

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološku fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Dora Štefok

7037/BT

**ULOGA DISULFIDNIH MOSTOVA U UGRADNJI Scw4 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 sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Uloga disulfidnih mostova u ugradnji Scw4 proteina u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Dora Štefok, 0058206403

Sažetak: Stanična stijenka kvasca je čvrsta i elastična ekstracelularna struktura građena od polisaharida i proteina. Proteini stijenke međusobno se razlikuju po svojoj funkciji i po načinu ugradnje u staničnu stijenku. Scw4 je protein koji se u stijenku djelomično ugrađuje nekovalentnim, a djelomično kovalentnim vezama. Smatra se da je način kovalentnog vezanja Scw4 u stijenku jednak načinu vezanja proteina PIR porodice, odnosno vezanje esterskom vezom labilnom u alkalnim uvjetima. Prema nekim autorima PIR proteini se u stijenku kvasca ugrađuju disulfidnim mostovima, stoga je u ovom radu ispitano imaju li disulfidni mostovi ulogu u ugradnji kovalentno vezane frakcije Scw4 u stijenku. Osim toga ispitano je ima li β -merkaptetanol ulogu u ekstrakciji nekovalentno vezane frakcije Scw4. Tretman SDS-om sa ili bez β -merkaptetanola pokazao je da glavnu ulogu u ekstrakciji nekovalentno vezane frakcije proteina Scw4 ima SDS. Neuspješna ekstrakcija sa β -merkaptetanolom pokazala je da se Scw4 kovalentno u stijenku ne ugrađuje disulfidnim mostova.

Ključne riječi: disulfidni mostovi, *Saccharomyces cerevisiae*, Scw4

Rad sadrži: 28 stranica, 9 slika, 24 literaturnih 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 Teparić

Pomoć prvi izradi:

Datum obrane: 17. 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 of Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

The role of disulphide bonds in the integration of Scw4 protein in the cell wall of
Saccharomyces cerevisiae

Dora Štefok, 0058206403

Abstract: The yeast cell wall is firm and flexible extracellular structure constructed of polysaccharide moieties and mannoproteins. Except for their physiological role cell wall proteins differ according to the way they are linked to glucan. It is known that Scw4 is partly bound to the cell wall covalently and partly non-covalently. Covalently linked Scw4 is most probably attached to the cell wall in the same way as PIR proteins, by alkali-labile ester linkage. However, some authors think that PIR proteins are linked to the cell wall by disulphide bonds. Therefore, role of disulphide bonds in the integration of Scw4 in the cell wall was examined in this work. Furthermore, some experiments were conducted to find out if β -mercaptoethanol has a role in the extraction of non-covalently linked Scw4. According to the results, non-covalently linked Scw4 is SDS-extractable regardless of the presence of β -mercaptoethanol which means that the SDS has main role in the extraction of non-covalently linked Scw4. Scw4 is covalently linked most probably by ester linkage because it is NaOH extractable, and unsuccessful extraction with β -mercaptoethanol shows that disulphide bonds doesn't have role in the integration of Scw4 in the cell wall.

Keywords: disulphide bonds, *Saccharomyces cerevisiae*, Scw4

Thesis contains: 28 pages, 9 figures, 24 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 17th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	
1.1.GRAĐA STANIČNE STIJENKE	2
1.2.POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE.....	2
1.3.PROTEINI STANIČNE STIJENKE.....	4
1.3.1. Kovalentno vezani proteini	4
1.3.2. Nekovalentno vezani proteini.....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	
3.1.MATERIJALI	
3.1.1. Kemikalije.....	9
3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj stanica kvasca	9
3.1.3. Sojevi kvasca	10
3.1.4. Plazmid	10
3.2.METODE RADA.....	11
3.2.1. Transformacija kvasca LiAc	11
3.2.2. Uzgoj kvasca za indukciju gena pod kontrolom gal promotora	12
3.2.3. Izolacija stijenki stanica kvasca uporabom BeadBug TM uređaja.....	12
3.2.4. Priprema pufera	13
3.2.5. Tretman stijenki sa Laemmli puferom.....	13
3.2.6. Tretman stijenki sa Laemmli puferom bez β -merkaptetoetanolu	14
3.2.7. Tretman stijenki sa Laemmli puferom bez SDS-a.....	14
3.2.8. NaOH tretman stijenki	15
3.2.9. Tretman stijenki sa Laemmli puferom bez β - merkaptetoetanolu, bez SDS-a i sa NaOH	15
3.2.10. Elektroforetske metode detekcije proteina	17
3.2.11. Western blot.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
5. ZAKLJUČAK	25
6. POPIS LITERATURE	26

1. UVOD

Kvasac *S. cerevisiae* se često koristi kao modelni mikroorganizam u znanstvenim istraživanjima eukariotskih stanica zbog svojih poželjnih karakteristika kao što su kratko generacijsko vrijeme, jednostavan uzgoj u laboratorijskim uvjetima, mogućnost rasta na krutim i tekućim podlogama, veliki broj potomaka te relativno jednostavan i malen genom. Jedna od intenzivno proučavanih komponenata stanice kvasca je njegova stanična stijenka. To je izrazito složena ekstracelularna struktura koja osim stanica kvasca obavija bakterijske stanice, stanice gljiva, algi i viših biljaka. Njezina struktura u kvascu još uvijek nije u potpunosti izučena, a do sada je ustanovljeno da je esencijalna za preživljavanje stanica kvasca i da ima brojne uloge, kao što su zaštita od vanjskih mehaničkih oštećenja, definiranje oblika stanice te uloga u komunikaciji i prepoznavanju među stanicama. Ove karakteristike proizlaze iz njezine dvoslojne građe, pri čemu je unutarnji sloj sastavljen od polisaharida β -1,3-glukana, β -1,6-glukana i hitina, a vanjski od više od 30 do sada identificiranih manoproteina. Uloga proteina stanične stijenke je različita, pa tako neki proteini sudjeluju u procesima flokulacije i aglutinacije, dok drugi imaju strukturnu ulogu. Osim po funkciji proteini se međusobno razlikuju i po načinu na koji se ugrađuju u staničnu stijenk. Dio proteina se u staničnu stijenk ugrađuje kovalentnim, a dio nekovalentnim vezama. Jedan od najzastupljenijih proteina u grupi nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke je protein Scw4 koji pokazuje homologiju sa glukana hidrolazama i transglikozidazama. Način vezanja ovog proteina i njegova točna fiziološka uloga u staničnoj stijenci još nisu u potpunosti poznati. Jedan dio ovog proteina se u stijenk kvasca ugrađuje nekovalentnim interakcijama, pa se tako vezan Scw4 iz stijenki može izolirati pomoću ionskog detergenta SDS-a. Međutim, jedan dio Scw4 se u stijenk veže kovalentno, a iz stijenki se može izolirati pomoću NaOH. Stoga se pretpostavlja da je ovaj način vezanja jednak načinu vezanja proteina PIR porodice, koji se u stijenk vežu esterskom vezom između glukoze β -1,3-glukana i ostatka glutamata koji se u proteinu nalazi unutar karakteristične ponavljajuće sekvence. S obzirom na to da neki autori tvrde da se PIR proteini u stijenk kvasca vežu disulfidnim mostovima, u ovom radu je ispitano imaju li disulfidni mostovi ulogu u ugradnji kovalentno vezane frakcije Scw4 u stijenk te utječe li β -merkaptetanol na ekstrakciju nekovalentno vezanih proteina ili se oni mogu u potpunosti izolirati sa SDS-om. Stoga je provedena ekstrakcija Scw4 proteina iz stijenki SDS-om sa ili bez prisustva β -merkaptetanola, a za ekstrakciju kovalentno vezanih proteina korištena je otopina 30 mM NaOH.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GRAĐA STANIČNE STIJENKE KVASCA

Staničnu stijenkku kvasca karakteriziraju dva kontradiktorna svojstva, čvrstoća i elastičnost. Takve karakteristike stanične stijenske postignute su zahvaljujući postojanju brojnih enzima na njenoj površini kao što su glikozidaze i transglikozidaze koji omogućuju njenu izgradnju, održavanje i remodeliranje. Uloga stijenske u stanicama kvasca je da štiti stanicu od vanjskih mehaničkih oštećenja te joj daje oblik i čvrstoću, odnosno sprječava pucanje stanice izazvano osmotskim tlakom (Teparić i Mrša, 2013). Istovremeno stanična stijenska mora biti podložna strukturnim promjenama tijekom rasta i razmnožavanja (Grbavac i sur., 2017).

Stanična stijenska kvasca čini 10-25% ukupne mase stanica kvasca (Klis i sur., 2006). Mikroskopske analize stanične stijenske pokazale su da se ona sastoji od dva sloja - unutarnjeg debljine 70-100 nm (ovisno o uvjetima rasta i nasljednim svojstvima kvasca) i vanjskog sloja (Klis i sur., 2002). Osnova stanične stijenske su molekule β -1,3-glukana, a na njega se vežu β -1,6-glukan, hitin i brojni manoproteini (Teparić i sur., 2004). Veći udio u građi stanične stijenske zauzimaju polisaharidi, oko 85%, a preostalih 15% čine proteini (Lesage i Bussey, 2006). Udio pojedinih komponenata može se razlikovati ovisno o vrsti kvasca, fazama rasta i stresnim uvjetima (Teparić i Mrša, 2013). Polisaharidi β -1,3-glukan, β -1,6-glukan i hitin čine unutarnji sloj koji osigurava mehaničku stabilnost stanice i daje joj čvrstoću, a manoproteini čine vanjski sloj stanične stijenske. Vanjski sloj stanične stijenske zaslužan je za interakcije među stanicama te za međusobno prepoznavanje stanica (Klis i sur., 2002).

