transgena. Bundeva golica obogaćena nervonskom kiselinom mogla bi predstavljati dobar izvor funkcionalne hrane koja pogoduje zdravlju mozga i živčanog sustava ljudi i životinja.

Kao važan korak prije transformacije biljnih stanica, nužno je provjeriti funkcionalnost izoliranog gena *KCS* iz grčke režuhe. Cilj ovoga rada bio je prirediti plazmidne konstrukte koji sadrže gen *CgKCS*, transformirati stanice kvasca *S. cerevisiae*, te analizirati aktivnost transgena *CgKCS* u stanicama kvasca.

U prethodnim istraživanjima Laboratorija za kemijsku biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, izolirana je ukupna genomska DNA iz listova grčke režuhe (*Cardamine graeca* L.), sakupljene na lokalitetu Kozjak (Split, Hrvatska). Za kloniranje gena *CgKCS* upotrijebljena je genomska DNA zato što unutar kodirajuće regije gena *CgKCS* nema introna, a gen se eksprimira smo u sjemenkama tijekom njihovog sazrijevanja što smanjuje mogućnost izolacije ukupne mRNA.

Metodama opisanim u 4. poglavlju (Rezultati), dobiven je plazmid pYES2 s pravilno kloniranim genom *CgKCS*. Tim plazmidom transformirani su sojevi kvasca *S. cerevisiae* soja BY4741, te je u njima provedena ekspresija gena *KCS*. Funkcija gena *KCS* provjerena je ekspresijom gena u kvascu *S. cerevisiae*.

Uspješnost biosinteze enzima 3-ketoacil-CoA sintaze u *S. cerevisiae*, soj BY4741, provjerena je razdavanjem masnih kiselina tehnikom plinske kromatografije. Naime, enzim 3-ketoacil-CoA sintaza ima ulogu u elongaciji masnih kiselina te, ako dođe do ekspresije gena unutar stanica kvasca, sintetiziraju se dugolančane nezasićene masne kiseline koje prirodno nisu prisutne u stanicama kvasca.

Posebnu pozornost trebalo je posvetiti optimizaciji kromatografskog razdvajanja metilnih estara masnih kiselina, odnosno definiranju optimalnoga temperaturnog programa, kako bi se dobili potpuno razdvojeni pikovi. Prvo je korištena kolona HP-5 (Agilent Technologies), uvjeti pri kojima je provedena plinska kromatografija navedeni su u Tablici 7 pod temperaturni program 1 (poglavlje 3.2.12.). Bolje razdvajanje postignuto je povećanjem temperaturnog razmaka i produživanjem vremena analize. U radu Katavić i sur. (2001) razdvajanje je postignuto na uređaju Hewlett-Packard model 5890 korištenjem kapilarne kolone DB-23 (Agilent Technologies), duljine 30 m i unutarnjeg promjera kolone 0,25 mm te debljine aktivnog sloja 0,25  $\mu\text{m}$  uz sljedeće temperaturne uvjete: početna temperatura kolone 180 °C, zagrijavanje 180 °C do 250 °C; temperatura injektora 250 °C, temperatura detektora 250 °C.

Optimizacija temperaturnog programa je izvedena korištenjem standardnih smjesa metilestara masnih kiselina (Supelco<sup>TM</sup> 37 Component FAME mix, Sigma). Promjenom kolone HP-5 s kolonom DB-FFAP (Agilent) i promijenom uvjeta početne i krajnje temperature i vremena analize u temperaturnom programu 2, postignuto je bolje razdvajanje pikova i pravilniji izgled pikova. Smanjivanjem početne temperature razdvajanja (sa 140 na 120 °C), postignuto je bolje razlučivanje pikova na početku elucije. Smanjivanjem temperaturnog gradijenta postignuto je usporavanje protoka i bolje razdvajanje dugolančanih masnih kiselina (s 20 C atoma i više). Stoga su uvjeti korišteni u temperaturnom programu 2: početna temperatura

kolone 120 °C, zagrijavanje 120 °C do 235 °C; temperatura injektora 220 °C, temperatura detektora 280 °C, odabrani za daljnje analize sadržaja masnih kiselina u kvascima.

