

# Uloga disulfidnih mostova u vezanju Ccw5 proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae*

---

Pongrac, Paula

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:900491>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Paula Pongrac**

7021/BT

**ULOGA DISULFIDNIH MOSTOVA U VEZANJU  
CCW5 PROTEINA U STANIČNU STIJENKU KVASCA  
*S. cerevisiae*  
ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Biokemija**

**Mentor: izv.prof.dr.sc. Renata Teparić**

**Zagreb, 2017.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Uloga disulfidnih mostova u vezanju Ccw5 proteina u staničnu stijenk

kvasca *S. cerevisiae*

Paula Pongrac, 0058206097

**Sažetak:** Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je ekstracelularna organela građena od polisaharida i proteina koja stanici pruža oblik, čvrstoću, mehaničku zaštitu, osmotsku stabilnost, ali služi i u komunikaciji s drugim stanicama. Proteini sudjeluju u održavanju strukture stanične stijenke i komunikaciji stanica s okolinom, a osim prema funkciji razlikuju se prema građi i načinu vezanja u staničnu stijenk. Poznato je da se Ccw5 u staničnu stijenk veže esterskom vezom između  $\beta$ -1,3-glukana i ostatka glutamina unutar tzv. repetitivne sekvence ovog proteina. Međutim, objavljeno je nekoliko radova u kojima autori tvrde da se Ccw5 u stijenk kovalentno veže disulfidnim mostovima. Stoga je u ovom radu ispitana uloga disulfidnih mostova u ugradnji proteina Ccw5. Dobiveni rezultati su potvrdili da disulfidni mostovi nemaju ulogu u vezanju Ccw5, već da je on vezan esterski u stijenk, jer i nakon višestrukog tretmana sa SDS-om i/ili  $\beta$ -merkaptetanolom u stijenci zaostaje kovalentno vezana frakcija ovog proteina koja se ekstrahira pomoću NaOH.

**Ključne riječi:** disulfidni mostovi Pir proteini, *Saccharomyces cerevisiae*

**Rad sadrži:** 27 stranica, 4 slike, 33 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Renata Teparčić

**Pomoć pri izradi:**

**Datum obrane:** 7.srpnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Chemistry and Biochemistry**  
**Laboratory for Biochemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**The role of disulphide bonds in attachment of Ccw5 protein to the yeast cell wall  
of *S. cerevisiae***

**Paula Pongrac, 0058206097**

**Abstract:** *Saccharomyces cerevisiae* cell wall is an extracellular organelle built from polysaccharides and proteins, which gives the cell its shape, firmness, protection, osmotic stability and participates in communication with other cells. Proteins maintain the structure of cell wall and are used for communication with surroundings. They vary in function and in the type of bond by which they are linked to the cell wall. It is known that Ccw5 is linked to the cell wall by ester linkage between glutamine from repeated sequence of protein and  $\beta$ -1,3-glucan. However, several articles were published stating that Ccw5 is linked to the cell wall covalently by disulphide bonds. Therefore, the aim of this work was to examine the role of disulphide bonds in incorporation of Ccw5. Obtained results confirmed that disulphide bonds don't have a role in linking of Ccw5, and that Ccw5 is linked to the cell wall by ester linkage, because even after multiple treatment of cell walls with SDS and/or  $\beta$ -mercaptoethanol, covalently linked fraction of Ccw5 remains linked to cell wall and is extracted by NaOH.

**Keywords:** disulphide bonds, Pir proteins, *Saccharomyces cerevisiae*

**Thesis contains:** 27 pages, 4 figures, 33 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Renata Teparić, PhD, Associate Professor

**Technical support and assistance:**

**Defence date:** July 7<sup>th</sup> 2017

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1 Stanična stijenka.....	2
2.2. Polisaharidi stanične stijenke .....	3
2.2.1. Glukan.....	3
2.2.2. Hitin .....	4
2.3. Proteini stanične stijenke .....	5
2.3.1. Nekovalentno vezani proteini .....	6
2.3.2. Kovalentno vezani proteini.....	7
2.3.3. Pir proteini.....	8
2.3.4. Pir4p/Ccw5 .....	9
3. MATERIJALI I METODE.....	10
3.1. MATERIJALI .....	10
3.1.1. Kemikalije .....	10
3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca.....	10
3.1.3. Sojevi kvasca .....	10
3.1.4. Plazmid korišten u radu.....	11
3.2. METODE RADA .....	12
3.2.1. Transformacija kvasca .....	12
3.2.2. Uzgoj kvasca za indukciju gena pod kontrolom GAL promotora.....	13
3.2.3. Izolacija staničnih stijenki .....	13
3.2.4. Tretman stijenki Laemmli puferom .....	14
3.2.5. Tretman stijenki Laemmli puferom bez $\beta$ -merkaptioetanol.....	14
3.2.6. Tretman stijenki Laemmli puferom bez SDS-a .....	15
3.2.7. NaOH tretman stijenki.....	15
3.2.8. SDS-elektroforeza po Laemmli-u.....	15
3.2.9. Western blot.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	17
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. POPIS LITERATURE.....	23

# 1.UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jedan je od najčešće korištenih organizama u istraživanjima eukariotskih stanica zbog mnogih poželjnih karakteristika kao što je kratko generacijsko vrijeme i jednostavan životni ciklus, ali i zbog činjenice da ima GRAS status (generally regarded as safe) pa može biti korišten u proizvodnji hrane, biotehnološkoj i farmaceutskoj proizvodnji. U njemu se proučavaju različiti biokemijski procesi radi boljeg razumijevanja ustroja eukariotske stanice i moguće primjene u različitim područjima znanosti i industrije. Važna komponenta stanice kvasca je i ekstracelularna organela koja joj pruža oblik i zaštitu - stanična stijenka. Osim mehaničke zaštite stijenka osigurava i osmotsku stabilnost, a zbog fleksibilnosti sudjeluje i u komunikaciji s drugim stanicama i molekulama u okolišu. Stanična stijenka kvasca građena je od lanaca polisaharida glukana i hitina te manoproteina kojih je pronađeno više od 30. Proteini stanične stijenke razlikuju se po funkciji, ali i po načinu na koji se u nju ugrađuju. Ovisno o načinu vezanja na stijenku proteini se svrstavaju u nekovalentno ili kovalentno vezane. Fokus istraživanja ovog rada jest način ugradnje proteina Ccw5 u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Ccw5 karakterizira specifična ponavljajuća sekvenca, N- i C-terminalni dio karakterističan za obitelj Pir proteina kojoj pripada, te mjesto za proteolitičko procesiranje Kex2 proteazom. Za Ccw5 protein smatra se da je za stijenku vezan labilnom esterskom vezom između glutamina i glukozne jedinice  $\beta$ -1,3-glukana, ali mehanizam ove reakcije je još uvijek nepoznat. Neki pak autori tvrde da je Ccw5 protein vezan u stijenku disulfidnim mostovima. Budući da se ova tvrdnja ne slaže sa rezultatima objavljenim u ostaloj literaturi, kao ni sa rezultatima dobivenim u ovom Laboratoriju, u ovom radu ispitano je imaju li disulfidni mostovi ulogu u njegovoj ugradnji u stijenku. U tu svrhu stanične stijenke kvasca ekstrahirane su puferima koji su sadržavali SDS i/ili  $\beta$ -merkaptotanol te nakon toga sa 30 mM NaOH. SDS je ionski deterdžent koji zbog svoje građe s proteinima može tvoriti nekovalentne veze, čime utječe na uspostavljanje nekovalentnih interakcija proteina sa komponentama stijenke pa služi za njihovu ekstrakciju.  $\beta$ -merkaptotanol je reducirajući agens koji cijepa disulfidne mostove pa može ekstrahirati proteine koji su za stijenku vezani disulfidnim mostovima posredstvom drugih proteina stijenke. NaOH je alkalni reagens koji može kidati labilnu estersku vezu i njime se ekstrahiraju kovalentno vezani proteini Pir porodice. Razumijevanje ugradnje proteina u staničnu stijenku kvasca važno je jer bi se moglo iskoristiti u biotehnološke svrhe kod ugradnje i imobilizacije rekombinantnih proteina na površinu stanice što manje utječe na aktivnost i strukturu proteina od klasičnih metoda imobilizacije.