2.2. POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE

β -1,3-glukan je razgranata polimerna molekula koja sadrži otprilike 1500 glukoznih jedinica (Lesage i Bussey, 2006) i čini oko 50% stanične stijenske kvasca (Mrša i sur., 1997). Lanci β -1,3-glukana tvore spiralnu, šuplju i elastičnu strukturu otpornu na rastezanja. Ovisno o uvjetima okoline (npr. izvor ugljika ili faze rasta) kvasci mogu koristiti dva kompleksa β -1,3-glukan sintaza za sintezu β -1,3-glukana. O enzimskom kompleksu koji koriste ovisi stupanj polimerizacije β -1,3-glukana. Kompleksi enzima β -1,3-glukan sintaza sadrže transmembranske proteine Fks1 ili Gsc2/Fks2. Oba proteina važna su za sintezu β -1,3-

glukana. Smatra se da su Fks1 i Gsc2 katalitičke podjedinice enzima. Na mjestima grananja β -1,3-glukana, molekule glukoze povezuju se β -1,6-glikozidnom vezom. U stacionarnoj fazi rasta kvasca lanci β -1,3-glukana sadrže 3-4% bočnih ogranaka β -1,6-glukoze (Klis i sur., 2002). β -1,3-glukan kovalentnim vezama veže ostale komponente stanične stijenke kvasca. Nereducirajući krajevi β -1,3-glukana povezuju se sa reducirajućim krajevima hitina preko β -1,4-glikozidnih veza (Lesage i Bussey, 2006). Struktura β -1,3-glukan može se razoriti primjenom β -1,3-glukanaza (Osumi, 1998).

β -1,6-glukan je izrazito razgranata polisaharidna molekula, topljiva u vodi te građena od glukoznih jedinica povezanih β -1,6-glikozidnim vezama. Za razliku od β -1,3-glukana ovaj polimer je nešto kraći (\approx 130 glukoznih ostataka) i ima amorfnu strukturu (Klis i sur., 2002). Sa β -1,3-glukanom, hitinom i manoproteinima stanične stijenke formira kovalentne veze (Lesage i Bussey, 2006). Udio β -1,6-glukana u staničnoj stijenci kvasca je otprilike 5% (Mrša i sur., 1997).

Hitin je linearna polimerna molekula sastavljena od N-acetilglukozamina povezanih β -1,4-glikozidnim vezama. Molekula hitina sadrži otprilike 100-190 monomernih jedinica. U staničnoj stijenci kvasca oko 40-50% lanaca hitina tvori β -1,4-veze sa nereducirajućim krajevima β -1,3-glukana. Kristalna struktura hitina pruža otpor rastezanju stanične stijenke (Lesage i Bussey, 2006). Sinteza hitina u kvascu *S. cerevisiae* uključuje 3 hitin sintaze i strogo je regulirana (Klis i sur., 2002). Udio hitina u staničnoj stijenci kvasca ovisi o uvjetima uzgoja. U stijenjkama kvasca uzgojenog u laboratorijskim uvjetima udio hitina je 1-3% od ukupnih polisaharida, a prilikom uzgoja kvasca u stresnim uvjetima koji se postižu izlaganjem kvasca osmotskom stresu udio hitina može porasti do 20% (Kapteyn i sur., 1997). Vezanje hitina na β -1,3-glukan smanjuje topljivost i osjetljivost stanične stijenke na djelovanje glukanaza (Teparić i Mrša, 2013).

Manan je polisaharidna molekula koja čini 35% stanične stijenke kvasca (Mrša i sur., 1997). Manozne jedinice se tijekom procesa glikozilacije proteina (O-glikozilacija i N-glikozilacija) vežu za proteine stanične stijenke i tako tvore vanjski sloj koji stijenci ograničava poroznost (Teparić i Mrša, 2013).

2.3. PROTEINI STANIČNE STIJENKE KVASCA

U staničnoj stijenci kvasca do sada je identificirano više od 30 različitih manoproteina (Teparić i sur., 2010). Uloge proteina stanične stijenske su različite. Neki od proteina važni su za komunikaciju stanica kvasca sa okolinom i za međusobno vezanje stanica u procesima flokulacije, aglutinacije ili tijekom formiranja biofilma. Postoje proteini koji pokazuju enzimsku aktivnost i oni koji imaju strukturnu ulogu (Teparić i Mrša, 2013). Proteini stanične stijenske se zbog visokog stupnja sličnosti u slijedu aminokiselina i po njihovoj funkciji mogu podijeliti u nekoliko obitelji (Mrša i sur., 1997; Mrša i Tanner, 1999). Međutim, unutar obitelji pokazalo se da ekspresija proteina može biti različito regulirana, odnosno da imaju sličnu funkciju, ali se eksprimiraju u različitim uvjetima (De Groot i sur., 2005).

Važna razlika među proteinima stanične stijenske je način na koji se oni ugrađuju u stijenku (Teparić i Mrša, 2013). Osnovna podjela proteina stanične stijenske je na proteine vezane kovalentnim (Ccw proteini – covalently linked cell wall proteins) i one vezane nekovalentnim vezama (Scw proteini- soluble cell wall proteins) (Grbavac i sur., 2017).

2.3.1. KOVALENTNO VEZANI PROTEINI

Kovalentno vezani proteini dijele se u dvije grupe. Jedna grupa kovalentno vezanih proteina veže se izravno na β -1,3-glukan esterskom vezom između γ -karboksilnih skupina glutaminske kiseline i hidroksilnih grupa glukoze. Ta skupina proteina naziva se Pir proteini (Proteins with internal repeats). Druga grupa kovalentno vezanih proteini veže se na β -1,3-glukan preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra i β -1,6-glukana (Grbavac i sur., 2017; Teparić i Mrša, 2013).

Pir proteini

Pir proteine karakterizira kratka ponavljajuća sekvenca na N-terminalnom kraju (Mrša i Tanner, 1999). Unutar ponavljajuće sekvence nalazi se glutaminska kiselina čija γ -karboksilna grupa tvori estersku vezu sa hidroksilnim grupama glukoze iz β -1,3-glukana (Teparić i sur., 2010). S obzirom na to da je esterska veza labilna u alkalnim uvjetima (Teparić i Mrša, 2013) Pir proteini mogu se iz stanične stijenske kvasca izolirati djelovanjem 30 mM NaOH (Teparić i sur., 2004). Pir proteini nisu nužni u građi stanične stijenske kvasca, ali posljedica njihovog nedostatka u stijenci je osmotska nestabilnost, povećanje generacijskog vremena, povećana osjetljivost na povišenu temperaturu i morfološke

promjene vidljive u obliku povećanja volumena stanice i rasta stanica nepravilnog oblika u većim nakupinama (Mrša i Tanner, 1999). U Pir proteine kvasca *S. cerevisiae* ubrajamo: Pir1p(Ccw6p), Pir2p (Ccw7p; Hsp150p), Pir3p (Ccw8p), Pir4p (Ccw5p) (Mrša i Tanner, 1999; Teparić i sur., 2010). Osim što je poznato da se Pir proteini u stijenku ugrađuju esterskom vezom između glutaminskog ostatka i glukana stijenke, dio Pir4 (Ccw5) i Pir2 (Hsp150) proteina se prema rezultatima nekih autora u staničnu stijenku kovalentno može ugraditi preko disulfidnih mostova (Jaafar i sur., 2003; Moukadiri i sur., 1999; Moukadiri i Zueco, 2001). Prema Jaafar i sur. (2003) vezanje Pir proteina disulfidnim mostovima na komponente stanične stijenke odvija se preko C-terminalnog kraja proteina gdje se nalaze četiri cisteinska aminokiselinska ostatka. Ovakvi podaci o vezanju Pir proteina disulfidnim mostovima na komponente stanične stijenke kontradiktorni su podacima objavljenim u ostaloj literaturi. Naime, prema Mrša i sur. (1997) Pir proteini se iz stanične stijenke izoliraju samo sa 30 mM NaOH u blago alkalnim uvjetima i otporni su na ekstrakciju sa SDS-om u reducirajućim uvjetima te se vežu preko ponavljajuće sekvence prisutne na N-, a ne na C-terminalnom kraju. Moukadiri i sur. (1999) smatraju da je mogući razlog prisutnosti Pir proteina u β -merkptoetanolnom ekstraktu dobivenom u njihovim eksperimentima redukcija disulfidnih mostova koje proteini tvore u prijelaznom stanju prije izlučivanja proteina iz stanice, prije vezanja proteina na β -1,3-glukan ili tijekom konačne lokalizacije proteina.

GPI-proteini

Proteini koji imaju odgovarajuću sekvencu aminokiselina na C-terminalnom kraju se u endoplazmatskom retikulumu vežu na GPI-sidro (Hamada i sur., 1999). Tako vezani proteini se s vanjske strane citoplazmatske membrane zajedno sa dijelom GPI- sidra vežu na β -1,6-glukan stanične stijenke (De Groot i sur., 2003). Uloga pojedinih proteina GPI obitelji je raznolika. Unutar GPI obitelji proteina postoji podjela na GAS obitelj proteina za koje se smatra da imaju glukan remodelirajuću aktivnost. Jedan od članova GAS obitelji proteina je Gas1p koji djeluje kao glukanoziltransferaza. Gas2p-Gas5p pokazuju homologiju sa Gas1p, ali njihova fiziološka uloga još nije u potpunosti definirana. Egzoglukanaza Exg2p i proteini Crh1p te Crh2p/Utr2p imaju ulogu u unakrsnom povezivanju hitina i glukana (Teparić i sur., 2010).