Analizom profila masnih kiselina u kvascima, utvrđena je razlika u profilu uzoraka iz kvasca transformiranog plazmidom pYES i kvasca koji sadrži plazmidni konstrukt pYES/*CgKCS*. U odnosu na kvasac bez gena *CgKCS*, u kvascu koji eksprimira gen *CgKCS* uočeni su značajno smanjeni pikovi za masne kiseline s 16 i 18 C atoma (16:0, 16:1, 18:0, 18:1), a povećan broj pikova za dugolančane masne kiseline (20 C atoma i više). Ovi rezultati su u skladu s rezultatima koje su dobili Taylor i sur. (2009) koji su, nakon ekspresije plazmidnog konstrukta YES2.1/V5-His-TOPO/ *CgKCS*, dobili povećanu biosintezu masnih kiselina s 20:1, 22:1, 24:1 C atoma u transgeničnom kvascu.

Nakon što je dokazana funkcionalnost izoliranog gena *CgKCS*, bilo je moguće pristupiti transformaciji stanica bundeve. Usporedno s pripremom plazmidnog konstrukata za transformaciju kvasaca, napravljeni su i plazmidni konstrukti za transformaciju biljnih stanica, iako ti rezultati nisu navedeni u ovoj radnji.

## 6. Zaključci

---

1. Gen *CgKCS* izoliran metodom PCR iz ukupne genomske DNA vrste *Cardamine graeca* L. sakupljene na lokalitetu Kozjak (Split, Hrvatska) ima visok stupanj homologije (99%) sa sekvencom gena za enzim KCS, upisanog u bazu podataka GenBank pod brojem EU871788.1.
2. Uspješno je provedeno kloniranje gena *CgKCS* i priprema novih plazmidnih konstrukata za ekspresiju gena u kvascu.
3. Određeni su optimalni uvjeti za razdvajanje masnih kiselina tehnikom plinske kromatografije. Ustanovljeno je da se dobro razdvajanje masnih kiselina iz smjese od 37 standardnih komponenata, dobiva pri uvjetima: početna temperatura kolone 120 °C, zagrijavanje 120 °C do 235 °C; temperatura injektora 220 °C, temperatura detektora 280 °C.
4. Analizom masnih kiselina dokazana je razlika u sastavu masnih kiselina u kvascima transformiranim plazmidom sa ili bez transgena *CgKCS*. Kvasac transformiran konstruktom pYES2/*CgKCS* ima manji udio masnih kiselina s 16 i 18 C atoma, a veći udio masnih kiselina s 24 C atoma. U kvascu transformiranim tim konstruktom pojavljuju se masne kiseline (linoleaidinska, linolna i nervonska), koje nisu prisutne u kvascu transformiranom plazmidom pYES2 bez gena *CgKCS*.
5. Nakon potvrde funkcionalnosti enzima kojeg kodira transgen *CgKCS* u stanicama kvasca, moguće je pristupiti transformaciji biljnih stanica.

## 7. Zahvale

---

*Prije svega, želim zahvaliti dr. sc. Snježani Mihaljević na iskazanom povjerenju, uloženom trudu, brojnim stručnim savjetima, diskusijama i pomoći koje mi je pružala tijekom izrade i pisanja ovog rada. Velika hvala i na tome što mi je pružila priliku sudjelovanja pri istraživačkom radu.*

*Hvala prof. dr. sc. Jasni Vorkapić-Furač na vrijednim diskusijama, savjetima, strpljenju i dobroj volji.*

*Veliko hvala kolegi, dipl. ing. Rudolfu Posavcu na stručnoj pomoći i trudu prilikom analize uzoraka pomoću plinskog kromatografa.*