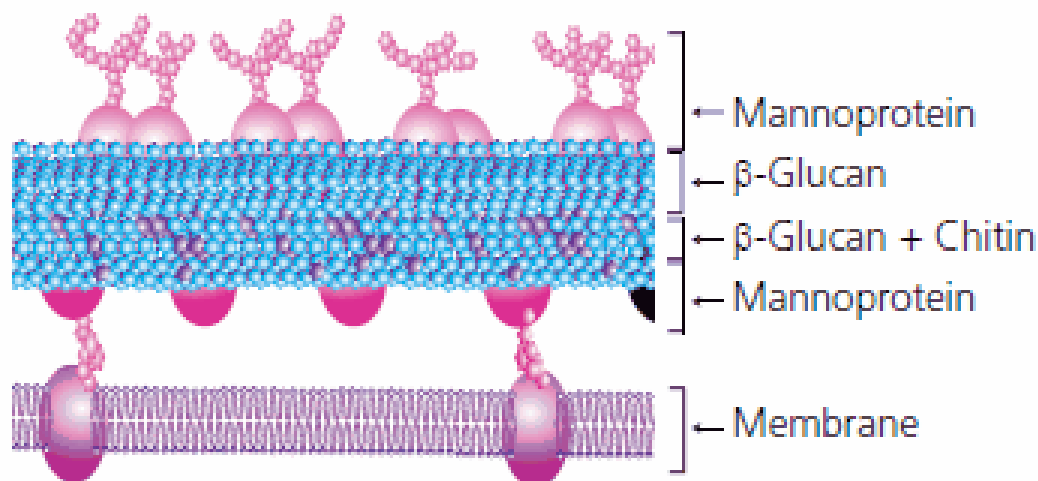
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Stanična stijenka

Stanična stijenka je kompleksna struktura bez koje stanica ne bi mogla preživjeti jer definira oblik stanice, osigurava joj mehaničku i osmotsku stabilnost. Osim toga važna je i za komunikaciju s drugim stanicama i molekulama u okolini. Stanična stijenka podložna je malim kontroliranim strukturnim promjenama tijekom rasta, parenja i sporulacije (Klis i sur., 2006). Ona nije samo statična zaštita već je izrazito dinamična struktura koja raste zajedno sa stanicom, mogu joj se modificirati kemijski sastav i fiziološka svojstva. Osim fleksibilnosti da prati promjene u životnom ciklusu kvasca stijenkiju karakteriziraju prije svega čvrstoća, stabilnost i mogućnost odupiranja visokom osmotskom tlaku. Ona predstavlja i omotač koji ograničava propusnost za molekule u okolini stanice. Stanična stijenka je visoko elastična i kad je stanica kvasca uronjena u hipertoničnu otopinu dolazi do njenog brzog skupljanja, pri čemu stanica može izgubiti i više od 60% svog početnog volumena (Klis i sur., 2002). Procijenjeno je da oko 1200 gena iskazuje fenotip povezan sa staničnom stijenkijom što potvrđuje činjenicu da je stanična stijenka važan integralni dio fiziologije stanice (De Groot i sur., 2001). Stanična stijenka kvasca je sastavljena od oko 85% polisaharida i 15% proteina (Nguyen i sur., 1998), ali taj sastav može varirati ovisno o soju i okolišnim uvjetima. Glavne komponente stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* su glukan, hitin i proteini. Gotovo svi proteini su O i/ili N-manozilirani. Najvažniju ulogu ima  $\beta$ -1,3-glukan koji je odgovoran za mehaničku stabilnost, a na njega su vezani hitin i  $\beta$ -1,6-glukan koji održavaju oblik i čvrstoću (Teparić i sur., 2004).

Istraživanja su pokazala da stijenka ima dvoslojnu strukturu koja je prikazana na Slici 1. Unutarnji sloj sastoji se uglavnom od razgranate mreže  $\beta$ -1,3-glukana na čije krajeve je kovalentno vezan  $\beta$ -1,6-glukan i hitin. Vanjski sloj sastavljen je uglavnom od manoproteina vezanih na glukan (Hartland i sur., 1994). Unutarnji sloj od glukana pruža stijenci mehaničku stabilnost, a vanjski od manoproteina štiti stanicu od okoline (Teparić i sur., 2010). Vanjski sloj osigurava i ograničenu permeabilnost stijenke. Povezanost dvaju slojeva ključna je za fiziološke funkcije stanice, a ostvarena je različitim tipovima veza između glukana i proteina.

Konstrukcija stanične stijenke strogo je kontrolirana i koordinirana sa staničnim ciklusom. Sastav polisaharida, struktura i debljina stanične stijenke značajno variraju ovisno o uvjetima okoline (Aguliar-Uscanga i Francois, 2003).



**Slika 1.** Shematski prikaz dvoslojne strukture stanične stijenke kvasca

( <http://www.sigmaaldrich.com> Pristupljeno 19.lipnja 2017. )

## 2.2. Polisaharidi stanične stijenke

Najveći dio stijenke čine upravo polisaharidi -  $\beta$ -1,3-glukan,  $\beta$ -1,6-glukan i hitin.  $\beta$ -1,3-glukan je dugi, razgranati polisaharid koji se u prosjeku sastoji od 1500 glukoznih jedinica. Na lance  $\beta$ -1,3-glukana vezani su  $\beta$ -1,6-glukan ili hitin.  $\beta$ -1,6-glukan je kraći, ali razgranatiji od  $\beta$ -1,3-glukana (Teparić i Mrša, 2013). Sintaze, glikozidaze i transglikozidaze su odgovorne za izgradnju, održavanje i modificiranje polisaharida stanične stijenke (Teparić i Mrša, 2013).

### 2.2.1. Glukan

Razgranati lanci  $\beta$ -1,3-glukana sa oko 1500 povezanih glukoznih jedinica čine većinsku komponentu kompleksne strukture stanične stijenke. Zbog prisutnosti bočnih lanaca molekule  $\beta$ -1,3-glukana mogu se povezivati samo mjestimično vodikovim vezama tvoreći kontinuiranu trodimenzionalnu mrežu (Klis i sur., 2006). Zbog svoje strukture u obliku zavojnice daju stijenci fleksibilnost. Na nereducirajuće krajeve  $\beta$ -1,3-glukana mogu se vezati razgranati lanci  $\beta$ -1,6-glukana ili hitin preko  $\beta$ -1,4-glikozidne veze.  $\beta$ -1,3-glukan sintetizira se kao linearni polimer u kontroliranim i koordiniranim uvjetima na vanjskoj strani stanične membrane kvasca gdje se UDP-glukoza veže u aktivno mjesto multienzimskog kompleksa



glukan sintaze koja se sastoji od dvije katalitičke podjedinice (Fks1 i Gsc2/Fks). Nije otkriveno produljuje li se lanac  $\beta$ -1,3-glukana na reducirajućem ili nereducirajućem kraju. Budući da se sintetizira kao linearni polimer, moraju postojati enzimi koji modificiraju lance  $\beta$ -1,3-glukana, ugrađuju novosintetizirane lance i popravljaju oštećenja stvarajući tako jedinstvenu mrežu polisaharida.

Fleksibilnost staničnoj stijenci omogućuju glukan i hitin hidrolaze koje cijepaju lance glukana i veze sa hitinom. Iako aktivnost većine ovih enzima nije dovoljno istražena, za Bgl2 vjeruje se da uvodi grananje u lance  $\beta$ -1,3-glukana. Glukan se sintetizira na vanjskoj strani stanične membrane gdje su smještene glukan i hitin sintaze koje povezuju aktivirane glukozne jedinice ili N-acetilglukozamin u polisaharidne lance. Novosintetizirane lance isprepliću i povezuju Gas proteini ili Chr1 i Chr2 i tako nastaju razgranati lanci  $\beta$ -1,3-glukana na koje je vezan hitin (Popolo i Vai, 1999; Rodriguez-Pena i sur., 2000).

$\beta$ -1,6-glukan je polimer sastavljen od oko 130 glukoznih jedinica, visoko je razgranat i stoga topljiv u vodi. Na njega se vežu neki proteini stanične stijenke (tzv. GPI proteini), a povezuje se i s  $\beta$ -1,3-glukanom i tako učvršćuje mrežu polisaharida stanične stijenke. Biosinteza  $\beta$ -1,6-glukana još nije potpuno objašnjena, nije identificirano točno mjesto sinteze ni svi enzimi koji u njoj sudjeluju. Proteini za koje se smatra da su povezani sa sintezom  $\beta$ -1,6-glukana su Kre9, Knh1 i Kre1 jer se bez njih smanjuje količina  $\beta$ -1,6-glukana u staničnoj stijenci. Primijećeno je da na razinu  $\beta$ -1,6-glukana imaju utjecaj i različiti proteini Golgijevog tijela, endoplazmatskog retikuluma i stanične stijenke (Klis i sur., 2002).

### **2.2.2. Hitin**

Hitin je najmanje zastupljeni polisaharid u staničnoj stijenci kvasca. Hitin sintaze su proteini integrirani u staničnu membranu koji stvaraju linearne polisaharidne lance  $\beta$ -1,4-N-acetilglukozamina koristeći UDP-N-acetilglukozamin kao supstrat (Roncero, 2002). Hitin se veže na nereducirajuće krajeve  $\beta$ -1,3-glukana i  $\beta$ -1,6-glukana što smanjuje topljivost  $\beta$ -1,3-glukana, učvršćuje konstrukciju stanične stijenke i povećava otpornost prema glukanzama. Ima značajnu ulogu i u pupanju tvoreći primarni septum između stanice majke i stanice kćeri. Hitin se može naći u stijenci stanice kćeri koja raste nakon citokineze, u prstenu na mjestu pupa i u primarnom septumu (Klis i sur., 2006). U *S. cerevisiae* postoje 3 hitin sintaze s različitim fiziološkim ulogama: Chs3 sintetizira glavninu hitina u staničnoj stijenci i hitinski prsten pupa; Chs2 uključena je u sintezu primarnog septuma između stanice majke i stanice kćeri; Chs1 zaslužna je za popravak stanične stijenke nakon odvajanja stanice kćeri.

