

Modifikacija genoma kvasca u svrhu označavanja proteina Pir1, Pir3, Pir5 i Spr1 hemaglutininskom oznakom (HA)

Škarupka, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:578757>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Matea Škarupka

7494/N

**Modifikacija genoma kvasca u svrhu označavanja
proteina Pir1, Pir3, Pir5 i Spr1 hemaglutininskom
oznakom (HA)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija 1

Mentor: Doc. dr. sc. *Igor Stuparević*

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam**

**Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam**

**Modifikacija genoma kvasca u svrhu označavanja proteina Pir1, Pir3, Pir5 i Spr1
hemaglutininskom oznakom (HA)**

Matea Škarupka, 0058211660

Sažetak:

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je modelni organizam u biokemijskim i genetičkim istraživanjima zbog sličnosti mnogih staničnih procesa sa procesima u višim eukariotima. Stanice kvasca obavija stanična stijenka građena od glukanske mreže, koju čine β -1,3 i β -1,6-glukan, hitin i manoproteini. Građa stanične stijenke mijenja se ovisno o staničnom ciklusu kvasca pa se tako razlikuje u mitozu i mejozu. Prelaskom iz mitoze u mejozu, a zatim i prilikom formiranja sporula, dolazi do značajnih promjena u strukturi stanične stijenke što je posljedica promijenjene ekspresije pojedinih proteina. Cilj ovog rada bio je obilježiti proteine stanične stijenke Pir1, Pir3, Pir5 i Spr1 hemaglutininskom oznakom kako bi olakšali njihovo praćenje u različitim fazama staničnog ciklusa.

Ključne riječi: kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, stanična stijenka, Pir-proteini, Spr1

Rad sadrži: 24 stranica, 6 slika, 5 tablica, 27 literaturna navoda, 0 priloga

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: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

Datum obrane: 1. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Departement od Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition**

**Yeast genome modification for the purpose of labeling proteins Pir1, Pir3, Pir5
and Spr1 with hemagglutinin tag (HA)**

Matea Škarupka, 0058211660

Abstract:

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a model organism in biochemical and genetic research due to the similarity of many cellular processes with those in higher eukaryotes. Yeast cells are surrounded by a cell wall built of a glucan network, made up of β -1,3 and β -1,6-glucan, chitin, and mannoproteins. The structure of the cell wall varies depending on the cell cycle of the yeast, so it differs in mitosis and meiosis. With the transition from mitosis to meiosis, and then spore formation, there are significant changes in cell wall structure as a result of altered expression of individual proteins. The aim of this study was to label cell wall proteins Pir1, Pir3, Pir5 and Spr1 with a hemagglutinin label to facilitate their monitoring at different stages of the cell cycle.

Keywords: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall, Pir-proteins, Spr1

Thesis contains: 24 pages, 6 figures, 5 tables, 27 references, 0 supplements

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: assistant prof. Igor Stuparević, PhD

Technical support and assistance: assistant prof. Igor Stuparević, PhD

Defence date: July 1st, 2020.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2. Životni ciklus kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.3. Stanična stijenka kvasca	5
2.4. Proteini stanične stijenke	6
2.5. Pir – proteini	6
2.6. Protein Spr1	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. Kemikalije	9
3.1.2. Enzimi.....	9
3.1.3. Otopine i puferi.....	9
3.1.4. Soj bakterije.....	9
3.1.5. Soj kvasca	9
3.1.6. Hranjive podloge za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i>	10
3.1.7. Hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
3.1.8. Plazmid pYM16	11
3.1.9. Početnice	12
3.2. METODE.....	13
3.2.1. Transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>Escherichia coli</i>	13
3.2.2. Izolacija plazmidne DNA.....	13
3.2.3. Restriksijska analiza plazmidne DNA.....	13
3.2.4. DNA elektroforeza	13
3.2.5. Određivanje koncentracije plazmidne DNA	14
3.2.6. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	14
3.2.7. Pročišćavanje PCR produkta	15
3.2.8. Transformacija kvasca <i>S. cerevisiae</i> metodom pomoću litijevog acetata (LiAc metodom).....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. Provjera prisutnosti izoliranog plazmida pYM16 restriksijskom analizom.....	16
4.2. Lančana reakcija polimerazom.....	17
4.3. Transformacija kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
.....	18