*Hvala dr. sc. Branki Salopek Sondi, dipl. ing. Ani Brcko na ugodnoj radnoj atmosferi, ali i neizmjerne prijateljskoj potpori.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, svim dragim ljudima i prijateljima koji su uvijek tu uz mene.*

## 8. Literatura

---

- Ambriović-Ristov, A., Brozović, A., Bruvo-Madžarić, B., Četković, H., Herak-Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić-Hećimović, S., Meštrović-Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007) *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
- Appelqvist, L. A. (1976) Lipids in Cruciferae. U: *The Biology and the Chemistry of the Cruciferae* (Vaughan, J.G., Macleod, A. J., ured.), Academic Press, London, UK, str. 221-277.
- Ashes, J. R., Gelatin, S. K., Cook, S. K., Scott, T. W. (1979) Assessing the biological effectiveness of protected lipid supplements for ruminants. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **56**, 552-557.
- Assies, J., Lieverse, R., Vreken, P., Wanders, R. J., Dingemans, P. M., Linszen, D. H. (2001) Significantly reduced docosahexaenoic and docosapentaenoic acid concentrations in erythrocyte membranes from schizophrenic patients compared with a carefully matched control group. *Biol. Psychiatry.* **49**, 510-522.
- Barker, G. C., Larson, T. R., Graham, I. A., Lynn, J. R., King, G. J. (2007) Novel Insights into Seed Fatty Acid Synthesis and Modification Pathways from Genetic Diversity and Quantitative Trait Loci Analysis of the *Brassica C* Genome. *Plant Physiology.* **144**, 1827-1842.
- Bhattacharya, A., Sun, D., Rahman, M., Fernandes, G. (2007) Different ratios of eicosapentaenoic and docosahexaenoic omega-3 fatty acids in commercial fish oils differentially alter pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages from C57BL/6 female mice. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 23-30.
- Blacklock, B.J., Jaworski, J. G. (2002) Studies into factors contributing to substrate specificity of membrane-bound 3-ketoacyl-CoA synthases. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4789-4798.
- Brondz, I. (2002) Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta.* **465**, 1-37.



- Burdge, G. C., Finnegan, Y. E., Minihane, A. M., Williams, C. M., Wooton, S. A. (2003) Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [<sup>13</sup>C]  $\alpha$ -linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards  $\beta$ -oxidation in older man. *British Journal of Nutrition*. **90**, 311-321.
- Cahoon, E. B., Hall, S. E., Ripp, K. G., Ganzke, T. S., Hit, W. D., Coughlan, S. J. (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology*. **21**, 1082-1087.
- Carvalho, A. P., Malcata, F. X. (2005) Preparation of fatty acid methyl esters for gaschromatographic analysis of marine lipids: insight studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**, 5049-5059.
- Dommels, Y. E. M., Alink, G. M., van Bladern, P. J., van Ommen, B. (2002) Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **12**, 233-244.
- Erkkilä, A., de Mello, V. D. F., Risérus, U., Laaksonen, D. E. (2008) Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Progress in Lipid Research*. **47**, 172-187.
- Fruhirth, G. O., Hermetter, A. H. (2007) Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**, 1128-1140.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A., Schiestl, R. H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425.
- Givens, D. I., Gibbs, R. A. (2006) Very long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the food chain in the UK and the potential of animal-derived foods to increase intake. *Nutrition Bulletin*. **31**, 104-110.
- Givens, D. I., Kliem, K. E., Gibbs, R. A. (2006) The role of meat as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids in the human diet. *Meat Science*. **74**, 209-218.