U proteine vezane preko ostatka GPI-sidra ubraja se i FLO obitelj proteina koji su važni za interakciju među stanicama. Flo1p važan je za flokulaciju, a Aga1p, Aga2p i Sag1p sudjeluju u aglutinaciji. Treća skupina su TIR proteini u koje se ubrajaju Cwp1p, Cwp2p, Dan1p, Dan4p, Tir1p, Tir3p i Tir4p (Teparić i sur., 2010). Za TIR skupinu proteina karakteristično je

da su različito eksprimirani pri anaerobnim uvjetima (Abramova i sur., 2001). Proteini vezani preko ostatka GPI-sidra mogu se iz stanične stijenke izolirati glukanzama (Teparić i sur., 2004).

2.3.2. NEKOVALENTNO VEZANI PROTEINI

Scw proteini (Soluble cell wall proteins) vežu se na β -1,3-glukan nekovalentnim vezama od kojih su najviše zastupljene vodikove veze (Teparić i Mrša, 2013). Uloga većine nekovalentno vezanih proteina još nije u potpunosti objašnjena. Prvi nekovalentno vezani protein izoliran iz stanične stijenke kvasca je Bgl2 (Teparić i sur., 2010). Većina Scw proteina koji su do sada izolirani iz stanične stijenke kvasca pokazuju sličnost sa glukanzama i transglikozidazama u svojoj primarnoj strukturi. Zbog te sličnosti smatra se da imaju ulogu u pregradnji stanične stijenke, u parenju, pupanju te u sporulaciji (Teparić i sur., 2010). Glukan hidrolazna i transglikozidazna aktivnost nekovalentno vezanih proteina do sada nisu dokazane *in vitro* za sve proteine ove skupine (Teparić i Mrša, 2013).

Ovi proteini se iz stanične stijenke izoliraju pomoću vrućeg SDS-a (Teparić i sur., 2004) uz dodatak β -merkaptetanola što upućuje na moguću ulogu disulfidnih mostova u ugradnji Scw proteina u staničnu stijenku kvasca, međutim to još uvijek nije eksperimentalno dokazano. Aga2 (Ccw protein) je jedini protein stanične stijenke za kojeg je eksperimentalno pokazano da sa drugim proteinom (Aga1) tvori disulfidne mostove (Teparić i sur., 2010). Od nekovalentno vezanih proteina Scw4, Scw10 i Bgl2 zaslužni su za čvrstoću stanične stijenke, dok protein Scw11 djeluje antagonistički u odnosu na Scw4, Scw10 i Bgl2. Upravo to omogućuje da stanična stijenka bude čvrsta i otporna na osmotski tlak, dok je s druge strane elastična i podložna promjenama što omogućuje stanicama kvasca rast i razmnožavanje. Nedostatak nekovalentno vezanih proteina, točnije Scw4, Scw10 i Bgl2 dovodi do povećanja stope smrtnosti stanica (Teparić i sur., 2004). Osim navedenih, među nekovalentno vezanim proteinima su i dvije endonukleaze, Eng1 i Eng2 koje su potrebne u procesu dijeljenja stanice. Njihova aktivnost uspješno je pokazana *in vitro* (Baladrón i sur., 2002). U procesu dijeljenja stanica kvasca osim endonukleaza sudjeluje i Scw3 (Cappellaro i sur., 1998). Sljedeća grupa nekovalentno vezanih proteina su egzonukleaze Exg1 i Spr1 koje su prema svojoj funkcionalnoj ulozi slične Exg2 egzonukleazi (GPI-protein) (Larriba i sur., 1995). U treću skupinu ubrajaju se Cts1 i Cts2 koji imaju ulogu tijekom dijeljenja stanice, a Cts2p uključen je i u proces sporulacije (Teparić i sur., 2010).

Scw4 protein

Scw4 protein molekulske mase 67 kDa (Grbavac i sur., 2017) jedan je od proteina za koje se smatra da se nekovalentnim vezama ugrađuje u staničnu stijenku kvasca. Scw4 pokazuje homologiju sa Bgl2 proteinom (Teparić i sur., 2010). Prema Cappellaro i sur. (1998) Scw4 i Bgl2 su 49-56% slični, a 27-29% identični. Osim što pokazuje homologiju sa Bgl2, slijed aminokiselina u Scw4 se 63% poklapa sa slijedom aminokiselina u Scw10 (Teparić i Mrša, 2013).

Scw4 se iz stanične stijenke kvasca može izolirati pomoću vrućeg SDS-a uz dodatak β -merkaptoetanolu, što pokazuje da je nekovalentnim vezama vezan na staničnu stijenku. Međutim, dio Scw4 uspješno je izoliran iz stanične stijenke pomoću 30 mM NaOH. Zbog toga postoji mogućnost da se Scw4 može kovalentno vezati na β -1,3-glukan vezama sličnim kao što je to kod Pir proteina koji se izoliraju djelovanjem NaOH (Teparić i sur., 2007). S obzirom na to da Scw4 protein ne sadrži strukturne elemente koji su potrebni za vezanje na stijenku preko GPI-sidra ni ponavljajuće sekvence koje su karakteristične za vezanje Pir proteina na β -1,3-glukan, pretpostavlja se da postoje neki drugi mehanizmi kojima bi se ovaj protein vezao kovalentno na komponente stanične stijenke kvasca (Grbavac i sur., 2017; Teparić i Mrša, 2013).

Scw4 kao supstrat proteaze Kex2 i jaspinskih proteaza

Scw4 može biti supstrat proteaza koje procesiraju proteine stanične stijenke kvasca. Prema Grbavac i sur. (2017) serinske Kex2 proteaze cijepaju peptidnu vezu u Scw4 isključivo iza dva bazična aminokiselinska ostatka kojima prethode dvije nabijene aminokiseline. Međutim, uspješnost cijepanja ovom serinskom proteazom ovisi i o drugim aminokiselinskim ostacima u molekuli proteina (Bader i sur., 2008). Jaspinske proteaze su aspartatne proteaze koje mogu peptidnu vezu pocijepati na sličan, ali ne tako specifičan način kao Kex2 proteaze (Grbavac i sur., 2017), odnosno one imaju mogućnost cijepanja peptidnih veza iza para bazičnih aminokiselinskih ostataka ili iza samo jednog bazičnog aminokiselinskog ostatka (Olsen i sur., 1999). Prema Grbavac i sur. (2017) jaspinske proteaze nisu u potpunosti efikasne ako protein prethodno nije procesiran sa Kex2 proteazom. Nakon procesiranja Scw4 sa Kex2 proteazom pokazano je da jaspinske proteaze Scw4 protein cijepaju 9 aminokiselinskih ostataka nizvodno od mjesta cijepanja Kex2 proteaza. Uspješnost cijepanja jaspinskih proteaza ovisi o pH vrijednosti. Ove aspartatne proteaze imaju manju efikasnost pri višim pH vrijednostima, osim toga zahtijevaju proteolitičku aktivaciju, a mogu biti aktivirane sa Kex2 proteazama ili autokatalizom. Procesiranje sa Kex2 proteazama ne ovisi o

pH. Nadalje, Scw4 procesiran sa jaspinskim proteazama ima znatno manji potencijal za kovalentno vezanje proteina na komponente stanične stijenke (Grbavac i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- agar, kvaščeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) – Biolife (Milano, Italija)
- glukoza, galaktoza, rafinoza – Difco Laboratories (Detroit, USA)
- brom-fenol plavo – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- amonioseline histidin, uracil, leucin, triptofan – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- Ponceau S, N, N', N'-tetrametiletildiamin (TEMED) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- amonijev persulfat, Triton X-100, β -merkaptometanol i Na-dodecilsulfat (SDS) – Fluka (Buchs, Švicarska)
- anti-HA-antitijela – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- ECL-otopine za razvijanje blota, standardi za proteinsku elektroforezu – Santa Cruz Biotechnology (Dallas, SAD)
- Litij acetat (LiAc) – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj stanica kvasca

Za uzgoj kvasca korištene su YNB kompletna i selektivna podloga. Podloge se pripreme dodatkom 6,7 g/L YNB-AA/AS i 1,6 g/L smjese aminokiselina („drop out“) koja sadrži sve aminokiseline i nukleotide osim histidina, leucina, uracila i triptofana. U kompletnu hranjivu podlogu naknadno se dodaju sve navedene aminokiseline koje nedostaju u „drop out“ smjesi, a u selektivnu Ura⁻ podlogu dodaju se aminokiseline histidin, leucin i triptofan. Kao izvor ugljika koriste se 50%-tna otopina glukoze, 20%-tna otopina galaktoze i 20%-tna otopina rafinoze. Odgovarajući šećer dodaje se u podlogu prije nacjepljivanja u 2%-tnoj koncentraciji. Nakon pripreme, podloge i otopine šećera sterilizirane su autoklaviranjem na 121°C, 40 minuta pri tlaku od 1atm. Krute hranjive podloge istog su sastava kao i tekuće uz dodatak 15 g/L agara.