5. ZAKLJUČAK.....	21
6. LITERATURA.....	22

1. UVOD

Jednostanični eukariot, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* već dugi niz godina predstavlja modelni organizam u biokemijskim, genetičkim i molekularno – biološkim istraživanjima. Status modelnog organizma dobio je zbog svog kratkog generacijskog vremena, jednostavnog staničnog ciklusa, lakog i jeftinog uzgoja u laboratorijskim uvjetima te mnogih sličnosti u fiziološkim procesima s humanim stanicama. Kvasac *S. cerevisiae* također predstavlja prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvenciran, što ga čini idealnim modelom u genetičkim istraživanjima (Duina i sur., 2014; Goffeau i sur., 1996). Stanice kvasca obavija stanična stijenka čija je primarna uloga pružiti stanici zaštitu od okoline te joj dati čvrstoću i oblik. Druge uloge ove ekstracelularne organele uključuju komunikaciju s okolinom pomoću receptora na staničnoj stijenci i enzimatskih aktivnosti u različitim fazama staničnog ciklusa (Fleet, 1985). Građu stanične stijenke čine dva odvojena sloja. Unutarnji sloj građen je od razgranatog polimera β -1,3-glukana koji se sastoji od otprilike 1500 glukoznih jedinica. Na β -1,3-glukan vezan je lanac hitina koji pridonosi mehaničkoj čvrstoći stanične stijenke. Na lanac β -1,3-glukana može biti vezan kraći lanac β -1,6-glukana čija je uloga povezivanje proteina s glukanskom mežom (Klis i sur., 2002). Vanjski sloj čine visoko glikozilirani manoproteini koji mogu biti vezani za staničnu stijenu kovalentno ili nekovalentno. U skupinu kovalentno vezanih proteina stanične stijenke pripadaju Pir – proteini (eng. proteins with internal repeats). Skupina Pir – proteina sastoji se od pet proteina koji sadrže ponavljajuće sekvence na svom N – terminalnom kraju, visoko su O – glikozilirani, ne sadrže GPI sidro te se procesiraju Kex2p proteazom (Mrša & Tanner, 1999). Građa stanične stijenke kvasca ovisi o njegovom životnom ciklusu, pa se tako razlikuje ovisno o tome nalazi li se stanica kvasca u mitozu ili mejozi. Mitoza je nespolan način razmnožavanja u kojem se iz pupa na stanici majki razvije nova stanica. Prilikom nepovoljnih uvjeta stanica može ući u spolni način razmnožavanja - mejozu u kojoj proizvodi spore te na taj način preživljava nepovoljne uvjete. Sporulacija kvasca je proces koji se odvija u tri faze – rana, srednja i kasna, te uključuje nastanak nove stanične stijenke u kasnoj fazi koja štiti sporu od nepovoljnih uvjeta. Tijekom ove faze važnu ulogu ima protein Spr1, koji ima egzo-1,3- β glukanaazu aktivnost te pridonosi termorezistenciji spora (Muthukumar i sur., 1993). Prelaskom iz jedne vrste razmnožavanja u drugu, značajno se mijenja sastav stanične stijenke pa su zbog toga neki proteini prisutni u stanici u svim fazama životnog ciklusa dok drugi nisu (Herskowitz, 1988). Cilj ovog rada bio je obilježiti proteine Pir1, Pir3, Pir5 i Spr1 hemaglutininskom sekvencom (YPYDVPDYA sekvenca proteina virusa gripe koja se koristi radi lakše detekcije fuzijskog proteina antitijelima) kako bi olakšali njihovo

praćenje u daljnjim istraživanjima koja bi obuhvatila ekspresiju ovih proteina u mitozu, mejozi i formiranju spora te njihovu moguću regulaciju na razini transkripcije ili translacije.

2. TEORIJSKI DIO

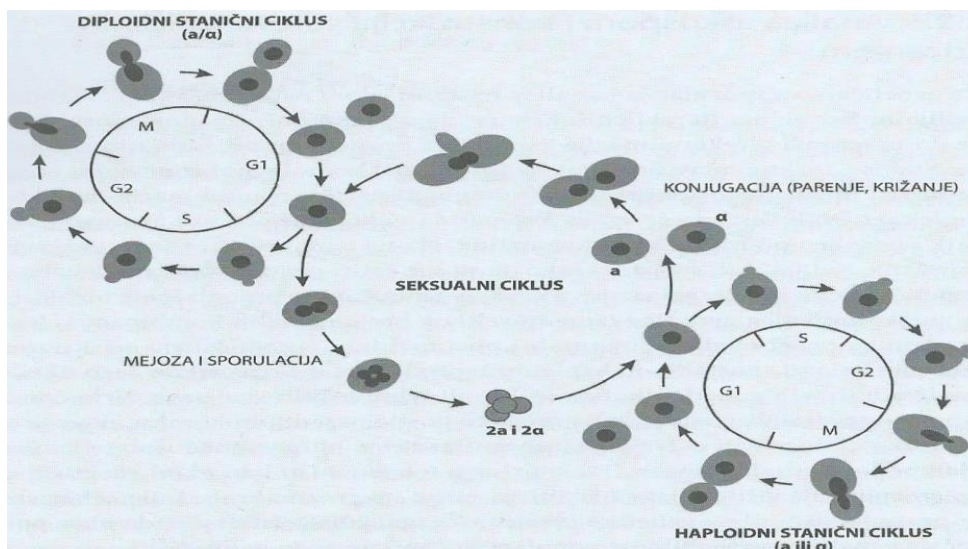
2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariot koji pripada carstvu gljiva, a poznatiji je pod imenom pivski kvasac. Ovaj kvasac je elipsoidnog oblika, a veličina ovisi o fazi rasta, pa dijametar haploidnih stanica iznosi 4 μm , a diploidnih stanica 5-6 μm (Sherman, 2002). *S. cerevisiae* najbolje raste pri uvjetima temperature od 20 do 30 °C, pri čemu optimalna temperatura za rast iznosi 28 °C, te pH između 4,5 i 6,5 (Walker, 2009). Ova vrsta kvasca može rasti u aerobnim i anaerobnim uvjetima, pri čemu u anaerobnim uvjetima podliježe procesu fermentacije odnosno koristi glukozu za stvaranje CO₂ i etanola (Bekatorou i sur., 2006). Genom haploidne stanice kvasca veličine je 12 000 kb raspodijeljenih u 16 kromosoma čija veličina varira od 200 kb do 2200 kb. Analizom genoma referentnog soja S288C određeno je 6604 otvorenih okvira čitanja (eng. open reading fragments, ORFs – dio DNA od start do stop kodona) od kojih je 79% potvrđeno, 11% nije eksperimentalno karakterizirano te 10% nije potvrđeno (yeastgenome.org, podatci preuzeti 18. ožujka 2020.). Od 5188 potvrđenih otvorenih okvira čitanja, otprilike 20% kodira za enzime uključene u sintezu i razgradnju staničnih produkata, a ostatak sudjeluje u izgradnji stanice, biosintezi proteina te ima razne regulatorne i signalne uloge. Zbog kratkog generacijskog vremena, lakog uzgoja korištenjem jednostavnih laboratorijskih tehnika, poznatog cijelog genoma i činjenice da je jednostanični eukariotski organizam kod kojega su mnogi fiziološki procesi slični procesima u humanim stanicama (npr. DNA replikacija, transkripcija, RNA procesiranje, stanični ciklus i njegova regulacija) kvasac *Saccharomyces cerevisiae* predstavlja odličan modelni organizam u biokemijskim, molekularno-biološkim i genetičkim istraživanjima.