Hitin sintaze sintetiziraju se u inaktivnom obliku i aktiviraju se nakon transporta na mjesto na kojem je potrebna njihova aktivnost, no mehanizam aktivacije još se mora razjasniti.

### 2.3. Proteini stanične stijenke

Do sad je identificirano više od 30 različitih manoproteina u staničnoj stijenci (Cappellaro i sur., 1998; Mrša i sur., 1997; Yin i sur., 2005) koji su većinom N- i/ili O-glikozilirani, a njihov sastav može varirati ovisno o uvjetima rasta. Za proteine stanične stijenke smatra se da imaju ulogu u održavanju strukture stanične stijenke, komunikaciji stanica s okolnim molekulama, limitaciji permeabilnosti stanične stijenke, opskrbi stanice nutrijentima ili sudjeluju u procesima flokulacije, formacije biofilma, aglutinacije, a većina ima enzimsku aktivnost. Postoji mnogo različitih proteina unutar stanične stijenke kvasca koji se razlikuju prema građi, funkciji i načinu vezanja u staničnu stijenu. Prema strukturnim sličnostima, funkciji i načinu na koji su ugrađeni u stijenu svrstani su u porodice. U nekim slučajevima članovi iste obitelji različito su regulirani što bi moglo značiti da imaju istu funkciju, ali pri različitim uvjetima (De Groot i sur., 2005). Najvažniji strukturni faktor stanične stijenke na koji se vežu proteini je  $\beta$ -1,3-glukan, ali razlikuje se način na koji se vežu. Pretpostavlja se da se neki proteini (Scw proteini-Soluble cell wall protein) vežu nekovalentno i mogu se ekstrahirati iz stanične stijenke pomoću vrućeg SDS-a, dok drugi (Ccw proteini-covalently linked cell wall proteins) tvore kovalentne veze direktno na  $\beta$ -1,3-glukan (tzv. Pir proteini - proteini s internim ponavljanjima) ili preko  $\beta$ -1,6-glukana (tzv. GPI proteini) i mogu se ekstrahirati iz stijenke pomoću glukanaza (Teparić i Mrša, 2013). Razlikuje ih i način vezanja na  $\beta$ -1,3-glukan, neki su kovalentno vezani preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra i  $\beta$ -1,6-glukana ili preko esterske veze između glutamata i glukoze  $\beta$ -1,3-glukana (Teparić i sur., 2010.).

Kvasci imaju i površinske proteine koji su ugrađeni ili vezani na vanjsku površinu stanične membrane, a njihova aktivnost je esencijalna za formaciju polisaharida stanične stijenke. U ovu grupu spadaju glukan i hitin sintaze, Gas1-5 glukan transferaze i hitin transferaze Crh1 i Crh2 (Teparić i Mrša, 2013). Dok je za ulogu  $\beta$ -1,3-glukana i hitina jasno da je to mehanička stabilizacija stanice, funkcija manoproteina je u velikoj mjeri nepoznata. Porodice proteina stanične stijenke karakterizira homologija u strukturi, ali imaju različite funkcije i mnoge su još nepoznate.

### 2.3.1. Nekovalentno vezani proteini

Za proteine koji se mogu ekstrahirati pri povišenoj temperaturi pomoću SDS-a,  $\beta$ -merkaptoetanolu i sličnih reagensa smatra se da su vezani nekovalentno za staničnu stijenkicu ili preko disulfidnih mostova za druge proteine. Iako fiziološka važnost većine nekovalentno vezanih proteina nije sasvim poznata, primarna struktura im je homologna glukozidazama i transglukozidazama pa se može pretpostaviti da imaju ulogu u izgradnji, održavanju ili preoblikovanju glukana u stijenici tijekom rasta, parenja, sporulacije i ostalim procesima koji uključuju promjene u strukturi stanične stijenkice (Teparić i sur., 2010).

Prvi protein koji je bio izoliran iz stanične stijenkice i čija je primarna struktura razjašnjena je Bgl2p koji ima endoglukanaznu i/ili transglukozidaznu aktivnost (Klebl i sur., 1989.). Njemu homologni proteini su Scw4p, Sw10p i Scw11p pa bi i oni mogli imati ulogu u modifikaciji glukana. Specifični su proteini Scw4 i Scw10 zato što su prvo detektirani među proteinima izoliranim pomoću SDS-a koji su nekovalentno vezani za stijenkicu, ali Scw4 i Scw10 se mogu i kovalentno vezati za  $\beta$ -1,3-glukan jer se ekstrahiraju iz stijenkice pomoću 30 mM NaOH (alkalnih reagensa) koji se inače koristi za ekstrakciju Pir proteina. Budući da ovi proteini dijele 63% aminokiselinskog sastava (Cappellaro i sur., 1998), nemaju karakteristična strukturalna obilježja potrebna za vezanje preko GPI sidra niti karakteristične ponavljajuće sekvence kojima se Pir proteini vežu kovalentno na  $\beta$ -1,3-glukan, mora postojati neki specifičan način vezanja, ali on još nije razjašnjen.

Potencijalne egzoglukanaze ove skupine proteina su Exg1p i Spr1p, a endoglukanaze Eng1p i Egt2p jer su potrebni za separaciju stanica (Mrša i sur., 1993; Goldman i sur., 1995; Balandrón i sur., 2002. ). Cts1p i Cts2p su hitinaze čija uloga bi mogla biti u separaciji stanica ili tijekom sporulacije (Kuranda i Robbins, 1991).

### 2.3.2. Kovalentno vezani proteini

Nakon ekstrakcije nekovalentno vezanih proteina stijenke SDS-om izdvajaju se i proteini vezani kovalentno na stijenku, pri čemu postoje oni koji se mogu ekstrahirati iz stijenke glukanzama i oni koji se izdvajaju djelovanjem 30 mM NaOH. Proteini koji su kovalentno vezani na  $\beta$ -1,3-glukan mogu biti vezani na njega preko ostatka GPI sidra i  $\beta$ -1,6-glukana ili preko labilne esterske veze osjetljive na alkalna sredstva između  $\gamma$ -karboksilne grupe glutaminske kiseline i hidroksilne grupe glukoze (Pir proteini). Pir proteini su intenzivno O- i/ili N-glikozilirani i imaju C-terminalnu domenu stabiliziranu disulfidnim vezama.

Većinu proteina kovalentno vezanih na glukan čine proteini vezani preko ostatka GPI sidra (glikolipid vezan na protein). Najzastupljeniji od njih su proteini Ccw12, Ccw13, Icw1, Tip1 i Cwp1 i nalaze se u vanjskom sloju stijenke. Vezani su na  $\beta$ -1,3-glukan preko ostatka glikozilfosfatidilinozitol sidra i  $\beta$ -1,6-glukana (Montijn i sur., 1994.). Funkcija nekih proteina vezanih preko ostatka GPI sidra je poznata, uključeni su u aglutinaciju i flokulaciju, a za neke još nije dovoljno istražena. Ovi proteini prolaze kroz postsintetske modifikacije na endoplazmatskom retikulumu gdje im se na C-terminalni kraj veže tzv. glikozilfosfatidilinozitolno sidro (Kapteyn i sur., 1996; Kapteyn i sur., 1999). Sekretornim putem prenose se do vanjske strane stanične membrane i zatim slijedi reakcija transglikozilacije u kojoj se protein zajedno sa dijelom GPI sidra prenosi na  $\beta$ -1,6-glukan. Enzim koji provodi ovu reakciju nije još identificiran. Pretpostavlja se da ne prolaze svi proteini ovi reakciju već neki ostaju pričvršćeni na staničnu membranu. Vrlo vjerojatno imaju različite funkcije, ali još nisu sve otkrivene. Za 5 članova GAS obitelji smatra se da imaju ulogu u modificiranju glukana (Ram i sur., 1995; Popoli i Vai 1999) zato što mutacija u *GAS1* izaziva abnormalnu formaciju  $\beta$ -1,3-glukana i njegovu sekreciju u medij (Ram i sur., 1998). Ostali proteini ove obitelji homologni su Gas1 proteinu, ali njihova uloga još se istražuje. Neki GPI-vezani proteini zaslužni su za interakciju među stanicama. Proteini obitelji Flo (Flo1p, Flo5p, Flo9p, Flo10p ) uključeni su u flokulaciju, a proteini Aga1p, Aga2p i Sag1p su aglutinini potrebni za spajanje stanica tijekom parenja. Iako su članovi obitelji TIR prvi opisani proteini vezani preko GPI sidra, njihova funkcija još se ne zna, primijećena je samo njihova različita ekspresija pri anaerobnim uvjetima. U GPI-vezane proteine svrstavaju se i japsini koji su proteaze vezane na staničnu membranu i sudjeluju u održavanju stanične stijenke. U ovu skupinu proteina spadaju i egzoglukanaza Exg2p i transglikozidaze Chr1p i Chr2p koji sudjeluju u unakrsnom vezanju  $\beta$ -1,3-glukana s hitinom.