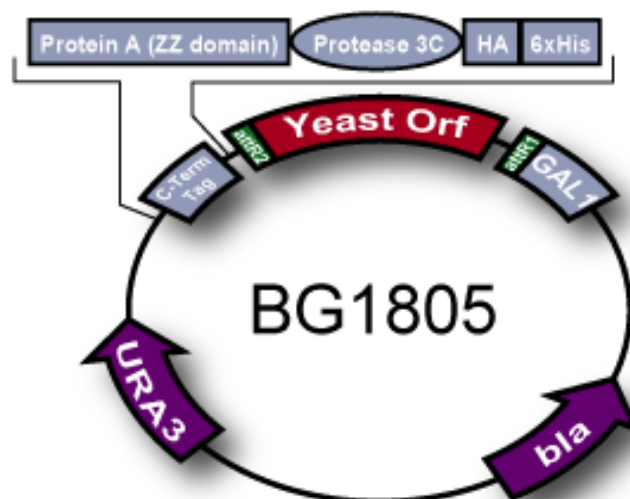
3.1.3. Sojevi kvasca

Korišteni sojevi kvasca su:

- *Saccharomyces cerevisiae* Y000 wt Mat a, *his3Δ*, *leu2Δ*, *met15Δ*, *ura3Δ*
- *Sacharomyces cerevisiae* Y000 pBG1805 *SCW4*

3.1.4. Plazmid

Divlji tip kvasca *S. cerevisiae* Y000 wt transformiran je sa plazmidom pBG1805 *SCW4*. pBG1805 *SCW4* (Slika 1.) plazmid sadži *ori* ishodište replikacije koje u *E. coli* omogućava samostalnu replikaciju plazmida u bakterijskoj stanici, gen *bla* i gen *URA3*. Geni *bla* i *URA3* važni su za selekciju transformiranih stanica. Transformirane bakterijske stanice selekcioniraju se na selektivnoj LB podlozi sa ampicilinom zahvaljujući genu *bla* koji kodira za β-laktamazu koja cijepanjem β-laktamskog prstena omogućava preživljavanje bakterija na podlozi sa ampicilinom. Za selekciju transformiranih stanica kvasca na YNB Ura⁻ selektivnoj podlozi ključan je gen *URA3* koji kodira za enzim iz biosintetskog puta za uracil. *SCW4* gen na plazmidu pBG1805 *SCW4* je pod kontrolom *GAL* promotora što znači da se dodatkom galaktoze u podlogu potiče njegova transkripcija. Detekciju proteina specifičnim antitijelima omogućavaju -HA i -6xHis sekvence koje se nalaze u dijelu gena *SCW4* koji kodira za C-terminalni kraj proteina.



Slika 1. pBG1805 plazmid sa *SCW4* genom

(<http://dharmacon.gelifesciences.com> Pristupljeno 1. srpnja 2017.)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Transformacija kvasca LiAc

Za transformaciju kvasca potrebno je kvasac uzgojiti na kompletnoj YNB krutoj podlozi do log faze rasta. Stanice kvasca soja Y000 wt uzgojene na krutoj kompletnoj YNB podlozi preko noći na 30°C precijepljene su u 10 mL kompletne tekuće YNB hranjive podloge uz 2% glukoze. Uzgoj u tekućoj hranjivoj podlozi proveden je na tresilici preko noći na 30°C. Stanice kvasca koje su preko noći ušle u stacionarnu fazu su ujutro precijepljene u 10 mL nove kompletne tekuće YNB hranjive podloge uz 2% glukoze i ponovo stavljene na tresilicu 3,5 sata na 30°C kako bi došle u log fazu rasta. Hranjiva podloga odvojena je od stanica kvasca centrifugiranjem 4 minute na 3000 rpm. Talog je ispran u 5 mL TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5-8,0) i ponovno centrifugiran pri istim uvjetima. Nakon ispiranja talog se resuspendira u TE puferu tako da OD₆₀₀ bude 50-60. Potreban volumen pufera se izračuna pomoću formule:

$$V(\text{TE pufer}) = \frac{\text{izmjereni } OD_{600} \times \text{mL kvasca (iz uzgoja)}}{60}$$

Izračunati volumen TE pufera potrebno je prije dodavanja umanjiti za volumen koji približno zauzima kvasac (10%). Nakon toga stanicama kvasca dodan je 0,2 M LiAc u količini jednakoj izračunatom volumenu TE pufera i sve zajedno inkubirano je na temperaturi od 30°C, 60 minuta na tresilici. Nakon toga 100 µL suspenzije kvasca prebaci se u eppendorficu i sterilno se doda 5 µL plazmidne DNA te se inkubira 30 minuta na 30°C bez miješanja.

Eppendorfica se lagano vortexira i doda se 145 µL 60%-tnog PEGa. Nakon dodatka PEGa sadržaj eppendorfice snažno je vortexiran i inkubiran 60 minuta na 30°C u termobloku, bez miješanja. S ciljem postizanja temperaturnog šoka nakon 60 minuta na suspenziju stanica doda se 1 mL hladne, sterilne vode. Ponovi se centrifugiranje, talog se ispiru u 1 mL vode i resuspendira u 120 µL sterilne vode te se nacijepi na selektivnu Ura⁻ podlogu sa 2% glukoze.

3.2.2. Uzgoj kvasca za indukciju gena pod kontrolom GAL promotora

Nakon transformacije i uzgoja transformanata na krutoj selektivnoj hranjivoj podlozi bez uracila uz 2% glukoze u termostatu na 30°C, kolonije su nacijepnjene u 5 mL selektivnog medija sa 2% rafinoze. Uzgoj na rafinozi proveden je na tresilici pri temperaturi od 30°C. Preko noći stanice kvasca dođu u stacionarnu fazu rasta. 0,5 mL prekonoćne kulture prebaci se u 5 mL selektivnog medija sa 2% rafinoze i inkubira na 30°C na tresilici oko 4 sata da stanice kvasca naprave još dvije generacije. Kada kvasac naraste tako da OD₆₀₀ bude otprilike 2 svih 5mL uzgojenog kvasca prebaci se u 45 mL selektivnog medija sa 2% galaktoze i 0,1% rafinoze. Uzgoj traje preko noći na 30°C na tresilici tako da konačni OD₆₀₀ bude 1,5-4 jedinice/mL.

3.2.3. Izolacija stijenki stanica kvasca uporabom BeadBug TM uređaja

Nakon uzgoja kvasca stanice se odvoje od hranjive podloge centrifugiranjem 5 minuta na 3000 rpm. Stanice (talog) isprane su dva puta u 25 mL destilirane vode i jednom u 50 mM K-fosfatnom puferu (16,51 g/L K₂HPO₄, 0,708 g/L KH₂PO₄) pH 8,0. Prilikom ispiranja važno je dobro resuspendirati talog u vodi odnosno puferu. Nakon ispiranja stanice su resuspendirane u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 8,0 na gustoću od 60-75 OD jedinica/ml (Vpufer=200 µL) i prebačene u dvomilimetarske eppendorfice sa čepom koji ima navoje, te im je dodan ekvivalentan volumen staklenih kuglica promjera 0,5 mm. Razbijanje stanica provodi se na BeadBugTM uređaju pri brzini od 4000 rpm tijekom 3 minute. Postupak razbijanja stanica na BeadBugTM uređaju sa staklenim kuglicama ponovljen je dva puta. Između dva intervala razbijanja suspenzija stanica kvasca ohladi se na ledu. Uzorak je prebačen u 1,5 mL eppendorfice čije je dno probušeno užarenom iglom kako bi suspenzija stanica iscurila u novu eppendorficu. Staklene kuglice odvoje se od suspenzije stanica centrifugiranjem 1 minutu pri 8000 rpm. Stijenke su nakon toga ispirane 3 puta sa 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH 8,0.

3.2.4. Priprema pufera

Laemmli pufer

- 6 g/L TRIS-a (pH 6,8), 0,76 g/L g EDTA, 20 g/L SDS-a, 5% β -merkaptetoetanol

Laemmli pufer bez β -merkaptetoetanol

6 g/L TRIS-a (pH 6,8), 0,76 g/L EDTA, 20 g/L SDS-a

Laemmli pufer bez SDS-a

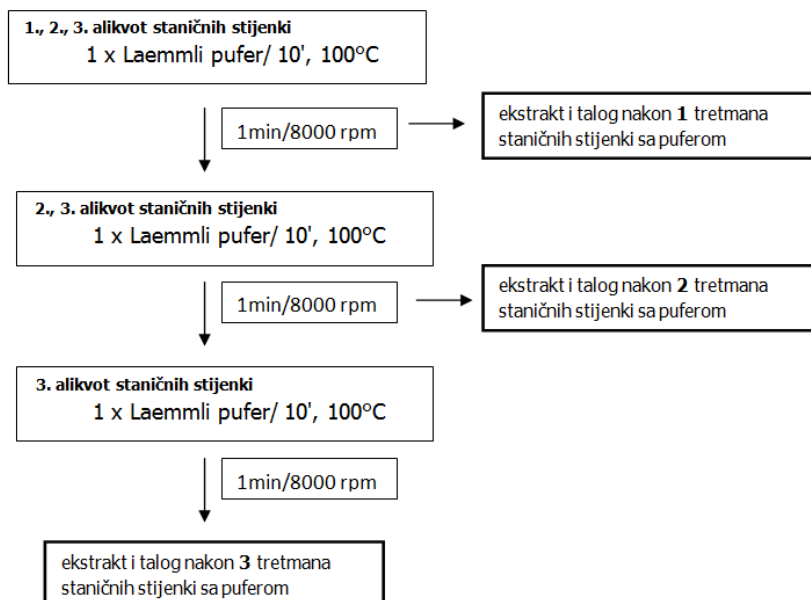
- 6 g/L TRIS-a (pH 6,8), 0,76 g/L EDTA, 5% mL β -merkaptetoetanol

Laemmli pufer za uzorke (5x konc)

- 30 g/L TRIS-a (pH 6,8), 3,8 g/L EDTA III, 100 g/L SDS-a, 25% β -merkaptetoetanol i 40% glicerol.