2.2. Životni ciklus kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* razmnožava se pupanjem pri čemu se iz stanice majke diobom odvaja stanica kćer, veličinom manja od stanice majke. Stanični ciklus kvasca *S. cerevisiae* iznosi otprilike 100 minuta (Herskowitz, 1988). Genetički materijal stanice kvasca nalazi se pohranjen u jezgri kao više linearnih kromosoma, a stanice kvasca mogu postojati u haploidnom i diploidnom obliku. Haploidni genom sastoji se od 16 kromosoma veličine 200 do 2200 kb, dok diploidni genom sadrži 2 seta od 16 kromosoma koji čine oko 85% ukupne količine DNA, a ostatak čini mitohondrijska DNA (oko 10%) i ekstrakromosomski element koji se naziva 2 μ plazmid (Sherman, 2002). I haploidni i diploidni stanični ciklus završavaju mitozom.

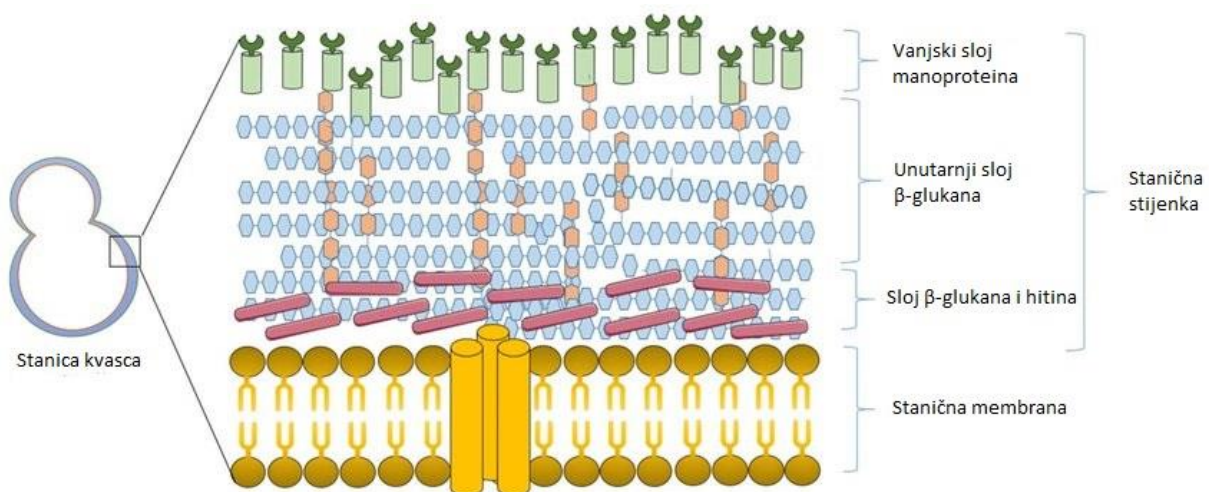
Stanice kvasca iskazuju različite tipove parenja pa tako haploidne stanice mogu biti a ili α tipa parenja dok su diploidne stanice a/ α tipa parenja. Tip parenja stanica kvasca je određen genetičkom informacijom u lokusu MAT i haploidne stanice kvasca ispoljavaju a ili α tip parenja u vidu receptora i feromona dok diploidne stanice kvasca ne pokazuju karakteristike ni a ni α haploidnih stanica (Strathern i sur., 1981). Vegetativni ciklusi haploidnih i diploidnih stanica povezani su seksualnim ciklusom, mejozom, koji završava sporulacijom. Procesom mejoze i sporulacije iz jedne diploidne stanice nastaje askus koji sadrži četiri haploidne spore, dvije a i dvije α tipa parenja. Proces mejoze i sporulacije služe stanici za preživljavanje nepovoljnih uvjeta u okolišu poput odsutnosti izvora dušika ili prisutnosti nefermentabilnih izvora ugljika (npr. acetata). Mejoza se odvija u tri faze – rana, srednja i kasna. U ranoj fazi mejoze stanica kvasac izlazi iz G1 faze mitoze te ulazi u S fazu kao pripremu za mejozu u kojoj se tijekom profaze dešava replikacija DNA. Srednja faza uključuje stvaranje četiri haploidne jezgre koje se pakiraju u četiri haploidne spore te stvaranje membrane prospore. Kasna faza mejoze započinje nastajanjem membrane prospore koje je važno za sazrijevanje spora. Također, dolazi do sabijanja kromatina u jezgri spora, kao i regeneracije određenih organela. U ovoj fazi dolazi do formiranja čvrste stanične stijenke koja štiti sporu od nepovoljnih uvjeta (Neiman, 2011). Kada ponovo dođe do pojave povoljnih uvjeta za razmnožavanje, spore ulaze u proces germinacije i ponovo se dijele mitotičkom diobom (Herskowitz, 1988).