### 2.3.3. Pir proteini

U obitelj Pir proteina (Proteins with Internal Repeats) svrstani su Pir1p/Ccw6p, Pir2p/Ccw7p/Hsp150p, Pir3p/Ccw8p i Pir4p/Ccw5p/Cis3p. Zajednička im je N-terminalna signalna sekvenca za upućivanje u sekretorni put, dio kojeg proteolitički uklanja Kex2 proteaza, jedinica od 12 aminokiselinskih ostataka koja se ponavlja između 1 (Pir4p) i 11 puta (Pir2p) i C-terminalni dio proteina (Teparić i sur., 2010). C-terminalni dio kod svih Pir proteina sadrži 4 cisteinska ostatka na istoj udaljenosti od C-kraja, a posljednja aminokiselina je uvijek cistein. Jaafar i sur. (2003) smatraju da očuvana C-terminalna sekvenca ima ulogu u vezanju Pir proteina u stijenku kvasca. Pir proteini su proteini s unutarnjim ponavljanjima koja sadrže glutamin koji sudjeluje u stvaranju veze sa  $\beta$ -1,3-glukanom u unutarnjem sloju stijenke. Smatra se da su vezani kovalentno na staničnu stijenku, a s  $\beta$ -1,3-glukanom tvore estersku vezu između  $\gamma$ -karboksilne grupe glutaminske kiseline i hidroksilne grupe glukoze. Veza je osjetljiva na alkalna sredstva jer se sva 4 proteina ove obitelji (Ccw5, Ccw6, Ccw7, Ccw8) mogu se ekstrahirati lužinom (Mrša i Tanner, 1999). Iako broj PIR gena varira u različitim sojevima kvasaca, Pir proteini prisutni su u svim do sad istraženim kvascima osim kod *Schizosaccharomyces pombe*. Pir1, Pir2 i Pir3 su najviše eksprimirani tijekom rane G1 faze staničnog ciklusa, kad stanica intenzivno raste i nove komponente stijenke se moraju ugraditi i povezati s postojećom mrežom makromolekula (Klis i sur., 2006). Permeabilnost stanice tijekom G1 faze niža je nego u bilo kojoj drugoj fazi (De Nobel i Bennett, 1991). Moguće je da povezuju lance glukana što rezultira smanjenom permeabilnošću stijenke. Eksprimiraju se u velikim koncentracijama i kad su stanice izložene stresu.

Fiziološka uloga ovih proteina nije poznata, iako nisu esencijalni. Mrša i Tanner (1999) su pokazali da njihov nedostatak u *S. cerevisiae* uzrokuje osmotsku nestabilnost i veću osjetljivost prema agensima koji inhibiraju sintezu stanične stijenke poput Calcoflour white i Congo red. Budući da im točna funkcija nije utvrđena, a eksprimiraju se u velikim koncentracijama i kad su stanice izložene stresu često se smatraju strukturnim proteinima stanične stijenke. Imaju više potencijalnih mjesta vezanja za glukan pa bi se mogli vezati na više lanaca  $\beta$ -1,3-glukana što bi dodatno učvrstilo stijenku (Klis i sur., 2006). Činjenica da nijedan od proteina koji se mogu ekstrahirati pomoću NaOH nema GPI sidro i da se mogu ekstrahirati lužinom govori da se ovi proteini vežu na stijenku dosad nepoznatim mehanizmom (Mrša i Tanner, 1999).

### 2.3.4. Pir4p/Ccw5

Ccw5 je protein veličine oko 40 kDa i kao što je prije spomenuto ima jednu kopiju ponavljajuće sekvence koja je prisutna u proteinima Pir obitelji. Delecija ponavljajuće sekvence (aminokiseline 65-82) rezultirala je otpuštanjem Ccw5 u medij (Ecker i sur., 2006). Određena količina Ccw5 ostaje nekovalentno vezana za stijenku i djelomično se otpušta u medij (Mrša i sur., 1997). Ova značajka je jedinstvena za Ccw5 od svih proteina u Pir obitelji. Analizama je utvrđeno da je ponavljajuća sekvenca potrebna za vezanje proteina na glukan. Sekvenciranjem proteina ekstrahiranog alkalnim tretmanom otkriveno je da je 74. aminokiselina u genu *PIR4* kvasca *S. cerevisiae* glutaminska kiselina umjesto glutamina što navodi na to da se deaminacijom glutamina osigurava energija za stvaranje esterske veze osjetljive na lužine, ali enzim potreban za stvaranje esterske veze još nije poznat (Ecker i sur., 2006). Strukturna analiza regije odgovorne za vezanje Pir4 ekstrahiranog pomoću  $\beta$ -1,3-glukanaze pokazala je da glutamin reagira s hidroksilnom grupom glukozne jedinice  $\beta$ -1,3-glukana (Ecker i sur., 2006). Otkriveno je još da ponavljajuća sekvenca sadrži tri glutamina (na 69., 74., 76. mjestu) i aspartat koji su potrebni za vezanje i da je mjesto vezanja glutamin na 74. mjestu. Teparić i sur. (2007) otkrili su da Ccw5 da bi se ugradio u stijenku kvasca mora imati točnu ponavljajuću sekvencu i mora biti u nativnoj konformaciji. Kao što je već napomenuto funkcija Pir proteina nije još razjašnjena, ali pretpostavlja se da sudjeluju u održavanju stijenke. Mrša i Tanner (1999) utvrdili su da mutacija u *CCW5* uzrokuje povećanu smrtnost kod kvasca *S. cerevisiae* i da mutant s disruptiranim genom *CCW5* raste 10% sporije od divljeg tipa. Nedostatak Pir proteina i proteina vezanih preko GPI sidra uzrokovao je 25% mrtvih stanica u kulturi (Teparić i sur., 2004). Takvi rezultati indiciraju da je funkcija ovih proteina povezana sa fazom rasta ili da njihov nedostatak postaje krucijalan kad stanice uđu u stacionarnu fazu (Teparić i sur., 2004).

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Kemikalije

- glukoza, galaktoza, rafinoza - Difco Laboratories (Detroit, USA)
- brom-fenol plavo - Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- aminokiseline histidin, uracil, leucin, triptofan - Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- agar, kvaščeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) - Biolife (Milano, Italija)
- ECL- otopine za razvijanje blota, standardi za proteinsku elektroforezu - Santa Cruz Biotechnology (Dallas, SAD)
- amonijev persulfat, Triton X-1,  $\beta$ -merkaptetoetanol, Na-dodecilsulfat (SDS) - Fluka (Buchs, Švedska)
- N, N, N', N', - tetrametiletilendiamin (TEMED), Ponceau S - Serva (Heidelberg, Njemačka)
- anti-HA-antitijela - Santa Cruz Biotechnology (Dallas, SAD)
- Litij acetat (LiAc) - Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

#### 3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca

YNB tekuća podloga - kompletna i Leu<sup>-</sup>

-YNB-AA/AS (6,7 g/L), mješavina aminokiselina „drop out“ HULT – (1,6 g/L), His (0,08 g/L), Ura (0,08 g/L), Leu (0,16 g/L), Trp (0,08 g/L)

YNBA kruta podloga – kompletna i Leu<sup>-</sup>

-YNB-AA/AS (6,7 g/L), glukoza (20 g/L), mješavina aminokiselina „drop out“ HULT - (1,6 g/L), agar (15 g/L), His (0,08 g/L), Ura (0,08 g/L), Leu (0,16 g/L), Trp (0,08 g/L)