- Guo, Y., Mietkiewska, E., Francis, T., Katavic, V., Brost, J. M., Giblin, E. M., Barton, D. L. and Taylor, D. C. (2008) Increase of nervonic acid content in transformed yeast and transgenic plants by introduction of a *Lunaria annua* L. 3-Ketoacyl-CoA Synthase (KCS) gene. *Plant Mol. Biol.* **69**, 565-575.
- Holman, R. T. (1964) Nutritional and metabolic interrelationships between fatty acids. *Federation Proceedings.* **23**, 1062-1067.
- James, D. W., Lim, E., Keller, J., Plooy, I., Ralston, E., Dooner, H. K. (1995) Directed tagging of the *Arabidopsis Fatty Acid Elongation1 (FAE1)* gene with the maize transposon activator. *Plant Cell.* **7**, 309-319.
- Jart, A. (1978) The fatty Acid Composition of various Cruciferous Seeds. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **55**, 873-875.
- Jaworski, J., Cahoon, E. B. (2003) Industrial oils from transgenic plants. *Current Opinion in Plant Biology.* **6**, 178-184.
- Johnson, A. R., Davenport, J. B. (1971) *Biochemistry and methodology of lipids*, Wiley Interscience, New York.
- Judd, J. T., Clevidence, B. A., Muesing, R. A., Wittes, J., Sunkin, M. E., Podczasy, J. J. (1994) Dietary trans-fatty-acids-effects on plasma-lipids and lipoproteins of healthy-men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 861-868.
- Katavic, V., Friesen, W., Barton, D. L., Gossen, K. K., Giblin, E. M., Luciw, T., An J., Zou, J., MacKenzie, S. L., Keller, W. A., Males, D., Taylor, D. C. (2001) Improving Erucic Acid Content in Rapeseed through Biotechnology: What Can the *Arabidopsis FAE1* and the Yeast *SLC1-1* Genes Contribute? *Crop Sci.* **41**, 739-747.

- Kratz, M., Cullen, P., Wahrburg, U. (2002) The impact of dietary mono- and poly-unsaturated fatty acids on risk factors for atherosclerosis in humans. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**, 300-311.
- Kunst, L., Taylor, D. C., Underhill, E. W. (1992) Fatty acid elongation in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* **30**, 425-434.
- Lassner, M. W., Lardizabal, K., Metz, J. G. (1996) A jojoba  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. *Plant Cell.* **8**, 281-292.
- Martinez, M., Mougan, I. (1998) Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development. *J Neurochem.* **71**, 2528-2533.
- Mietkiewska, E., Giblin, E. M., Wang, S., Barton, D. L., Dirpaul, J., Brost, J. M., Katavic, V. and Taylor, D. C. (2004) Seed-specific heterologous expression of a nasturtium FAE gene in *Arabidopsis* results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid. *Plant Physiol.* **136**, 2665-2675.
- Millar, A. A., Kunst, L. (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J.* **12**, 101-111.
- Moon, H., Smith, M. A., Kunst, L. (2001) A condensing enzyme from the seeds of *Lequerella fendleri* that specifically elongates hydroxyl fatty acids. *Plant Physiol.* **127**, 1635-1643.
- NCBI (2011, 20. veljače) Entrez. NCBI-National Center for Biotechnology Information, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Pristupljeno 20. veljače 2011.
- Pereira, S. L., Leonard, A. E., Mukerji, P. (2002) Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* **68**, 97-106.
- Poulos, A. (1995) Very long chain fatty acids in higher animals-a review. *Lipids.* **30**, 1-14.