Slika 1. Životni ciklus kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Grba, 2010)

2.3. Stanična stijenka kvasca

Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* obavija stanična stijenka koja iznosi otprilike 20% suhe mase čitave stanice. Stanična stijenka mora biti čvrsta kako bi podnijela visok unutarstanični tlak koji iznosi više od 10 bara, ali i elastična kako bi omogućila procese poput rasta i razmnožavanja stanice te sporulacije (Ecker i sur., 2006). Takva svojstva stanične stijenke osigurava njena građa koja se sastoji od β -glukana, manoproteina i hitina. Stanična stijenka ima ulogu u komunikaciji stanice s okolinom te različitih enzimatskih aktivnosti potrebnih za održavanje strukture stijenke. Izgradnja stanične stijenke strogo je reguliran proces, koordiniran napredovanjem staničnog ciklusa. Proteini stanične stijenke zamjećuju uvjete okoliša te kao odgovor pokreću kaskadu enzimatskih reakcija. Ukoliko su vanjski uvjeti nepovoljni ili dovode stanicu u stanje stresa, enzimi stanične stijenke potiču sintezu hitina kako bi se stanica zaštitila od nepovoljnih uvjeta (De Groot i sur., 2001; Klis i sur., 2006). Građu stanične stijenke čine dva odvojena sloja prikazana na slici 2. Unutarnji sloj sastoji se od razgranatog polimera β -1,3-glukana na čiji je nereducirajući kraj povezan kratki lanac hitina β -1,4-glikozidnom vezom (Teparić i sur., 2010). Lanac hitina građen je od otprilike 190 monomera N-acetil glikozamina međusobno povezanih β -1,4-glikozidnom vezom, sinteza hitina u stanici odvija se djelovanjem tri enzima hitin sintaze te je strogo regulirana. Hitin ima vrlo važnu ulogu u održavanju čvrstoće stanične stijenke pa je njegova sinteza povećana prilikom oštećenja stijenke kao način spašavanja stanice. Vanjski sloj građen je od O- i N-glikoziliranih manoproteina koji imaju važnu ulogu u prepoznavanju molekula koje okružuju stanicu te tvore zaštitni sloj koji onemogućuje pristup stranim enzimima (Klis i sur., 2002).