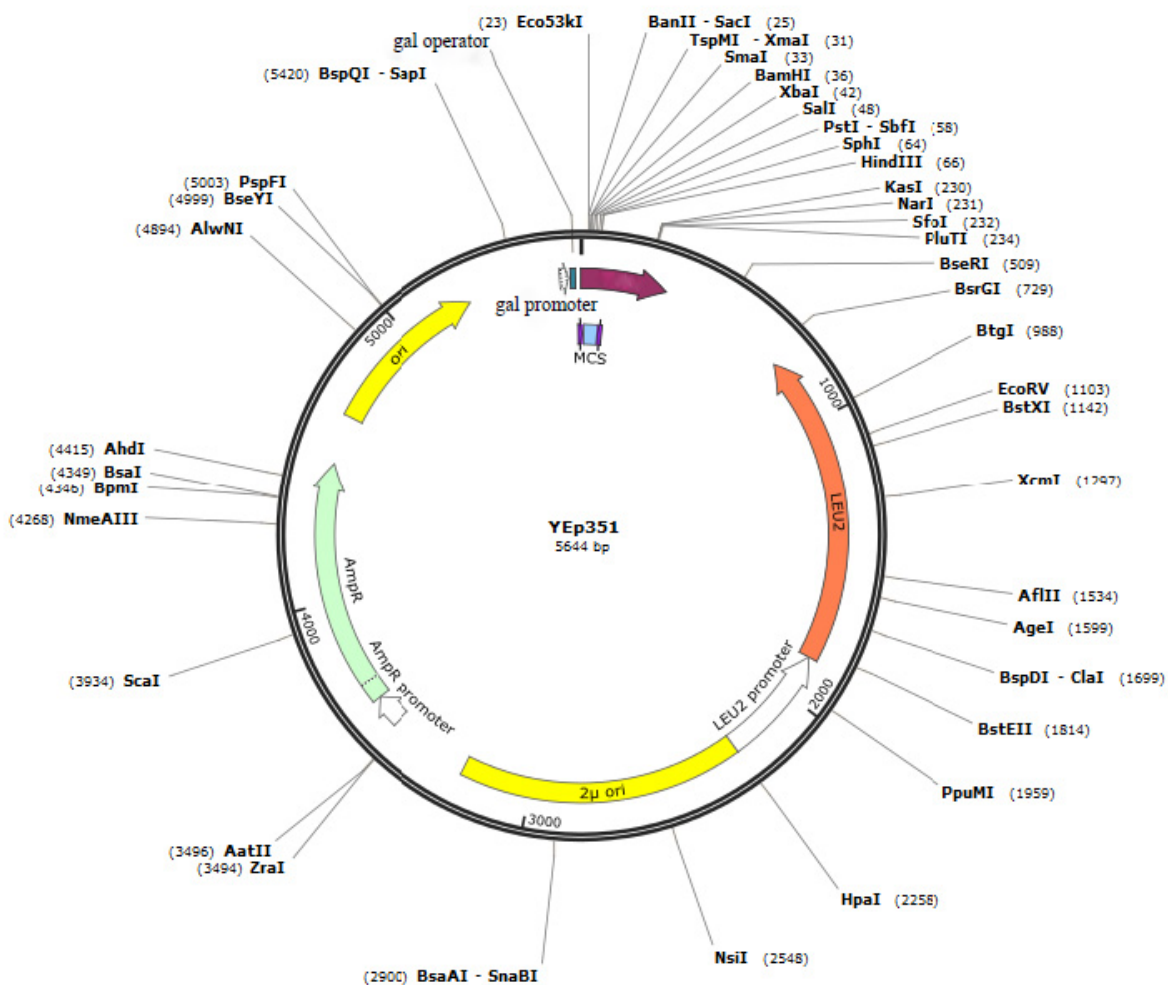
#### 3.1.3. Sojevi kvasca

Korišteni su laboratorijski sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

- *Saccharomyces cerevisiae* Y000 wt Mat a, *his3Δ*, *leu2Δ*, *met15Δ*, *ura3Δ*
- *Saccharomyces cerevisiae* Y000 YEp351 *CCW5*

### 3.1.4. Plazmid korišten u radu

Za transformaciju soja *S.cerevisiae* Y000 wt korišten je plazmid YEp351 *CCW5*. YEp351 (prikazan je Slici 2.) je vektor kvasca/*E.coli* dugačak 5644 pb sa *LEU2* auktotrofnim markerom kvasca koji omogućava selekciju transformanata. Gen *LEU2* kodira za 3-izopropilmalat dehidrogenazu potrebnu za biosintezu leucina pa na selektivnoj podlozi bez leucina narastu samo transformirani kvasci. YEp351 *CCW5* nosi i gen za protein Ccw5 na čiji je C-terminalni kraj dodana HA-oznaka tj. dio gena koji kodira za dio proteina hemaglutinina za koji su dostupna antitijela što omogućuje detekciju obilježenog proteina Western-blot metodom. Gen *CCW5* je pod kontrolom *GAL* promotora što omogućuje njegovu ekspresiju samo kad je u podlozi za uzgoj kvasca galaktoza jedini izvor ugljika. Na plazmidu nalazi se *ori*, ishodište replikacije u *E.coli*,  $2\mu$  *ori*, ishodište replikacije u kvascu, i *Amp<sup>R</sup>* koji omogućava rezistenciju *E.coli* na ampicilin. Produkt gena *Amp<sup>R</sup>* je  $\beta$ -laktamaza koja cijepa  $\beta$ -laktamski prsten ampicilina i tako sprječava njegovo djelovanje.



Slika 2. Plazmid YEp351 u koji je ugrađen *CCW5* pod kontrolu *GAL* promotora

([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)) Pristupljeno 25. lipnja 2017.



## 3.2.METODE RADA

### 3.2.1. Transformacija kvasca

Soj Y000 wt sterilno je nacijepjen na kompletnu YNB krutu ploču i ostavljen u termostatu na 30°C preko noći. Kvasac je sa kompletne ploče precijepjen u 10 ml kompletne tekuće YNB podloge s 2% glukoze kao izvor ugljika i stavljen na rotacionu tresilicu na 30°C preko noći. Ujutro je kvasac precijepjen u novih 10 ml kompletne tekuće YNB s 2% glukoze i inkubiran 3,5 sata na 30°C u rotacionoj tresilici da dođe u logaritamsku fazu rasta. Optička gustoća uzgojenog kvasca izmjerena je spektrofotometrom (ThermoSpectronic Helios-γ) određivanjem  $OD_{600}$  koji je nakon 3,5 sata bio 1,73 (u 10 ml). Uzorak je centrifugiran 4 minute na 3000 rpm da se stanice kvasca odijele od hranjive podloge. Talog je ispran pomoću 5 ml TE pufera (10 mM Tris -HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5-8), centrifugiran na 3000 rpm 4 minute, a zatim resuspendiran u TE puferu tako da je  $OD_{600} = 55$ . Volumen TE pufera izračunat je na sljedeći način:

$$\frac{\text{izmjereni } OD_{600} \text{ (u 1ml)} * \text{volumen u kojem je uzgajan kvasac (ml)}}{55}$$

55

Izračunati volumen treba umanjiti za 10% da se uzme u obzir volumen kvasca. U resuspendirani talog dodan je isti volumen 0,2 M LiAc (volumen izračunat navedenom formulom). Suspenzija stanica je inkubirana 60 minuta na 30°C na rotacionoj tresilici. U 100 μl suspenzije kvasca dodano je 5 μl plazmida Yep351 *CCW5* i suspenzija je inkubirana u termobloku na 30°C 30 minuta bez miješanja. Nakon 30 minuta dodano je 145 μl 60%-tnog PEG-a i suspenzija je snažno vortexirana pa inkubirana na 30°C bez miješanja u termobloku. Slijedio je temperaturni šok 6 minuta na 42°C u termobloku. Nakon točno 6 minuta talog je 2 puta ispran sa 1 ml sterilne hladne vode te centrifugiran pri 13000 rpm 1 minutu. Talog je resuspendiran u 120 μl sterilne vode i nacijepjen na selektivnu Leu<sup>-</sup> YNB krutu hranjivu podlogu s 2% glukoze. Podloga je stavljena na termostiranje na 30°C da narastu transformanti.

### **3.2.2. Uzgoj kvasca za indukciju gena pod kontrolom GAL promotora**

Kvasac je uzgajan na odgovarajućoj krutoj YNB hranjivoj podlozi s 2% glukoze. Uzgojeni transformanti precijepljeni su sa selektivnih ploča u 5 ml selektivnog medija s 2% rafinoze. Uzorci su stavljeni preko noći na rotacionu tresilicu na 30°C. Ujutro je odgovarajući volumen prečnoćne kulture (5 OD jedinica) prebačen u 10 ml odgovarajućeg selektivnog medija sa 2% rafinoze da napravi još 2 generacije (otprilike do OD<sub>600</sub> 2) na rotacionoj tresilici pri 30°C. Izmjerena je optička gustoća i 5 ml uzgojenog kvasca prebačeno je u 45 ml selektivnog medija s 2% galaktoze i 0,1% rafinoze i uzgoj je trajao preko noći tako da konačni OD<sub>600</sub> bude minimalno 1,5, a maksimalno 4 jedinice/ml.

### **3.2.3. Izolacija staničnih stijenki**

Stanice kvasca odvojene su od podloge centrifugiranjem 5 minuta na 3000 rpm. Talog je ispran dva puta s 25 ml destilirane vode i jednom s 25 ml 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8 te centrifugiran na 3000 rpm 5 min. Istaložene stanice resuspendirane su u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 8 u omjeru 100 µl pufera na 60-75 OD jedinica. Suspenzija stanica prebačena je u dvomililitarske Eppendorf epruvete s čepom s navojima za razbijanje stanica. U suspenziju stanica dodane su staklene kuglice za razbijanje u volumenu 100% volumena suspenzije. Stanice su razbijane na BeadBug™ uređaju 3 minute pri brzini od 4000 rpm u dva intervala. Između dva intervala stanice je potrebno ohladiti na ledu. Uzorak je prebačen u 1,5 mililitarske Eppendorf epruvete i centrifugiranjem 1 minutu na 8000 rpm odvojene su staklene kuglice. Slijedi centrifugiranje 1 min na 8000 rpm da se stijenske odvoje od intracelularnog sadržaja. Stijenke su isprane tri puta u 1 ml 50 mM K-fosfatnog pufera pH 8 uz centrifugiranje 1min/8000 rpm.