- Poulos, A., Singh, H., Paton, B., Sharp, P. and Derwas, N. (1986) Accumulation and defective  $\beta$ -oxidation of very long chain fatty acids in Zellweger's syndrome, adrenoleukodystrophy and Refsum's disease variant. *Clin. Genet.* **29**, 397-408.
- Ravnskov, U. (1998) The questionable role of saturated and polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease. *J. Clin. Epid.* **51**, 443-460.
- Salas, J. J., Martinez-Force, E., Garces, R. (2005) Very long chain fatty acid synthesis in sunflower kernels. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2710-2716.
- Sardesai, V. M. (1992a) Nutritional role of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **3**, 154-166.
- Sardesai, V. M. (1992b) Biochemical and nutritional aspects of eicosanoids. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **3**, 562-479.
- Sargent, J. R., Coupland, K. and Wilson, R. (1994) Nervonic Acid and Demyelinating Disease. *Medical Hypotheses.* **42**, 237-242.
- Simopoulos, A. P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition.* **54**, 438-463.
- Simopoulos, A. P. (1999) Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition.* **70**, 560-569.
- Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L., (2002) *Biochemistry*, 5. izd., W.H. Freeman and Co., New York.
- Taylor, D. C., Francis, T., Guo, Y., Brost, J. M., Katavić, V., Mietkiewska, E., Giblin, E. M., Lozinsky, S., Hoffman, T. (2009) Molecular cloning and characterization of a KCS gene from *Cardamine graeca* and its heterologous expression in *Brassica oilseeds* to engineer high nervonic acid oils for potential medical and industrial use. *Plant Biotechnology Journal.* **7**, 925-938.

Thelen, J. J., Ohlrogge, J. B. (2002) Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metabolic Engineering*. **4**, 12-21.

Tucker, G. (2003) Nutritional enhancement of plants. *Current Opinion in Biotechnology*. **14**, 221-225.

Wan, J. M. F., Haw, M. P., Blackburn, G. L. (1988) Nutrition, immune function, and inflammation:anoverview. *Proceedings of the Nutrition Society*. **48**, 315-335.

## Sažetak

---

Marijana Vrdoljak

Kloniranje i ekspresija gena *CgKCS* za elongazu nezasićenih masnih kiselina  
iz grčke režuhe (*Cardamine graeca* L.)

Nervonska kiselina je dugolančana mononezasićena masna kiselina prisutna u sfingolipidnoj frakciji bijele tvari mozga i u mijelinskom sloju perifernih živčanih vlakana sisavaca. S izuzetkom nervonil-sfingolipida iz skeletnih mišića riba, u namirnicama životinjskog porjekla nema nervonske kiseline. Prirodan izvor te kiseline su rijetke biljne vrste. Interes i potreba za proizvodnjom nervonske kiseline raste otkako je nervonska kiselina predložena kao bioaktivni lipidni dodatak prehrani koji poboljšava razvitak i funkciju neurološkog sustava. Zbog mnogobrojnih pozitivnih učinaka na opću kliničku sliku osoba s multiplom sklerozom, osoba oboljelih od adrenoleukodistrofije, kao i prerano rođene djece koja se ne hrane majčinim mlijekom, nervonska kiselina kao potencijalni bioaktivni lipidni dodatak prehrani predstavlja jedan od najperspektivnijih nutriceutika.

Cilj ovoga rada bio je klonirati gen *CgKCS* koji kodira enzim elongazu dugolančanih masnih kiselina iz grčke režuhe (*Cardamina graeca* L.). Funkcionalnost genskog konstrukta za elongazu masnih kiselina provjerena je induciranom ekspresijom u transformiranim stanicama kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), a metodom plinske kromatografije dokazane su razlike u profilu masnih kiselina i prisustvo nervonske kiseline u transformiranom soju u odnosu na divlji soja kvasca. Cilj daljnjih istraživanja je, primjenom dobivenih konstrukata, postići gensku transformaciju bundeve, te na taj način obogatiti ulje bundeve nervonskom kiselinom.

Ključne riječi: *Cardamine graeca* L., ekspresija, gen *KCS*, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, nervonska kiselina

## Summary

---

Marijana Vrdoljak

Cloning and expression of the gene *CgKCS* for fatty acid elongase from *Cardamine graeca* L.