Slika 2. Građa stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

2.4. Proteini stanične stijenke

Do sada je identificirano više od 30 proteina stanične stijenke (Ecker i sur., 2006). Oni se uglavnom nalaze na površini stanične stijenke, dok se manji dio proteina nalazi i u unutrašnjosti. Uloga unutrašnjeg sloja manoproteina nije sasvim poznata, dok vanjski sloj predstavlja zaštitni sloj koji štiti glukansku mrežu od razaranja enzimima (Zlotnik i sur., 1984). Iako njihova uloga nije sasvim poznata, pretpostavlja se da sudjeluju u izgradnji, pregradnji i održavanju stanične stijenke tijekom rasta, razmnožavanja, sporulacije kao i mogućih drugih događaja koji utječu na integritet stanične stijenke (Teparić i sur., 2010; Yin i sur., 2005). Prema načinu vezanja u staničnu stijenku, proteini se mogu podijeliti u dvije veće skupine. Prvu skupinu čine nekovalentno vezani proteini ili oni vezani disulfidnim vezama na komponente stanične stijenke. Ovi proteini mogu se izolirati odnosno otopiti iz stanične stijenke pomoću SDS-a i merkaptoetanolu pri povišenoj temperaturi pa se nazivaju i topljivi proteini stanične stijenke. Drugu skupinu čine proteini kovalentno vezani na glukan u staničnoj stijenci, mogu biti direktno vezani na β -1,3-glukan ili indirektno preko β -1,6-glukana. Takvi proteini se izoliraju pomoću enzima β -glukanaze nakon tretmana vrućim SDS-om. U ovu skupinu pripada nekoliko vrsta proteina. GPI proteini se preko svog C-terminusa, koji sadrži fosfatidilinozitolni ostatak, vežu na glukansku mrežu (Ecker i sur., 2006; Mrša i Tanner, 1999). Pretpostavlja se da neki imaju enzimsku aktivnost, dok drugi imaju strukturnu ulogu. U skupinu kovalentno vezanih proteina spadaju i Pir – proteini (Pir – protein with internal repeats) koji su esterskim vezama vezani na β -1,3-glukan putem bočnih lanaca aminokiselina u ponavljajućem redoslijedu. Iz stanične stijenke se oslobađaju blagom lužinom ili enzimom β -1,3-glukanazom (Orlean, 2012).

2.5. Pir – proteini

Pir – proteini pripadaju grupi kovalentno vezanih proteina stanične stijenke. Karakteriziraju ih ponavljajuće sekvence duljine oko 11 aminokiselinskih ostataka na N – terminusu po kojima su i dobili ime Pir – proteini (Klis i sur., 2002). U ovoj porodici identificirano je pet proteina: Pir1p/Ccw6p, Pir2p/Hsp150p/Ccw7p, Pir3p/Ccw8p, i Pir4p/Ccw5p/Ccw11p/Cis3p i Pir5. Svih pet proteina dijele neke zajedničke karakteristike kao prije spomenute ponavljajuće sekvence na N-terminusu, ali također i visok stupanj homologije, ne sadrže GPI sidro, intenzivno su O – glikozilirani, bogati su serinom i treoninom te sadrže specifični signalni peptid koji se procesira djelovanjem Kex2p proteaze (Castillo i sur., 2003; Mrša i Tanner, 1999). Također pokazuju rezistenciju na biljni antifungalni protein osmotin (Yun i sur., 1997). Pir – proteini se mogu vezati na komponente stanične stijenke na dva načina. Prvi način je pomoću glutaminskog

ostatka u ponavljajućoj sekvenci QIGDGQ74VQ koji se veže na β -1,3-glutamin te nastaje esterska veza. Ova veza je vrlo alkalno labilna, te se može pocijepati djelovanjem 30 mM NaOH pri +4 °C (Ecker i sur., 2006). Drugi način vezanja Pir – proteina je pomoću cisteinskih ostataka koji tvore disulfidne mostove. Pretpostavlja se da je za ugradnju Pir – proteina u staničnu stijenku kvasca potrebna barem jedna od ove dvije veze (Castillo i sur., 2003). Uloga Pir – proteina u staničnoj stijenci je još uvijek nerazjašnjena. Istraživanja u kojima su deletirani geni za ekspresiju pojedinih Pir – proteina pokazala su da mutanti koji nastaju imaju promijenjena morfološka svojstva, nastaju stanice koje imaju produljeno vrijeme rasta i morfološki su različite. Ovakvi mutanti također su osjetljiviji na inhibitore sinteze stanične stijenke (Mrša i Tanner, 1999). Genetskom analizom ustvrđeno je da je ekspresija ovih proteina pojačana tijekom diobe stanice što ukazuje na to da imaju ulogu u stabilizaciji novonastale stanične stijenke koja dijeli stanicu kćer od stanice majke. Protein Pir1p/Ccw6p je visoko O-glikozilirani protein koji ima ulogu u stabilizaciji stanične stijenke. Vezan je za staničnu stijenku preko β -1,3-glukana, sadrži osam ponavljajućih regija, a njegova ekspresija povećana je na površini stanice. Veća količina ovog proteina nalazi se u obliku prstenaste strukture s hitinom na mjestu odvajanja stanice kćeri od stanice majke tijekom pupanja. Protein Pir2p/Hsp150p/Ccw7p je O-manozilirani protein vezan za staničnu stijenku preko β -1,3-glukana pomoću disulfidnih mostova. Sadrži deset ponavljajućih regija, a njegova ekspresija povećana je pri nepovoljnim uvjetima poput temperaturnog šoka, oksidativnog stresa i ograničene količine dušika (Kapteyn i sur., 1999). Kao i Pir1p, nalazi se lokaliziran na mjestu odvajanja stanica tijekom mitotičke diobe. Protein Pir3p/Ccw8p je O-glikozilirani, kovalentno vezan protein koji sudjeluje u održavanju stabilnosti stanične stijenke. Ovaj protein sadrži osam ponavljajućih regija, a njegova ekspresija ovisi o staničnom ciklusu i svoj maksimum dostiže u G1 fazi mitotičke diobe. Protein Pir4p/Ccw5p/Ccw11p/Cis3p je manozilirani glikoprotein koji sadrži dvije ponavljajuće regije na N-terminusu. Ova ponavljajuća regija odgovorna je za vezanje Pir4 proteina u staničnu stijenku. Ukoliko ove regije nema, protein Pir4 veže se za staničnu stijenku pomoću disulfidnih mostova, a ne kovalentno na β -1,3-glukan. Protein Pir5 je član porodice Pir – proteina, sadrži četiri ponavljajuće regije, a njegova funkcija nije potpuno poznata. Lokaliziran je u endoplazmatskom retikulumu i vakuoli, a pretpostavlja se da ima ulogu u sporulaciji (Castillo i sur., 2003; Ecker i sur., 2006; Sumita i sur., 2005, yeastgenome.org). Veličina pojedinog Pir – proteina i molekulska masa prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Vrste Pir – proteina i njihova veličina, broj aminokiselinskih ostataka i ponavljajućih regija (yeastgenome.org, Ecker i sur.,2006)