### **3.2.4. Tretman stijenki Laemmli puferom**

U 3 alikvota stijenki dodano je po 1 ml Laemmli pufera (50 mM Tris-HCl pufer pH 6,8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 5%  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,001% brom-fenol plavo). Uzorci se kuhaju 10 minuta u kipućoj vodenoj kupelji na 100°C. Centrifugiranjem 1 min pri 8000 rpm odvoje se stijenke od ekstrakta. Supernatant iz jednog od alikvota se čuva do provedbe elektroforeze, a istaložene stijenke se isperu 4 puta sa 50 mM K-fosfatnim puferom puferom pH 8 (1 ml) i jednom destiliranom vodom (1 ml) uz centrifugiranje pri 8000 rpm 1 minutu. Takav talog sačuvan je za NaOH tretman stijenki. Kod preostala 2 alikvota stijenki ekstrakt dobiven prvim kuhanjem u Laemmli puferu je bačen, a talog stijenki je ponovno resuspendiran u 1 ml Laemmli pufera i uzorci su podvrgnuti drugom kuhanju 10 minuta u vodenoj kupelji pri 100°C. Nakon drugog kuhanja uzorci su centrifugirani 1 min pri 8000 rpm da se stijenke odvoje od ekstrakta. Iz jednog od preostala dva uzorka supernatant se čuva za elektroforezu (ekstrakt proteina nakon drugog kuhanja), a talog stijenki se ispere kao što je prethodno opisano nakon prvog kuhanja. U posljednjem alikvotu talog stijenki je resuspendiran u novih 1 ml Laemmli pufera i kuhan u vodenoj kupelji 10 minuta pri 100°C. Nakon trećeg kuhanja supernatant je sačuvan za elektroforezu (ekstrakt proteina nakon trećeg kuhanja), a talog stijenki ispran puferom i vodom na ranije opisan način.

### **3.2.5. Tretman stijenki Laemmli puferom bez $\beta$ -merkaptoetanola**

U 3 alikvota stijenki dodano je po 1 ml Laemmli pufera bez  $\beta$ -merkaptoetanola (50 mM Tris-HCl pufer pH 6,8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 0,001% brom-fenol plavo). Tretman se provodi na jednak način kao što je opisano u poglavlju 3.2.4. i sačuvaju se ekstrakti proteina nakon prvog, drugog i trećeg kuhanja te talozi stijenki, isprani puferom i vodom na ranije opisan način, za NaOH tretman.

### **3.2.6. Tretman stijenki Laemmli puferom bez SDS-a**

U posljednja 3 alikvota stijenki dodano je po 1 ml Laemmli pufera bez SDS-a (50 mM Tris-HCl pufer pH 6,8, 2 mM EDTA, 5%  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,001% brom-fenol plavo). Postupak je isti kao kod tretmana stijenki Laemmli puferom (opisano u poglavlju 2.3.4.). Za elektroforezu su sačuvani ekstrakti proteina nakon prvog, drugog i trećeg kuhanja, a talozi stijenki sačuvani su za NaOH tretman.

### **3.2.7. NaOH tretman stijenki**

Uzorci stijenki nakon završene ekstrakcije Laemmli puferima različitog sastava isprani su sa 1 ml destilirane vode i centrifugirani 1 min pri 8000 rpm. Stijenke su resuspendirane u 50  $\mu$ l 30 mM NaOH i ostavljene preko noći u frižideru na +4°C. Uzorci su zatim centrifugirani 5 minuta pri 8000 rpm da se odvoje stijenke od NaOH ekstrakta. 50  $\mu$ l proteinskog ekstrakta prebačeno je u nove Eppendorfice, dodano je 13  $\mu$ l Laemmli pufera za uzorke (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 mM EDTA III, 2% SDS, 10% glicerol, 0.001% bromfenol plavo i 5%  $\beta$ -merkaptoetanol) i uzorci su čuvani u zamrzivaču do provedbe elektroforeze.

### **3.2.8. SDS-elektroforeza po Laemmli-u**

Proteini izolirani iz stanične stijenke razdvojeni su SDS-elektroforezom. SDS ploče sastoje se od dva gela, gornjeg gela za sabijanje i donjeg gela za razdvajanje. Sastav 4 % gela za sabijanje - 4,5% akrilamida, 0,12%, 0,1% SDS-a, 0,075% N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) i 7.5% amonij persulfata (APS) u puferu za gornji gel (0,1 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS). Korišten je 12% gel za razdvajanje sljedećeg sastava – 12% akrilamida, 0,3% N, N' – metilenbisakrilamida, 0,06% N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), 6% amonij-persulfat (APS) u puferu za donji gel (1,1 M Tris-HCl pH 8,8, 0,3% SDS). Uzorcima proteina za elektroforezu dodano je 5  $\mu$ l pufera za uzorke (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 mM EDTA III, 2% SDS, 10% glicerol, 0.001% bromfenol plavo i 5%  $\beta$  -merkaptoetanol). Uzorci NaOH ekstrakta prije elektroforeze držani su 2 minute u termobloku na 100°C. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu (25mM TRIS-glicin pufer pH 6.8, 0.1% SDS) u aparatu za elektroforezu (Sigma) pri naponu od 180 V. Elektroforeza traje oko 1 sat, tijekom se prati migracijskim bojilom brom-fenol plavo i zaustavlja se kad boja dođe do kraja ploče.

### 3.2.9. Western blot

Nakon završetka elektroforeze, proteini su iz poliakrilamidnog gela preneseni na nitroceluloznu membranu. Transfer se vrši 90 minuta pri 400 mA u karbonatnom puferu (10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20% metanol) u za to predviđenom uređaju (Sigma). Nakon transfera nitroceluloza je bojana Ponceau S bojom (0.1% Ponceau S u 5%-tnoj octenoj kiselini) do pojave proteinskih vrpce. Vrpce standarda označene su na nitrocelulozi grafitnom olovkom i boja je nekoliko puta isprana destiliranom vodom. Nitroceluloza je zatim inkubira na +4°C preko noći u 10 ml pufera za blokiranje ( 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) sa 1% obranog mlijeka. Nitrocelulozna membrana se zatim inkubira 90 minuta na tresilici u 5 ml pufera za blokiranje sa 3 µl anti-HA mišjih monoklonskih antitijela (Roche). Na taj način omogućena je detekcija proteina koji imaju HA-oznaku (HA-tag), u ovom slučaju protein Ccw5. Nitroceluloza je isprana tri puta po 5 minuta sa po 5 ml pufera za blokiranje. Nakon ispiranja razvije se slika pomoću ECL otopina za detekciju antitijela tako da se na nitrocelulozu nanese 1 ml ECL otopine za razvijanje, a fluorescencija se zabilježi na RTG-filmu koji se eksponira preko noći.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja koja su provedena sa proteinima Pir obitelji navode da su proteini ove porodice vezani kovalentno u staničnu stijenku kvasca. Svi oni sadrže jednu ili više kopija tzv. ponavljajuće sekvence dugačke 12 aminokiselinskih ostataka koja je odgovorna za stvaranje veze sa glukonom stijenke, sekvencu koju procesira Kex2 proteaza, N-terminalni dio za upućivanje u sekretorni put (tzv. signalna sekvenca) i očuvani C-terminalni dio koji kod svih Pir proteina ima 4 cisteina na istoj poziciji od C-kraja, a posljednji aminokiselinski ostatak je uvijek cistein. Unutar ponavljajuće sekvence nalazi se ostatak glutaminske kiseline koja stvara estersku vezu između svoje  $\gamma$ -karboksilne grupe i hidroksilne grupe glukoze  $\beta$ -1,3-glukana. Ccw5 protein i njemu srodni proteini mogu se iz stijenke ekstrahirati 30 mM NaOH jer je esterska veza kojom su vezani za glukon osjetljiva na lužnati medij. Međutim, enzimi koji bi katalizirali ovu reakciju kao ni mehanizam reakcije nije još opisan. Međutim, u nekoliko radova je objavljena tvrdnja da su Pir proteini vezani u stijenku disulfidnim mostovima (Jaafar i sur., 2003; Moukadiri i Zueco, 2001; Moukadiri i sur., 1999). Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati ulogu disulfidnih mostova u vezanju Ccw5 proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae*.