Nervonic acid is a very long-chain monounsaturated fatty acid widely distributed in the sphingolipid fractions of the white matter of brain and an integral part of myelinated nerve fibers of vertebrates. With the exception of nervonyl sphingolipids in skeletal muscle from fish, there is no nervonic acid in foods of animal origin. Natural source of nervonic acids are seeds of only a few known plants. There is an increasing interest in production and availability of nervonic acid for pharmaceutical and nutraceutical applications since it has been proposed as a bioactive lipid supplement which could support the normal synthesis and function of myelin in brain and nerve tissues. Because of the many positive effects on overall clinical picture of people with multiple sclerosis, patients suffering from adrenoleukodystrophy, and prematurely born formula-fed infants, nervonic acid is a strong candidate to be further evaluated as a nutraceutical for the promotion of human and animal health. The aim of this study was to clone the gene that encodes enzyme for fatty acid elongase from the *Cardamine graeca* L. Functional analysis of the gene construct for fatty acids elongase was confirmed by its expression in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The GC analyses of fatty acid profiles in yeast cells upon *KCS* expression revealed the presence of saturated and monounsaturated very long-chain fatty acids that are not normally present in yeast, with a distinct peak corresponding to nervonic acid. The aim of further research is to achieve genetic transformation of a pumpkin by using the constructs obtained in this work, and to engineer nervonic acid-rich oil in the seed of pumpkin.

Key words: *Cardamine graeca* L., expression, gene *KCS*, nervonic acid, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

## PRILOZI

### PRILOG BR. 1

Supelco 37 Component FAME Mix, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA, 10 mg/cm<sup>3</sup> total, u metilenkloridu, Cat. No. 47885-U:

1. Butyric Acid Methyl Ester (C4:0) 4 %
2. Caproic Acid Methyl Ester (C6:0) 4 %
3. Caprylic Acid Methyl Ester (C8:0) 4 %
4. Capric Acid Methyl Ester (C10:0) 4 %
5. Undecanoic Acid Methyl Ester (C11:0) 2 %
6. Lauric Acid Methyl Ester (C12:0) 4 %
7. Tridecanoic Acid Methyl Ester (C13:0) 2 %
8. Myristic Acid Methyl Ester (C14:0) 4 %
9. Myristoleic Acid Methyl Ester (C14:1) 2 %
10. Pentadecanoic Acid Methyl Ester (C15:0) 2 %
11. *cis*-10-Pentadecenoic Acid Methyl Ester (C15:1) 2 %
12. Palmitic Acid Methyl Ester (C16:0) 6 %
13. Palmitoleic Acid Methyl Ester (C16:1) 2 %
14. Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:0) 2 %
15. *cis*-10-Heptadecenoic Acid Methyl Ester (C17:1) 2 %
16. Stearic Acid Methyl Ester (C18:0) 4 %
17. Elaidic Acid Methyl Ester (C18:1*n9t*) 2 %
18. Oleic Acid Methyl Ester (C18:1*n9c*) 4 %
19. Linolelaidic Acid Methyl Ester (C18:2*n6t*) 2 %
20. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2*n6c*) 2 %
21. Arachidic Acid Methyl Ester (C20:0) 4 %
22.  $\gamma$ -Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3*n6*) 2 %
23. *cis*-11-Eicosenoic Acid Methyl Ester (C20:1) 2 %
24. Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3*n3*) 2 %
25. Heneicosanoic Acid Methyl Ester (C21:0) 2 %
26. *cis*-11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester (C20:2) 2 %
27. Behenic Acid Methyl Ester (C22:0) 4 %
28. *cis*-8,11,14-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3*n6*) 2 %
29. Erucic Acid Methyl Ester (C22:1*n9*) 2 %
30. *cis*-11,14,17-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3*n3*) 2 %
31. Arachidonic Acid Methyl Ester (C20:4*n6*) 2 %
32. Tricosanoic Acid Methyl Ester (C23:0) 2 %
33. *cis*-13,16-Docosadienoic Acid Methyl Ester (C22:2) 2 %
34. Lignoceric Acid Methyl Ester (C24:0) 4 %
35. *cis*-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid Methyl Ester (C20:5*n3*) 2 %
36. Nervonic Acid Methyl Ester (C24:1) 2 %
37. *cis*-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid Methyl Ester (C22:6*n3*) 2 %