Pir - protein	Veličina (Da)	Broj aminokiselinskih ostataka	Broj ponavljajućih regija
Pir1p/Ccw6p	34621.0	341	8
Pir2p/Hsp150p/Ccw7p	41054.6	413	10
Pir3p/Ccw8p	33001.8	325	8
Pir4p/Ccw5p/Ccw11p/Cis3p	23233.8	227	1
Pir5	30221.7	287	4

2.6. Protein Spr1

Protein Spr1 pripada skupini proteina koji su eksprimirani u specifičnim fazama tijekom sporulacije (eng. Spr – *sporulation regulated*). Većina ovih proteina regulirana je na razini transkripcije, a regulacija ne ovisi o vanjskim uvjetima poput nedostatka dušika već o specifičnoj fazi sporulacije (Holaway i sur., 1987). Protein Spr1 sadrži 445 aminokiselinskih ostataka, veličine je 51796,8 Da, a njegova izoelektrična točka je pri 5,61 (yeastgenome.org). Analizom sekvence gena kvasca *Saccharomyces cerevisiae* otkriveno je da ovaj gen ima značajnu homologiju s genom *EXG1* koji kodira za izozime egzo-1,3- β glukanaze nazvane ExgI i ExgII. Ovi izozimi imaju ulogu u hidrolizi β -O-glikozidne veze na nereducirajućim krajevima polimera glukana. Budući da su ovi geni eksprimirani tijekom određene faze staničnog ciklusa, pretpostavlja se da sudjeluju u modifikaciji stanične stijenke za vrijeme stanične diobe. Mutanti koji ne sadrže gen *SPR1* nemaju visoku razinu aktivnosti egzo-1,3- β glukanaze te su njihove spore manje otporne na temperaturne promjene od stanica kvasca divljeg tipa. Produkti ovog enzima imaju ulogu u modifikaciji veza između glukana u staničnoj stijenci askospora. Mutanti koji nemaju ovaj gen stvaraju spore jednakom učinkovitošću kao i stanice divljeg tipa, međutim, analizom spora mutanata uočeno je da one gube vitalnost pri 42 °C značajno većom brzinom. Pretpostavlja se da mutirane stanice imaju manju termorezistenciju zbog defekata u staničnoj stijenci koji nastaju zbog manjka aktivnosti Spr1 egzo- β -glukanaze (Muthukumar i sur., 1993).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Agar, agaroz, baktotripton, pepton, kvašćev ekstrakt, natrijev klorid, ampicilin, higromicin, glukoza
- Deoksiribonukleotidi, standardi za DNA elektroforezu

3.1.2. Enzimi

- Tag polimeraza
- Restriksijske endonukleaze (HindIII, BglI i PvuI)

3.1.3. Otopine i puferi

- Litijev acetat
- 50x koncentrirani TAE pufer
- Etidij bromid
- 50%-tna otopina PEG-a

3.1.4. Soj bakterije

Bakterija korištena za transformaciju plazmidom pYM16 i umnažanje plazmida je *Escherichia coli*, DH5 α , genotipa F- Φ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk - , mk +) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 re/A1* (Life Technologies).

3.1.5. Soj kvasca

Za transformaciju kvasca korišteni su sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* navedeni u tablici 2.

Tablica 2. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni za transformaciju

IME	GENOTIP	IZVOR
BMA41 divlji tip	MATa <i>ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1</i> Δ <i>can1-100</i>	Baudin-Baillieu i sur., MCB 1997; R. Rahmouni lab
BMA41 rrp6	MATa <i>ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1</i> Δ <i>can1-100 rrp6:KanMX4</i>	Mosrin-Huaman i sur., MCB 2009; R. Rahmouni lab
JHY222 divlji tip	MATa/MAT α HAP1/HAP1MKT1(D30G)/MKT1(D30G) RME1(INS308A)/RME1(INS308A)TAO3(E1493Q)/TAO 3(E1493Q)	Lardenois i sur., PNAS 2011