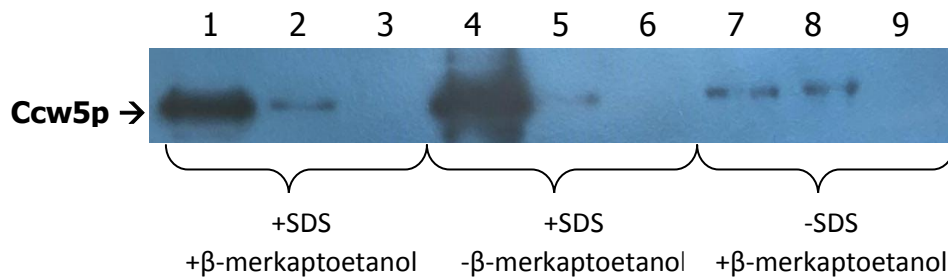
Stanice kvasca prvo su transformirane plazmidom YEp351 *CCW5* koji nosi gen za protein Ccw5 na čiji je C-terminalni kraj dodana tzv. HA-oznaka tj. dio gena koji kodira za dio proteina hemaglutinina za koji su dostupna komercijalna antitijela, što omogućuje laku detekciju tako obilježenog proteina metodom Western-blot. Gen *CCW5* je na plazmidu pod kontrolom *GAL* promotora što omogućuje njegovu kontroliranu ekspresiju samo u uvjetima kada se kvasac uzgaja na podlozi koja sadrži galaktozu kao jedini izvor ugljika. Na plazmidu se još nalazi gen koji kodira za enzim iz biosintetskog puta Leucina, što omogućuje selekciju transformiranih stanica kvasca na selektivnoj podlozi bez Leucina (YNB Leu<sup>-</sup>). Nakon transformacije kvasac je uzgajan na YNB Leu<sup>-</sup> podlozi s galaktozom da bi došlo do ekspresije proteina Ccw5. Budući da se korišteni plazmid u stanci umnoži u velikom broju kopija, pa je stoga nakon ekspresije gena *CCW5* sa plazmida u stanicama prisutna velika količina proteina Ccw5, jedan dio proteina veže se u stijenku nekovalentnim vezama, a ostatak kovalentno.

Iz stanica transformiranih su zatim izolirane stanične stijenke i tretirane Laemmli puferima različitog sastava kako bi se iz stijenki izolirala frakcija nekovalentno vezanog proteina Ccw5. Budući da neki autori tvrde je Ccw5 vezan kovalentno u staničnu stijenku labilnom esterskom vezom, a drugi pak smatraju da je vezan disulfidnim mostovima korištene su 3 varijante pufera kojim se kidaju različite vrste veza. Laemmli pufer kojim su

tretirane stijenke u jednom slučaju je sadržavao samo SDS (bez  $\beta$ -merkaptetoanola), u drugom samo  $\beta$ -merkaptetanol bez SDS-a, a u trećem je sadržavao i SDS i  $\beta$ -merkaptetanol. SDS je ionski deterdžent, natrijeva sol laurilske kiseline, koja se sastoji od dugog alifatskog lanca i sulfatne skupine. Zbog svoje građe s proteinima može tvoriti nekovalentne veze (ionske i hidrofobne) čime dovodi do denaturacije proteina na koje se veže i konkuriра za uspostavljanje nekovalentnih interakcija proteina sa komponentama stijenke.  $\beta$ -merkaptetanol je reducirajući agens koji cijepa disulfidne mostove, pa njegova prisutnost u puferu za ekstrakciju može rezultirati izolacijom proteina koji su za stijenku vezani disulfidnim mostovima posredstvom drugih proteina stijenke. Tretmanom stijenki Laemmli puferima različitog sastava željelo se ispitati je li za ekstrakciju nekovalentno vezane frakcije Ccw5 proteina dovoljan SDS, koji uzrokuje kidanje nekovalentnih veza kojim se protein veže u stijenku, ili je potreban i  $\beta$ -merkaptetanol da pokida disulfidne mostove.

Stijenke su tri puta uzastopce kuhane u svakom od navedenih pufera kako bi se osiguralo da je potpuno uklonjena nekovalentno vezana frakcija proteina Ccw5 iz stijenki, tj. da je sav protein koji se nakon toga izolira pomoću NaOH zaista u stijenku vezan kovalentno. Nakon provedenih ekstrakcija različitim Laemmli puferima stijenke su podvrgnute tretmanu s NaOH, kao što je opisano u poglavlju Materijali i Metode, kako bi se izolirala kovalentno vezana frakcija proteina Ccw5.

Nakon provedene elektroforeze i Western blot analize ekstrahiranih proteina dobivene su proteinske vrpce prikazane na Slikama 3. i 4. Na slici 3. u jažicama pod brojem 1, 2 i 3 može se vidjeti da je tretmanom stijenki kompletnim Laemmli puferom, koji sadrži SDS i  $\beta$ -merkaptetanol, najviše proteina Ccw5 ekstrahirano prvim kuhanjem, mala koncentracija Ccw5 ekstrahirana je i drugim kuhanjem, a u ekstraktu dobivenom nakon trećeg kuhanja nije više prisutna vrpca Ccw5 proteina. Ovakav rezultat pokazuje da je već nakon dvije uzastopne ekstrakcije potpuno uklonjena nekovalentno vezana frakcija Ccw5 iz stijenke.



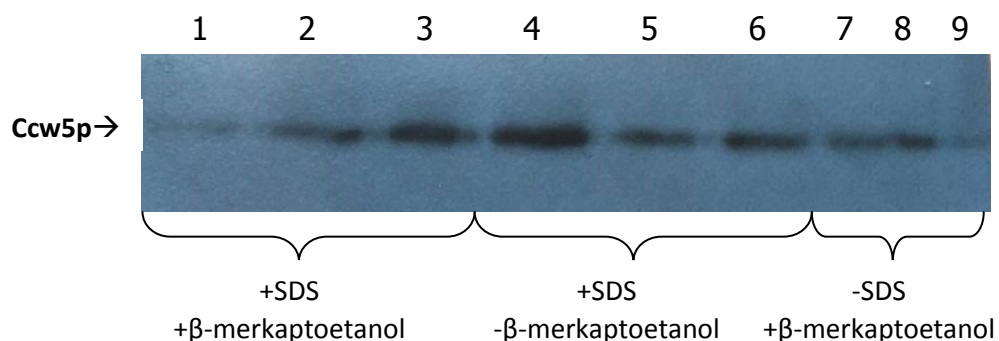
**Slika 3.** Proteinske vrpce Ccw5 proteina dobivene Western blot analizom nakon tretmana stijenki Laemmli puferom

- 1-ekstrakt nakon prvog kuhanja sa kompletnim Laemmli puferom
- 2-ekstrakt nakon drugog kuhanja sa kompletnim Laemmli puferom
- 3-ekstrakt nakon trećeg kuhanja sa kompletnim Laemmli puferom
- 4-ekstrakt nakon prvog kuhanja sa Laemmli puferom bez β-merkaptoetanela
- 5- ekstrakt nakon drugog kuhanja sa Laemmli puferom bez β-merkaptoetanela
- 6- ekstrakt nakon trećeg kuhanja sa Laemmli puferom bez β-merkaptoetanela
- 7- ekstrakt nakon prvog kuhanja sa Laemmli puferom bez SDS-a
- 8- ekstrakt nakon drugog kuhanja sa Laemmli puferom bez SDS-a
- 9- ekstrakt nakon trećeg kuhanja sa Laemmli puferom bez SDS-a

U jažici broj 4 na Slici 3. vidi se da je najviše Ccw5 ekstrahirano Laemmli puferom koji sadrži samo SDS nakon prvog kuhanja. Drugim kuhanjem u istom puferu (jažica 5) ekstrahirano je još nešto malo Ccw5, a u ekstraktu dobivenom nakon trećeg kuhanja (jažica 6) više nema izoliranog Ccw5. Laemmli puferom koji sadrži samo β-merkaptoetanol ekstrahirano je najmanje Ccw5 proteina (jažice 7, 8 i 9 na Slici 3.) i to također samo u prva dva kuhanja. Nakon prvog kuhanja najjača vrpca u jažici 4 na Slici 3. dobivena je tretmanom Laemmli puferom koji je sadržavao samo SDS što pokazuje da je njime ekstrahirano najviše nekovalentne frakcije proteina, a najslabiji signal nakon prvog kuhanja pokazuje vrpca u jažici 7 na Slici 3. koja je dobivena nakon tretmana Laemmli puferom sa β-merkaptoetanolom bez SDS-a. Nakon drugog kuhanja s kompletnim Laemmli puferom i onim bez β-merkaptoetanela jačina vrpce (jažice 2 i 5, Slika 3. ) se značajno smanjila u odnosu na onu dobivenu nakon prvog kuhanja u istim puferima, što znači da je glavnina nekovalentno vezane frakcije izolirana prvim kuhanjem. Vrpce u jažicama 7 i 8 na Slici 3. podjednake su jačine pa je moguće da β-merkaptoetanol nije uzrok ekstrakcije ovih proteina, već ostali sastojci Laemmli pufera ( TRIS, EDTA ) ili denaturirajući uvjeti ekstrakcije (100°C 10 min). Ovakvi rezultati pokazuju da prisustvo β-merkaptoetanela nije bitno utjecalo na ekstrakciju nekovalentno vezane frakcije Ccw5, već je dovoljan SDS u Laemmli puferu, koji kida nekovalentne interakcije, da bi se ona ekstrahirala.