3.2.5. Tretman stijenki sa Laemmli puferom

Za tretman staničnih stijenki sa Laemmli puferom (sastav u poglavlju 3.2.4.) potrebna su 3 alikvota stijenki kvasca. Talogu staničnih stijenki kvasca dodan je 1 mL Laemmli pufera i uzorak je prokuhan u vrućoj vodenoj kupelji 10 minuta. Stijenke se odvoje od ekstrakta centrifugiranjem na 8000 rpm, 1 minutu. Ekstrakt nakon prvog kuhanja iz jednog alikvota se sačuva, a preostala dva ekstrakta se bacaju. Stanične stijenke ispiru se četiri puta u 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH 8,0 i jednom sa destiliranom vodom. Stijenke iz jednog alikvota nakon prvog kuhanja sa Laemmli puferom su sačuvane, a uzorcima u preostale dvije eppendorfice ponovo je dodan 1 mL Laemmli pufera i ponovljen je postupak kuhanja u vrućoj vodenoj kupelji 10 minuta. Sačuvan je ekstrakt iz drugog alikvota, tj. ekstrakt nakon drugog kuhanja. Stijenke su ponovno isprane 4x sa 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8,0 i jednom sa destiliranom vodom. Stijenke nakon drugog kuhanja sa Laemmli puferom su sačuvane, a zadnji alikvot stijenki ponovno je tretiran sa 1 mL Laemmli pufera 10 minuta u vrućoj vodenoj kupelji. Ekstrakt nakon trećeg kuhanja se sačuva, a stijenke se isperu 4x sa 50 mM K-fosfatnim puferom i jednom sa destiliranom vodom (Slika 2.). Svi ekstrakti zamrznuti su do daljnjeg korištenja, odnosno do SDS-elektroforeze, a stijenke su ekstrahirane sa NaOH.



Slika 2. Shematski prikaz izolacije proteina iz staničnih stijenki kvasca sa Laemmli puferom

3.2.6. Tretman stijenki sa Laemmli puferom bez β -merkaptetanola

U svaku od tri alikvota stijenki kvasca dodan je po 1 mL Laemmli pufera bez β -merkaptetanola (sastav u poglavlju 3.2.4) i ponovljen je tretman na isti način kao što je opisano u poglavlju 3.2.5. (Slika 2.). Dobiveni su SDS ekstrakti i talog stijenki nakon prvog, drugog i trećeg tretmana sa Laemmi puferom bez β -merkaptetanola.

3.2.7. Tretman stijenki sa Laemmli puferom bez SDS-a

Tri alikvota stijenki kvasca tretirana su sa Laemmli puferom bez SDS-a (sastav u poglavlju 3.2.4.) kao što je opisano u poglavlju 3.2.5 (Slika 2.). Dobiveni su β -merkaptetanolni ekstrakti i talog stijenki nakon prvog, drugog i trećeg tretmana sa Laemmli puferom bez SDS-a.

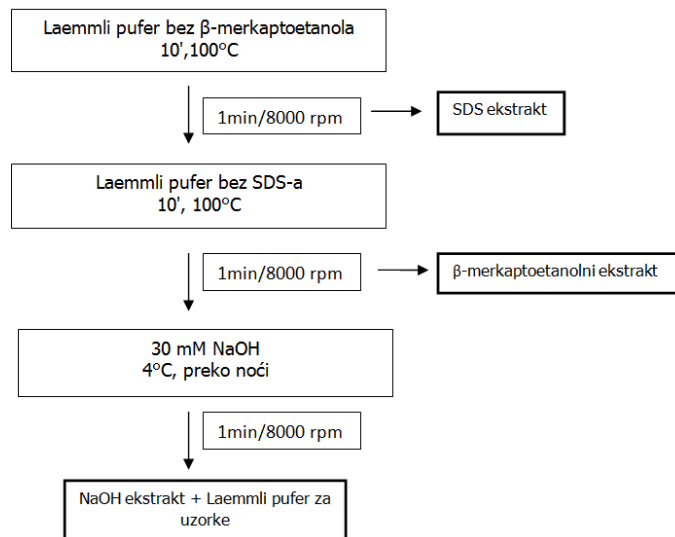
3.2.8. NaOH tretman stijenki

Nakon ispiranja staničnih stijenki sa 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8,0, stijenke se isperu sa destiliranom vodom i resuspendiraju u 50 μ L 30 mM NaOH. Suspenzija se inkubira preko noći na 4°C. Nakon inkubacije taloga preko noći u NaOH stijenke se odvoje od ekstrakta centrifugiranjem 5 minuta na 8000 rpm. Na 50 μ L ekstrakta doda se 13 μ L pufera za uzorke (sastav u poglavlju 3.2.4.) i zamrzne se do daljnjeg korištenja.

3.2.9. Tretman stijenki sa Laemmli puferom bez β -merkaptetoetanolu, Laemmli puferom bez SDS-a i sa NaOH

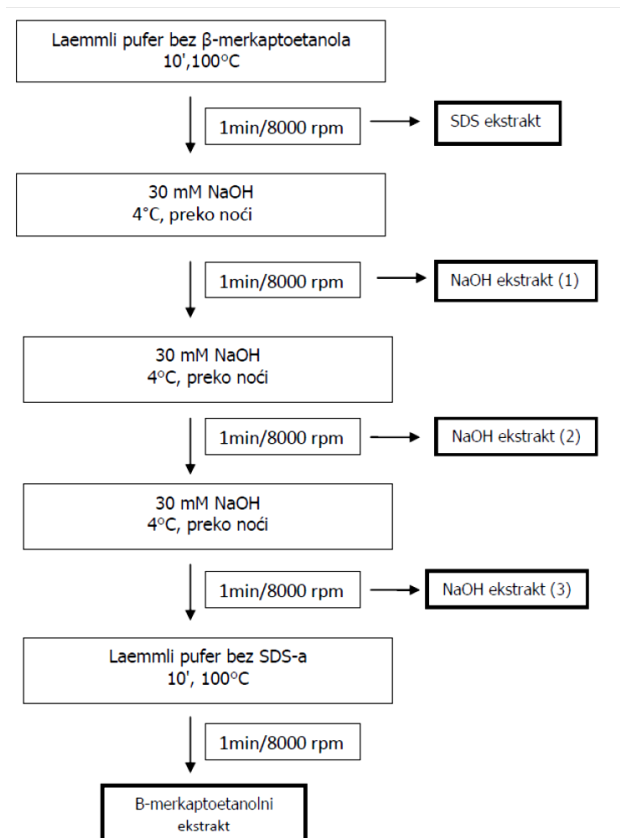
Dva alikvota staničnih stijenki uzastopno su tretirana sa Laemmli puferima bez β -merkaptetoetanolu, bez SDS-a i sa NaOH u još dvije različite kombinacije tj. različitim redoslijedom. Za jedan od uzoraka prvo je korišten Laemmli pufer bez β -merkaptetoetanolu, pa Laemmli pufer bez SDS-a i na kraju NaOH, a u drugom uzorku nakon ekstrakcije sa Laemmli puferom bez β -merkaptetoetanolu slijedi višestruka ekstrakcija sa NaOH i na kraju ekstrakcija sa Laemmli puferom bez SDS-a.

Jedan uzorak staničnih stijenki prokuhan je 10 minuta u 1mL Laemmli pufera bez β -merkaptetoetanolu (sastav u poglavlju 3.2.4.) . Nakon centrifugiranja 1 minutu pri 8000 rpm supernatant odnosno SDS-ekstrakt je sačuvan, a talog je 4 puta ispiran sa 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8,0 i jednom sa destiliranom vodom. Nakon toga talog je resuspendiran u 1 mL Laemmli pufera bez SDS-a (sastav u poglavlju 3.2.4.) i ponovno prokuhan 10 minuta na 100°C. Dobiveni β -merkaptetoetanolni-ekstrakt je sačuvan, a talog je ponovno ispiran četiri puta sa 50 mM K- fosfatnim puferom i destiliranom vodom. Talog staničnih stijenki resuspendiran je u 50 μ L 30 mM NaOH i inkubiran preko noći na 4°C. Uzorak je centrifugiran i NaOH-ekstrakt je sačuvan. Svim ekstraktima dodan je Laemmli pufer za uzorke (sastav u poglavlju 3.2.4.) (Slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz izolacije proteina iz staničnih stijenki korištenjem Laemmli pufera bez β -merkaptotetanol, bez SDS-a i 30 mM NaOH

Drugi uzorak stijenki kuhan je 10 minuta u 1 mL Laemmli pufera bez β -merkaptotetanol (sastav u poglavlju 3.2.4.), nakon toga uzorak je centrifugiran 1 minutu na 8000 rpm i SDS ekstrakt je sačuvan, a talog je ispiran četiri puta sa 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8,0 i jednom sa destiliranom vodom. Preostali talog se resuspendira u 50 μ L 30 mM NaOH i inkubira preko noći na 4°C. Uzorak se centrifugira 5 minuta na 8000 rpm da se stijenke odvoje od ekstrakta. 50 μ L NaOH ekstrakta prebačeno je u drugu eppendorficu i dodano je 13 μ L Laemmli pufera za uzorke (sastav u poglavlju 3.2.4.). Resuspendiranje taloga u 50 μ L 30 mM NaOH i inkubiranje preko noći na 4°C ponovljeno je još dva puta. Na taj način dobivena su tri NaOH ekstrakta (nakon jednog, dva i tri uzastopna tretmana sa 30 mM NaOH). Sljedeći korak je resuspendiranje tako ekstrahiranih stijenki u Laemmli puferu bez SDS-a (sastav u poglavlju 3.2.4.) i kuhanje 10 minuta na 100°C. Nakon kuhanja β -merkaptotetanolni ekstrakt, kao i prethodno sačuvani SDS ekstrakt i tri NaOH ekstrakta se zamrznu do daljnjeg korištenja, a stijenke se bacaju (Slika 4.).