3.1.6. Hranjive podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

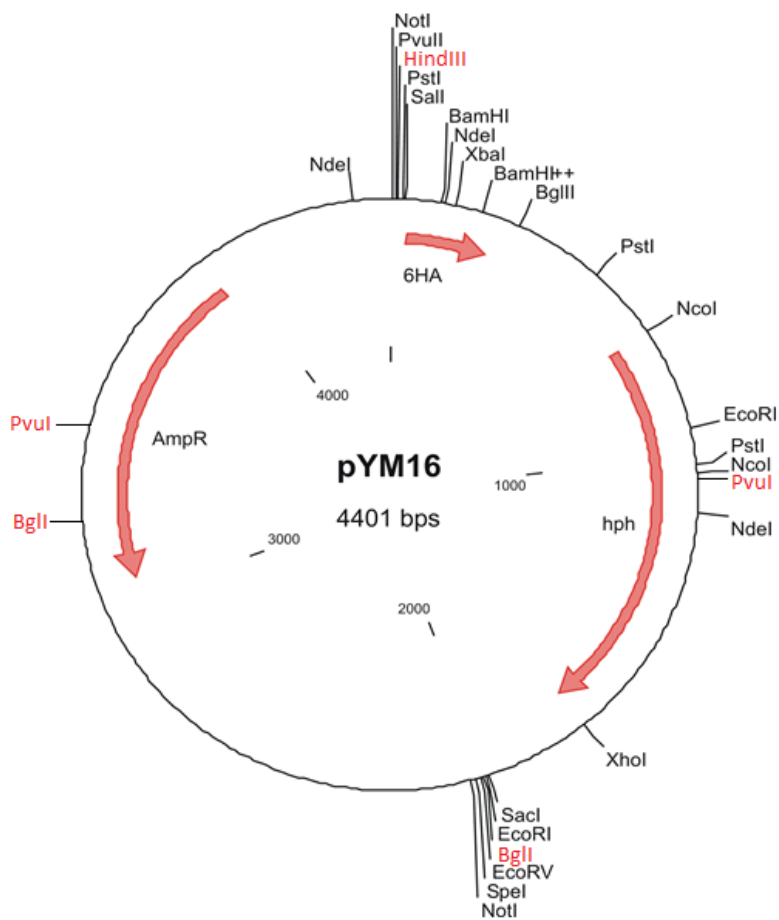
Za uzgoj bakterije korištena je kruta i tekuća LB podloga. Tekuća LB podloga priprema se dodatkom 10 g/L baktotriptonu, 5 g/L kvašćeva ekstrakta i 5 g/L NaCl. Kruta LB podloga priprema se na isti način uz dodatak 15 g/L agara. Obje podloge se steriliziraju te se nakon sterilizacije u podlogu dodaje antibiotik ampicilin u koncentraciji od 100 µg/mL.

3.1.7. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Za uzgoj kvasca korištena je kruta i tekuća YPD podloga. Tekuća YPD podloga priprema se dodatkom 20 g/L peptona, 10 g/L kvašćeva ekstrakta i 20 g/L glukoze. Kruta YPD podloga priprema se na isti način uz dodatak 15 g/L agara. Obje podloge se steriliziraju te se nakon sterilizacije u krutu YPD podlogu dodaje antibiotik higromicin B u koncentraciji od 300 µg/mL.

3.1.8. Plazmid pYM16

Plazmid pYM16 je kružna molekula DNA veličine 4401 parova baza koja sadrži hemaglutininsku oznaku (HA) te regije koje omogućuju rezistenciju na antibiotike ampicilin (AmpR) i higromicin B (hph). Ove regije prikazane su na slici 3. crvenim strelicama. Na slici su također prikazana mjesta cijepanja restriksijskih enzima opisanih u poglavlju 3.2.3. Restriksijska analiza plazmidne DNA.



Slika 3. Mapa plazmida pYM16 s označenim regijama za ampicilin (AmpR), higromicin B (hph) i hemaglutininsku oznaku (6HA) te mjestima cijepanja restriksijskih enzima HindIII, BglI i PvuI. Navedene oznake i enzimi su označeni crvenim slovima.

3.1.9. Početnice

Početnice su kratki lanci nukleotida koji se konstruiraju kako bi bili komplementarni početnom i krajnjem slijedu nukleotida na dijelu DNA koji se želi umnožiti. Konstrukcija početnica provedena je prema radu Janke i sur.,2004. Početnice su konstruirane za 4 različita gena i prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Početnice korištene za umnažanje dijela plazmida pYM16