Stijenke nakon tretmana sa kompletnim Laemmli puferom podvrgnute su tretmanu s NaOH koji je ekstrahirao preostale, kovalentno vezane molekule proteina Ccw5 iz stijenke. Kao što se vidi na Slici 4. u jažicama broj 1, 2 i 3 postoji vrpca podjednake jakosti koja odgovara proteinu Ccw5, što ukazuje na to da je nakon potpunog uklanjanja nekovalentno vezane frakcije proteina Ccw5 kompletnim Laemmli puferom dio Ccw5 još uvijek ostao kovalentno vezan za stijenku. Nadalje je pokazano da je i nakon ekstrakcije nekovalentno vezane frakcije Ccw5 Laemmli puferom koji je sadržavao samo SDS, u stijenci zaostalo podjednako Ccw5 proteina kovalentno vezanog za stijenku, što se može vidjeti po prisutnoj proteinskoj vrpici Ccw5 u jažicama 4,5 i 6 na Slici 4. Nakon ekstrakcije proteina stijenci Laemmli puferom koji sadrži samo  $\beta$ -merkaptetoanol također je još uvijek prisutna kovalentno vezana frakcija Ccw5 u stijenci, što je potvrđeno ekstrakcijom preostalog Ccw5 pomoću NaOH (proteinska vrpca u jažicama 7,8 i 9 na Slici 4. ). Na Slici 4. može se vidjeti da su vrpce u svim jažicama podjednake jačine, bez obzira na prethodni tretman stijenci Laemmli puferima različitog sastava i bez obzira na broj kuhanja, što dokazuje da je ova frakcija proteina Ccw5 vezana u stijenku kovalentno te da disulfidni mostovi nemaju ulogu u kovalentnom vezanju ovog proteina.



**Slika 4.** Proteinske vrpce Ccw5 proteina dobivene Western blot analizom nakon NaOH tretmana

- 1- NaOH ekstrakt nakon prvog kuhanja sa kompletnim Laemmli puferom
- 2- NaOH ekstrakt nakon drugog kuhanja sa kompletnim Laemmli puferom
- 3- NaOH ekstrakt nakon trećeg kuhanja sa kompletnim Laemmli puferom
- 4- NaOH ekstrakt nakon prvog kuhanja sa Laemmli puferom bez  $\beta$ -merkaptetoanola
- 5- NaOH ekstrakt nakon drugog kuhanja sa Laemmli puferom bez  $\beta$ -merkaptetoanola
- 6- NaOH ekstrakt nakon trećeg kuhanja sa Laemmli puferom bez  $\beta$ -merkaptetoanola
- 7- NaOH ekstrakt nakon prvog kuhanja sa Laemmli puferom bez SDS-a
- 8- NaOH ekstrakt nakon drugog kuhanja sa Laemmli puferom bez SDS-a
- 9- NaOH ekstrakt nakon trećeg kuhanja sa Laemmli puferom bez SDS-a

Iz ovakvih rezultata može se zaključiti da u stijenci postoji kovalentno vezana frakcija proteina Ccw5 tj. da proteini koji se ekstrahiraju djelovanjem NaOH nisu zaostali proteini iz nekovalentno vezane frakcije proteina Ccw5 uslijed nepotpune izolacije u prvom koraku. Ovakav zaključak potvrđuje i činjenica da su proteinske vrpce u NaOH ekstraktima podjednake jačine bez obzira na prethodno provedeni broj ekstrakcija nekovalentno vezane frakcije Ccw5. Tako je jačina vrpce Ccw5 u NaOH ekstraktu dobivene nakon tri uzastopna kuhanja u Laemmli puferima (nakon čega u tim ekstraktima više nema Ccw5 proteina) podjednaka onoj nakon prvog odnosno drugog kuhanja. Ovakvi rezultati nadalje potvrđuju da disulfidni mostovi nemaju ulogu u vezanju Ccw5 proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae* zato što on i nakon intenzivnog tretmana stijenki Laemmli puferima koji sadrže  $\beta$ -merkaptotanol (sa ili bez SDS-a) i dalje u podjednakoj količini ostaje vezan na stijenku kovalentnim vezama. Rezultat da se manja količina Ccw5 može iz stijenke ekstrahirati Laemmli puferom koji ne sadrži SDS, već samo  $\beta$ -merkaptotanol je vjerojatno posljedica djelovanja ostalih sastojaka pufera (TRIS, EDTA) te denaturirajućih uvjeta u kojima se ekstrakcija odvija (10 min. na 100 °C) na uspostavljanje nespecifičnih nekovalentnih interakcija između proteina Ccw5 i ostalih komponenata stijenke.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivana je uloga disulfidnih mostova u ugradnji Ccw5 proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae*. Iz rezultata može se zaključiti da disulfidni mostovi nemaju ulogu u vezanju Ccw5 proteina za stijenku kvasca jer on i nakon više uzastopnih intenzivnih tretmana stijenki  $\beta$ -merkaptetanom, uz ili bez prisustva SDS-a, zaostaje vezan u stijenci, a količina proteina Ccw5 izoliranog pomoću NaOH je jednaka bez obzira na to da li su stijenke prethodno ekstrahirane samo sa SDS-om ili sa kombinacijom SDS-a i  $\beta$ -merkaptetanola.

## 6. POPIS LITERATURE

Aguilar-Uscanga B., Francois J.M. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology* **37**:268–274.

Baladrón V., Ufano S., Dueñas E., Martín-Cuadrado A.B., del Rey F., Vázquez de Aldana C.R. (2002) Eng1p, an endo-1,3- $\beta$ -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **1**:774–786.

Cappellaro C., Mrša V., Tanner W. (1998) New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *Journal of Bacteriology* **180**: 5030–5037.

De Groot P.W.J., Ruiz C., Vázquez de Aldana C.R. *et al.* (2001) A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative and Functional Genomics* **2**: 124–142.

De Groot P.W., Ram A.F., Klis F.M. (2005) Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics and Biology* **42**:657–675.

De Nobel J.G., Barnett J.A. (1991) Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay [review]. *Yeast* **7**: 313–323.

Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrša V., Tanner W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to  $\beta$ -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 11523–11529.

Goldman R.C., Sullivan P.A., Zakula D., Capoblanco J.O. (1995) Kinetics of  $\beta$ -1,3-glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the BGL2 gene. *European Journal of Biochemistry* **227**:372–378.

Hartland R.P., Vermeulen C.A., Klis F.M., Sietsma J.H., Wessels J.G. (1994) The linkage of  $\beta$ -1,3-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1591–1599.

Jaafar L., Moukadiri I., Zueco J. (2003) Characterization of a disulphide-bound Pir-cell wall protein (Pir-CWP) of *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **20**:417-426.

Kapteyn J.C., Montijn R.C. , Vink E. , de la Cruz J. , Llobell A., Douwes J.E., Shimoï H., Lipke P.N., Klis F.M. (1996) Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolyme. *Glycobiology* **6**: 337–345.

Kapteyn J.C., Van den Ende H., Klis F.M. (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochemica et Biophysica Acta* **1426**: 373–383.

Klebl F.,Tanner W. (1989) Molecular cloning of a cell wall exo-b-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **171**: 6259–6264.

Klis F.M.,Boorsma A.,De Groot P.W. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**:185–202.

Klis F.M. et al.(2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **26**:239-256.

Kuranda M.J.,Robbins P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **266**:19758–19767.

Montijn R.C., Van Rinsum J., Van Schagen F.A., Klis F.M. (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side-chain. *The Journal of Biological Chemistry* **269**:19338–19342.

Moukadiri I., Jaafar L., Zueco J. (1999) Identification of Two Mannoproteins Released from Cell Walls of a *Saccharomyces cerevisiae mnn1 mnn9* Double Mutant by Reducing Agents. *Journal of Bacteriology* **181**:4741-4745.

Moukadiri I., Zueco J. (2001) Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulphide bridges. *FEMS Yeast Research* **1**:241-245.

Mrša V., Klebl F., Tanner W. (1993) Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo- $\beta$ -1,3-glucanase. *Journal of Bacteriology* **175**:2102–2106.

Mrša V., Seidl T., Gentzsch M., and Tanner W. (1997) Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1145–1154.

Mrša V., Tanner W. (1999) Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5, Ccw6, Ccw7 and Ccw8 (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **15**:813–820.

Nguyen T.H., Fleet G.H., Rogers P.L. (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**:206–212.

Popolo L., Vai M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochimica et Biophysica Acta* **142**: 385–400.

Ram A.F., Brekelmans S.S., Oehlen L.J., Klis F.M. (1995) Identification of two cell cycle regulated genes affecting the  $\beta$ -1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **358** :165–170.

Ram A.F., Kapteyn J.C., Montijn R.C., Caro L.H., Douwes J.E., Baginsky W., Mazur P., Van den Ende H., Klis F.M. (1998) Loss of the plasma membrane protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of  $\beta$ -1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *Journal of Bacteriology* **180**: 1418–1424.

Rodriguez-Pena J.M., Cid V.J., Arroyo J., Nombela, C. (2000) A novel family of cell wall related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 3245-3255.

Roncero C. (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current Genetics* **41**:367–378.

Teparić R., Mrša V. (2013) Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. *Current Genetics* **59**: 171-185.

Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2007) Binding assay for incorporation of alkali-extractable protein in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **24**:259-266.

Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2004) Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology* **150**:3145-3150.

Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2010) Incorporation of Homologous and Heterologous Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Food Technology and Biotechnology* **48**: 317-328.

Yin Q. Y., de Groot P. W., Dekker H. L., de Jong L., Klis F. M., de Koster C. G. (2005) Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *Journal of Biological Chemistry* **280**:20894–20901.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

---

ime i prezime studenta