Slika 4. Shematski prikaz izolacije proteina iz stanične stijenke kvasca sa Laemmli puferom bez β -merkaptetanola, trostrukim inkubiranjem u 30 mM NaOH i sa Laemmli puferom bez SDS-a.

3.2.10. Elektroforetske metode detekcije proteina

Proteini izolirani iz stanične stijenke kvasca razdvojeni su SDS-elektroforezom. Nakon izolacije proteina i tretmana sa Laemmli puferima uzorci su čuvani u Laemmli puferu za uzorke (sastav u poglavlju 3.2.4.) i zamrznuti do daljnjeg korištenja. Prije nanošenja uzoraka na poliakrilamidni gel potrebno je uzorke u potpunosti odmrznuti. Također, važno je da se NaOH ekstrakti prokuhaju 2 minute u puferu za uzorke prije nanošenja na poliakrilamidni gel. Za SDS- elektroforezu korišten je 12%-tni poliakrilamidni gel koji se sastoji od gornjeg gela ili gela za sabijanje i donjeg gela, gela za razdvajanje proteina. Sastav 4%-tnog gela za sabijanje je: 4,5% akrilamida, 0,12% N, N'-metilenbisakrilamida, 0,1% SDS-a, 0,075% N, N, N', N', - tetrametildiamina (TEMED), 7,5% amonij persulfata (APS) u Tris- HCl puferu za donji gel (136,4 g/L TRIS-a, 3 g/L SDS-a, pH 8,8). Nakon nanošenja donjeg gela između dva stakla da bi gel polimerizirao na vrh je dodan izopropanol da se osigura ravnomjerna polimerizacija na površini donjeg gela. Nakon 45 minuta koliko je potrebno da donji gel

polimerizira pomoću filter papira uklonjen je izopropanol i dodan je gornji gel koji polimerizira oko 30 minuta. Sastav 12%-tnog gela za razdvajanje je: 12% akrilamida, 0,3% N, N' – metilenbisakrilamida, 0,3% SDS-a, 0,06% N, N, N', N'- tetrametilendiamina (TEMED) i 6% amonij persulfata (APS) u TRIS- HCl puferu za gornji gel (16,8 g/L TRIS-a, 1,1 g/L SDS-a, pH 6,8). Prilikom pripreme gornjeg i donjeg gela APS i TEMED dodaju se neposredno prije stavljanja gela između dva stakla. U kadicu za elektroforezu doda se 10x razrijeđeni pufer za SDS- elektroforezu pripremljen otapanjem 30 g/L TRIS-a, 144 g/L glicina i 10 g/L SDS-a u destiliranoj vodi. Elektroforeza se provodi na 200 V u vremenu od 90 minuta.

3.2.11. Western blot

Nakon SDS-elektroforeze gel je prebačen u „sendvič“ za blot. Unutar „sendviča“ za blot redom se slažu spužva, dva filter papira, nitroceluloza, gel, dva filter papira i spužva. Sve zajedno stavljeno je u rešetkasti okvir i nakon toga u kadicu za blot koja je napunjena karbonatnim puferom (1 g/L natrijeva hidrogenkarbonata, 0,33 g/L natrijeva karbonata, 20% metanola). Priprema „sendviča“ radi se u kadici sa destiliranom vodom da u „sendviču“ za blot ne bi bilo mjehurića zraka. Rešetkasti okvir stavlja se u kadicu za elektroforezu tako da je gel okrenut prema negativnoj, a nitroceluloza prema pozitivnoj elektrodi. Kadica sa karbonatnim puferom u kojem se odvija Western blot stavljena je na magnetnu miješalicu i pufer je miješan tijekom transfera. Transfer proteina sa gela na membranu provodi se na 400 mA sat vremena.

Nakon transfera nitroceluloza se boja sa Ponceau S (0,1 g Ponceau S u 100 mL 5%-tne octene kiseline) bojom do pojave bendova. Boja se ispere sa destiliranom vodom, a vidljivi standardi označe se na membrani tupom grafitnom olovkom. Membrana je inkubirana preko noći na +4°C u 10 mL pufera za blokiranje (6 g/L TRIS-a, 8,8 g/L natrijeva klorida, 0,1 % TRITON X-100, pH 7,5) sa 1% obranog mlijeka u frižideru. Sljedeći korak je dodavanje 5 mL svježeg pufera za blokiranje i 3 µL anti-HA i inkubacija 60-90 minuta na tresilici na sobnoj temperaturi. Nitroceluloza je isprana 3 puta u vremenu 5-10 minuta sa puferom za blokiranje. Pomoću ECL otopina za detekciju antitijela razvije se slika. Na nitrocelulozu se nanese 1 mL ECL otopine za razvijanje, a fluorescencija se zabilježi na RTG-filmu koji je eksponiran preko noći ili barem 3 sata.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Do sada je poznato da se protein Scw4 u stijenku kvasca *S. cerevisiae* ugrađuje nekovalentnim vezama koje se kidaju pomoću SDS-a, ali i da postoji mogućnost njegove kovalentne ugradnje, pri čemu je način vezanja sličan onom kojim se u stijenku kovalentno vežu proteini Pir porodice. Pir proteine karakterizira ponavljajuća sekvenca koja u svom sastavu sadrži ostatak glutaminske kiseline preko kojeg se proteini esterskom vezom vežu na hidroksilne skupine glukoze u β -1,3-glukanu. Esterska veza između glutamata i glukana je nestabilna u alkalnim uvjetima pa se zbog toga Pir proteini izoliraju iz stijenke sa 30 mM NaOH. S obzirom na to da neki autori tvrde da se Pir proteini u stijenku ugrađuju disulfidnim mostovima (Jaafar i sur., 2003; Moukadiri i Zueco, 2001; Moukadiri i sur., 1999) cilj eksperimentalnog dijela ovog rada je utvrditi imaju li disulfidni mostovi ulogu u ugradnji Scw4 proteina u staničnu stijenku kvasca.

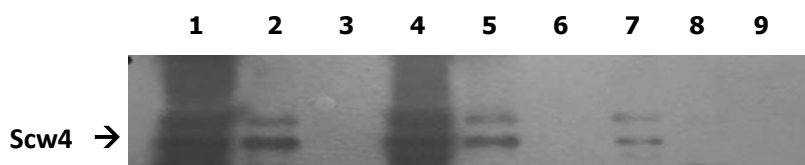
Za provođenje eksperimentalnog dijela ovog rada soj kvasca Y000 wt transformiran je sa plazmidom pBG1805 *SCW4*. Na kraj gena *SCW4* koji kodira za C-terminalni dio proteina Scw4 dodana je -HA oznaka koja omogućava specifično obilježavanje proteina sa antitijelima i njegovu detekciju Western blot metodom. S obzirom na to da je *SCW4* gen na plazmidu pod kontrolom *GAL* promotora uzgoj stanica nakon transformacije provodio se na podlogama sa galaktozom. Selekcija transformanata na YNB selektivnoj Ura⁻ podlozi moguća je zbog *URA3* gena koji kodira za enzim iz biosintetskog puta za uracil i nalazi se na plazmidu korištenom za transformaciju.

Stanične stijenke kvasca izolirane su iz uzgojenih transformiranih stanica uporabom BeadBugTM uređaja. Izolirane stijenke su tretirane Laemmli puferima različitog sastava. Korištena su tri različita Laemmli pufera i to pufer koji sadrži i SDS i β -merkaptetanol, pufer bez β -merkaptetanola i pufer bez SDS-a. Puferima koji u svom sastavu sadrže SDS može se izolirati frakcija nekovalentno vezanog Scw4. Pufer sa β -merkaptetanolom, koji reducira disulfidne mostove, korišten je za ekstrakciju proteina iz stijenki kako bi provjerili imaju li disulfidni mostovi ulogu u ugradnji Scw4 u staničnu stijenku.

Stanične stijenke kvasca su kuhane tri puta po 10 minuta sa svakim od navedenih Laemmli pufera. Između kuhanja stijenke su ispirane 50 mM K-fosfatnim puferom pH 8 i vodom kao što je detaljno opisano u poglavlju Materijali i Metode. Nakon svakog kuhanja u Laemmli puferima sačuvan je po jedan ekstrakt za SDS-elektroforezu i jedan talog stijenki za tretman

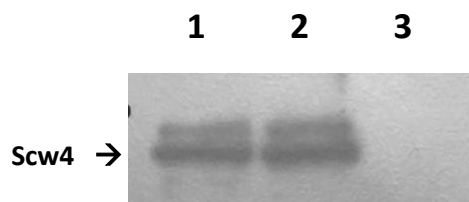
sa NaOH. Proteini u dobivenim ekstraktima razdvojeni su SDS-elektroforezom, a detektirani vezanjem antitijela na –HA oznaku Western blot metodom.

Korištenjem Laemmli pufera sa SDS-om i β -merkaptotanolom ili samo sa SDS-om sav Scw4 vezan nekovalentnim interakcijama uspješno je izoliran u prva dva kuhanja (Slika 5.). U jažicama 1, 2 i 3 nalaze se SDS/ β -merkaptotanolni ekstrakti nakon prve, druge i treće ekstrakcije. Nakon prve ekstrakcije (uzorak 1) na filmu su vidljive vrpce najjačeg intenziteta što znači da je izolirana najveća količina proteina. Drugom ekstrakcijom (uzorak 2) vrpce su slabijeg intenziteta, odnosno izolirana količina proteina je manja nego u prvoj ekstrakciji, a nakon treće ekstrakcije (uzorak 3) nema izoliranih proteina. U jažicama 4, 5 i 6 u koje su stavljeni SDS ekstrakti nakon, prve, druge i treće ekstrakcije također je najviše proteina izolirano prvim kuhanjem (uzorak 4), malo manje drugim (uzorak 5), a nakon trećeg kuhanja (uzorak 6) u Laemmli puferu sa SDS-om proteini više nisu prisutni. Proteinske vrpce u uzorcima 1-6 sličnog su intenziteta što ukazuje na to da se većina nekovalentno vezane frakcije Scw4 izolira sa SDS-om. U uzorcima u kojima je korišten samo β -merkaptotanol mala količina Scw4 je izoliran prvim kuhanjem (uzorak 7), dok se drugim i trećim kuhanjem (uzorci 8 i 9) nije uspjelo izolirati više Scw4. Na prva dva načina, u kojima je ekstrakcija proteina provedena sa SDS-om (uzorci 1-6), izolirana je znatno veća količina Scw4 nego ekstrakcijom bez SDS-a. Takvi rezultati upućuju na to da glavnu ulogu u izolaciji nekovalentno vezane frakcije Scw4 ima SDS jer je količina izoliranog proteina u uzorcima 1-6, u kojima je SDS korišten, slična te da je uloga β -merkaptotanola u ekstrakciji nekovalentno vezane frakcije Scw4 zanemariva.



Slika 5. Analiza proteina u 10 μ L SDS/ β -merkaptotanolnog ekstrakta, SDS ekstrakta i β -merkaptotanolnog ekstrakta Western blot metodom. Proteini u uzorcima su detektirani antitijelima na -HA oznaku. Uzorci: **1.** SDS/ β -merkaptotanolni ekstrakt nakon prve ekstrakcije; **2.** SDS/ β -merkaptotanolni ekstrakt nakon druge ekstrakcije; **3.** SDS/ β -merkaptotanolni ekstrakt nakon treće ekstrakcije; **4.** SDS ekstrakt nakon prve ekstrakcije; **5.** SDS ekstrakt nakon druge ekstrakcije; **6.** SDS ekstrakt nakon treće ekstrakcije; **7.** β -merkaptotanolni ekstrakt nakon prve ekstrakcije; **8.** β -merkaptotanolni ekstrakt nakon druge ekstrakcije; **9.** β -merkaptotanolni ekstrakt nakon treće ekstrakcije.

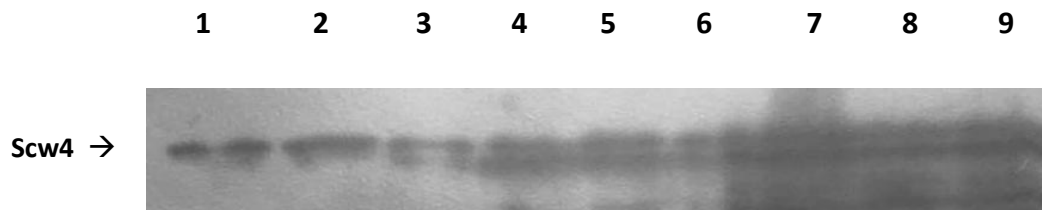
Zbog visoke koncentracije proteina u uzorcima 1 i 4 (Slika 5.) i jakog intenziteta proteinskih vrpce koje zbog toga nisu jasno vidljive, razdvajanje proteina SDS-elektroforezom ponovljeno je sa manjim volumenom ovih uzoraka (5 μ L) i nakon toga detekcijom sa antitijelima na –HA oznaku dobiveni su rezultati prikazani na slici 6. U uzorcima 1 i 2, u kojima se nalaze SDS/ β -merkaptotanolni ekstrakt i SDS ekstrakt nakon prve ekstrakcije, jasno su vidljive vrpce Scw4, a u uzorku 3 u kojem je β -merkaptotanolni ekstrakt nakon prve ekstrakcije nema detektiranih proteina (Slika 6.).



Slika 6. Analiza proteina u 5 μ L SDS/ β -merkaptotanolnog ekstrakta, SDS ekstrakta i β -merkaptotanolnog ekstrakta Western blot metodom nakon prve ekstrakcije. Proteini u uzorcima su detektirani antitijelima na –HA oznaku. Uzorci: **1.** SDS/ β –merkaptotanolni ekstrakt nakon prve ekstrakcije; **2.** SDS ekstrakt nakon prve ekstrakcije; **3.** β –merkaptotanolni ekstrakt nakon prve ekstrakcije.

S obzirom na to da sa manjom količinom uzorka nakon prvog tretmana sa β -merkaptotanolom (Slika 6., uzorak 3) nisu vidljive proteinske vrpce, odnosno da je koncentracija proteina u β -merkaptotanolnom ekstraktu toliko niska da ih nije moguće detektirati, može se pretpostaviti da pojava proteinske vrpce u uzorku 7 na slici 5. nije posljedica djelovanja β -merkaptotanola, nego ekstrakcije manje količine nekovalentno vezanih proteina uslijed denaturirajućih uvjeta tijekom ekstrakcije.

Nakon ekstrakcije proteina sa Laemmli puferima stijenke su tretirane sa 30 mM NaOH koji se koristi za ekstrakciju kovalentno vezanih proteina. Njegovim korištenjem nakon ekstrakcije stijenki sa Laemmli puferima želimo vidjeti utječe li različiti sastav prethodno korištenih pufera na izolaciju kovalentno vezanog Scw4. Postupak inkubacije u NaOH proveden je na način koji je detaljno opisan u poglavlju Materijali i Metode.

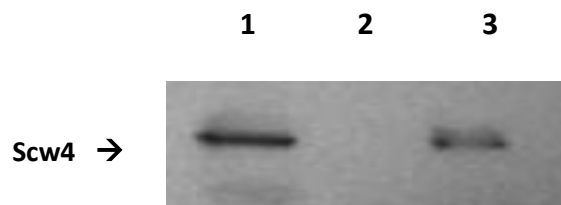


Slika 7. Analiza proteina u NaOH ekstraktu proteina stijenki Western blot metodom. Proteini u uzorcima su detektirani antitijelima na –HA oznaku. Uzorci: **1.** NaOH ekstrakt nakon prethodnog tretmana stijenki smjesom SDS/ β -merkaptioetanol (1x); **2.** NaOH ekstrakt nakon prethodnog tretmana stijenki smjesom SDS/ β -merkaptioetanol (2x); **3.** NaOH ekstrakt nakon prethodnog tretmana stijenki smjesom SDS/ β -merkaptioetanol (3x); **4.** NaOH ekstrakt nakon prethodnog tretmana stijenki SDS-om (1x); **5.** NaOH ekstrakt nakon prethodnog tretmana stijenki SDS-om (2x); **6.** NaOH ekstrakt nakon prethodnog tretmana stijenki SDS-om (3x); **7.** NaOH ekstrakt nakon prethodnog tretmana stijenki β -merkaptioetanolom (1x); **8.** NaOH ekstrakt nakon prethodnog tretmana stijenki β -merkaptioetanolom (2x); **9.** NaOH ekstrakt nakon prethodnog tretmana stijenki β -merkaptioetanolom (3x).

U NaOH ekstraktima stijenki iz kojih je prethodno nekovalentno vezana frakcija Scw4 uklonjena smjesom SDS/ β -merkaptioetanol ili samo SDS-om intenzitet vrpce kovalentno vezane frakcije Scw4 je podjednak, što znači da je količina izoliranih proteina slična (Slika 7., uzorak 1-6). U NaOH ekstraktima stijenki koje su prethodno tretirane samo β -merkaptioetanolom (uzorci 7, 8 i 9), pa nekovalentno vezana frakcija Scw4 proteina nije uspješno uklonjena (slika 5., uzorci 7-9), količina izoliranih proteina je puno veća od količine u uzorcima u kojima je za uklanjanje nekovalentno vezane frakcije Scw4 korištena smjesa SDS-a i β -merkaptioetanol ili samo SDS. Ovakvi rezultati potvrđuju da u izolaciji nekovalentno vezane frakcije proteina iz stijenke glavnu ulogu ima SDS, te da korištenjem samo β -merkaptioetanol proteini nisu uspješno izolirani, što znači da disulfidni mostovi ne sudjeluju u ugradnji proteina Scw4 u staničnu stijenku kvasca. Rezultati dobiveni NaOH ekstrakcijom nakon ekstrakcije proteina Laemmli puferima sa/bez SDS-a, odnosno sa/bez β -merkaptioetanol (Slika 7.), pokazuju da efikasnost uklanjanja nekovalentno vezanog Scw4 prije izolacije kovalentno vezane frakcije Scw4 pomoću NaOH utječe na količinu proteina koji se mogu izolirati sa NaOH. Takav rezultat može se objasniti zaostajanjem dijela nekovalentno vezanog Scw4 u stijenka nakon nepotpune ekstrakcije SDS-om, koji se onda ekstrahira iz stijenki djelovanjem NaOH zajedno sa kovalentno vezanom frakcijom. Međutim, dva

uzastopna tretmana sa puferom koji sadrži SDS su dovoljna da se ukloni sav nekovalentno vezani Scw4 iz stijenki.

Kako bi se dodatno potvrdilo da β -merkaptetanol nema ulogu u ekstrakciji nekovalentno vezane frakcije Scw4 i da disulfidni mostovi ne sudjeluju u ugradnji Scw4 u stijenku proveden je eksperiment u kojem su stanične stijenke tretirane Laemmli puferom bez β -merkaptetanola, pa zatim Laemmli puferom bez SDS-a i konačno sa 30 mM NaOH. Proteini u SDS, β -merkaptetanolnom i NaOH ekstraktu razdvojeni su SDS-elektroforezom i detektirani antitijelima na –HA oznaku Western blot metodom te su dobiveni rezultati prikazani na Slici 8.

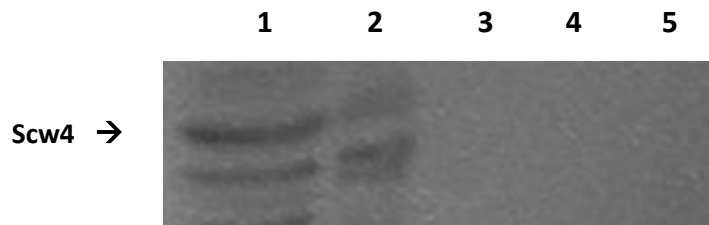


Slika 8. Analiza proteina u SDS ekstraktu, β -merkaptetanolom ekstraktu i NaOH ekstraktu Western blot metodom. Proteini u uzorcima su detektirani antitijelima na –HA oznaku. Uzorci: **1.** SDS ekstrakt; **2.** β - merkaptetanolni ekstrakt; **3.** NaOH ekstrakt.

U SDS ekstraktu (uzorak broj 1, slika 8) uspješno je izoliran nekovalentno vezani Scw4. Obzirom na to da smo ranije pokazali da su za potpunu izolaciju nekovalentno vezanog Scw4 proteina potrebna dva uzastopna tretmana SDS-om (Slika 5., uzorci 4, 5 i 6), a u ovom slučaju su stijenke SDS-om tretirane samo jednom, za pretpostaviti je da je u stijenkama ostalo još nekovalentno vezanog Scw4 proteina. Međutim, u β -merkaptetanolnom ekstraktu dobivenom nakon prethodno provedene ekstrakcije stijenki SDS-om nema izoliranih proteina (Slika 8, uzorak broj 2). Ovakav rezultat pokazuje da nakon jednokratne ekstrakcije stijenki SDS-om, iako nekovalentno vezani proteini nisu potpuno uklonjeni, nema proteina koji bi se izolirali sa β -merkaptetanolom tj. da β -merkaptetanol nema ulogu u izolaciji nekovalentno vezane frakcije Scw4. Nakon ova dva koraka ekstrakcije stijenke su tretirane sa NaOH, te je iz dobivenog rezultata vidljivo da je kovalentno vezana frakcija Scw4 i dalje prisutna u stijenci (Slika 8, uzorak broj 3). Ovim rezultatima smo potvrdili da se kovalentno vezana frakcija Scw4 proteina ne ugrađuje u stijenku preko disulfidnih mostova jer sa β -

merkaptoetanolom, koji reducira disulfidne mostove, proteini nisu uspješno izolirani. Ujedno ovi rezultati ukazuju da nema niti međusobnog povezivanja Scw4 proteina disulfidnim mostovima na frakciju Scw4 ugrađenu u stijenku nekom drugom vrstom kovalentnih veza, budući da β -merkaptanoetanolom ekstrakcijom nisu izolirani proteini, iako je kovalentno vezana frakcija Scw4 i dalje prisutna u stijenci nakon provedene SDS ekstrakcije.

Posljednji uzorak staničnih stijenki kvasca tretiran je Laemmli puferom bez β -merkaptoetanolom, pa uzastopce tri puta sa NaOH i nakon toga Laemmli puferom bez SDS-a kako bi provjerili zaostaje li u stijenci nakon tretmana sa NaOH još proteina i da li ih je moguće ekstrahirati β -merkaptoetanolom, te koliko je uzastopnih ekstrakcija sa NaOH potrebno za potpuno uklanjanje kovalentno vezane frakcije Scw4. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 9.



Slika 9. Analiza proteina u SDS ekstratu, NaOH ekstraktu nakon prvog, drugog i trećeg tretmana i u β -merkaptanoetanolom ekstraktu Western blot metodom. Proteini u uzorcima su detektirani antitijelima na –HA oznaku. Uzorci: **1.** SDS ekstrakt; **2.** NaOH ekstrakt nakon prve ekstrakcije; **3.** NaOH ekstrakt nakon druge ekstrakcije; **4.** NaOH ekstrakt nakon treće ekstrakcije; **5.** β -merkaptanoetanolni ekstrakt.

Primjenom SDS-a (uzorak 1), kojim je izolirana nekovalentno vezana frakcija Scw4, te jednokratnom primjenom NaOH (uzorak 2), čime je izolirana kovalentno vezana frakcija Scw4, ujedno je izoliran sav Scw4 prisutan u stijenkama kvasca što potvrđuju uzorci 3, 4 i 5 u kojima nema proteinskih vrpca. Činjenica da u NaOH ekstraktima nakon druge i treće ekstrakcije nema detektiranih proteina pokazuje da se kovalentno vezana frakcija Scw4 proteina može u potpunosti ukloniti jednokratnom ekstrakcijom u 30 mM NaOH. Osim toga, pokazno je da je ekstrakcija β -merkaptanoetanolom nakon alkalne ekstrakcije neuspješna, što dodatno potvrđuje da se Scw4 ne povezuje disulfidnim mostovima sa komponentama stijenske.

5. ZAKLJUČAK

Izolacija proteina stijenke sa SDS-om i sa NaOH potvrdila je da se dio Scw4 u staničnu stijenku kvasca ugrađuje nekovalentnim, a dio kovalentnim vezama. Pri tome je za potpunu izolaciju nekovalentno vezane frakcije Scw4 potrebno dva puta uzastopce stijenke ekstrahirati SDS-om, dok je za potpunu izolaciju kovalentno vezane frakcije Scw4 dovoljna jednokratna ekstrakcija stijenki pomoću NaOH.

Ekstrakcijom proteina stijenke smjesom SDS-a i β -merkaptetanola, te samo SDS-om, dobivene su proteinske vrpce Scw4 podjednakog intenziteta. Ekstrakcijom proteina stijenki β -merkaptetanolom dobivena je zanemarivo mala količina izoliranog Scw4. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je uloga β -merkaptetanola u ekstrakciji nekovalentno vezane frakcije Scw4 zanemariva.

U NaOH ekstraktima stijenki koje su prethodno tretirane samo sa β -merkaptetanolom količina proteina je veća od količine proteina izoliranih iz stijenki koje su prethodno bile tretirane smjesom SDS-a i β -merkaptetanola ili samo SDS-om što potvrđuje da u izolaciji nekovalentno vezane frakcije proteina iz stanične stijenke glavnu ulogu ima SDS.

Nakon provedene ekstrakcije SDS-om u stijenci više nema Scw4 koji se može izolirati β -merkaptetanolom, već samo pomoću NaOH. Nadalje, nakon provedene alkalne ekstrakcije u stijenci više nema Scw4 koji bi se mogao izolirati pomoću β -merkaptetanola. Ovakvi rezultati potvrđuju da se Scw4 ne povezuje disulfidnim mostovima sa ostalim komponentama stijenke, a niti međusobno.

6. POPIS LITERATURE

Abramova N., Sertil O., Mehta S., Lowry C.C. (2001) Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **183**:2881-2887

Bader O., Krauke Y., Hube B., (2008) Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pinchia pastoris*. *BMC Microbiology* **8**: 116-131

Baladrón V., Ufano S., Dueñas E., Martín-Cuadrado A.B., del Rey F., Vázquez del Aldana C.R. (2002) Eng1p, an endo-1,3- β -glucanase located at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **1**: 774-789

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., Hellingwerf K. J., Klis F. M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**: 781-796

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

Grbavac A., Čanak I., Stuparević I., Teparić R., Mrša V. (2017) Proteolytic processing of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein Scw4 regulates its activity and influences its covalent binding to glucan. *Biochimica et Biophysica Acta* **1864**: 507-515

Hamada K., Terashima H., Arisawa M., Yabuki N., Kitada K. (1999) Amino Acid Residues in the ω - Minus Region Participate in Cellular Localization of Yeast Glycosylphosphatidylinositol-Attached Proteins. *Journal of Bacteriology* **181**: 3886-3889

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., Ram A. F., Groos E. M., Kollar R., Montijn R. C. (1997) Altered extent of cross-linking of β -1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β -1,3-glucan content. *Journal of Bacteriology* **179**: 6279–6284
- Klis F. M., Boorsma A., De Groot P. W. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185–202
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 239–256.
- Larriba G., Andaluz E., Cueva R., Basco R.D. (1995) Molecular biology of yeast exo-glucanases. *FEMS Microbiology Letters* **125**: 121-126
- Lesage G., Bussey H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**:317-343
- 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 disulfide bridges. *FEMS Yeast Research* **1**: 241-245
- Mrša V., Seidl T., Gentsch M., 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
- Olsen V., Cawley N. X., Brandt J., Egel-Mitani M., Loh Y. P. (1999) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* yapsin 3, a new member of the yapsin family of aspartic proteases encoded by the YPS3 gene. *Biochemical Journal* **339**: 407-411

Osumi M. (1998) The Ultrastructure of Yeast: Cell Wall Structure and Formation. *Micron* **29**: 207–233

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 proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **24**: 259-266

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

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

Izjava o izvornosti

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

Dora Stok

ime i prezime studenta