<i>PIR1</i>	for	GAACTCAATGTAATGCAGTCCACCTACAAGCTATCGATTTGCTCAACTGT <u>CGTA</u> <u>CGCTGCAGGTCGAC</u>
	rev	TACGATGACTTTTATGTTTTCATGCGACTATGAGAGGTAACTTATGATTA <u>ATCG</u> <u>ATGAATTCGAGCTCG</u>
<i>PIR3</i>	for	GTTCTCAGTGCCATGAAGTTTATTTGCAAGCTATAGATTTAATTGACTGT <u>CGTA</u> <u>CGCTGCAGGTCGAC</u>
	rev	AATTCGTGAAGTTAAAGGAGGACGACTCCGATTGATCGATGCATCGTTCA <u>ATC</u> <u>GATGAATTCGAGCTCG</u>
<i>PIR5</i>	for	GGCCAGTGCAATCCCGTTTCAATTTACAAACAGTTGGTCTCGTCGATTGT <u>CGTAC</u> <u>GCTGCAGGTCGAC</u>
	rev	TTTTTGAAGTACAATCAAGACCTGCAAGATTATAATGTTGGTGATTCA <u>ATCGAT</u> <u>GAATTCGAGCTCG</u>
<i>SPR1</i>	for	ACATTTTTCCGCAACCTATCAACGATAGGAAATATCCTAACCAATGTCAT <u>CGTA</u> <u>CGCTGCAGGTCGAC</u>
	rev	ATAATAATCATCACATTCCCAAGACCTTAAATATATGCCACAAAATTTCA <u>ATCG</u> <u>ATGAATTCGAGCTCG</u>

3.2. METODE

3.2.1. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli*

U 50 μL otopine kompetentnih stanica bakterije *E. coli* dodano je 0,5 μL plazmida koji sadrži oko 0,5 ng DNA. Smjesa se inkubira na ledu 20 minuta, nakon čega slijedi temperaturni šok na 42 °C u trajanju od 1 minute. Nakon toga smjesa se ponovo stavlja na led 2-3 minute, dodaje se 950 μL tekuće LB podloge i inkubira na 37 °C oko 1 sat. Nakon inkubacije, stanice se nacjepljuju na krutu LB podlogu s dodanim ampicilinom te se inkubiraju na 37 °C preko noći.

3.2.2. Izolacija plazmidne DNA

Umnažanje transformiranih stanica bakterije *E. coli* provedeno je u tekućoj LB podlozi s dodatkom 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina. Izolacija plazmidne DNA iz kompetentnih stanica bakterije provedena je korištenjem seta Monarch® Plasmid Miniprep Kit prema uputama proizvođača.

3.2.3. Restriksijska analiza plazmidne DNA

Za provjeru plazmida korištena je restriksijska analiza u kojoj su korištene restriksijske endonukleaze HindIII, BglI i PvuI. U reakcijsku smjesu dodaje se 1 μL plazmidne DNA (konc. 300 ng/ μL), 1 μL TAE pufera, 1 μL restriksijske endonukleaze i do 10 μL deionizirane vode.

3.2.4. DNA elektroforeza

Za DNA elektroforezu pripremljen je 1%-tni agarozni gel. Priprema gela uključuje otapanje 0,4 g agaroze u 40 ml TAE pufera kuhanjem do vrenja te izlijevanjem u kadicu za horizontalnu elektroforezu. Uzorci za elektroforezu pomiješaju se s bojom za uzorke (Gel loading dye, purple, NEB) nakon čega se uzorci nanese na gel, u jažice, potopljen u TAE puferu u kadici za elektroforezu. Elektroforeza se provodi pod naponom struje jačine 90 V u trajanju od 90 minuta. Po završetku DNA elektroforeze, agarozni gel s uzorcima stavlja se u otopinu etidij-bromida 10-15 minuta nakon čega se gleda pod UV svjetlom. Uzorci su vidljivi kao crte u gelu te se određuje njihova veličina u usporedbi sa standardima.

3.2.5. Određivanje koncentracije plazmidne DNA

Koncentracija izolirane plazmidne DNA izračunata je fluorimetrijskom metodom korištenjem Invitrogen Qubit fluorometra prema uputama proizvođača i korištenjem standardnog seta kemikalija. Izmjerena koncentracija plazmida je 300 ng/μL.

3.2.6. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (eng. PCR – polymerase chain reaction) provodi se kako bi se umnožio slijed nukleotida koji sadrži higromicinski marker i hemaglutininsku oznaku – PCR produkt. Za svaki uzorak napravljeno je 5 PCR smjese, a sastav reakcijske smjese za 1 epruvetu naveden je u tablici 4.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom

otopine	Volumen u 50 μL reakcijske smjese
PCR pufer 10x konc.	5 μL
10mM dNTPs	1,75 μL
10mM F-primer	3,2 μL
10mM R-primer	3,2 μL
Plazmid pYM16 (30ng)	2 μL
Tag polimeraza	0,5 μL
voda	34,35 μL
ukupno	50 μL

Protokol za lančanu reakciju polimeraze provodi se u nekoliko koraka. Prvi korak je denaturacija DNA na 95 °C u trajanju od 4 minute. Zatim slijedi drugi korak koji se ponavlja u 35 ciklusa. Drugi korak sastoji se od a) denaturacije lanaca pri čemu se dobivaju jednolančani kalupi na 95 °C 30 sekundi, b) komplementarno sparivanje početnica pri 55 °C 30 sekundi i c) sinteza komplementarnog lanca djelovanjem Tag polimeraze pri 68 °C u trajanju od 2 minute i 30 sekundi. Treći korak je konačna sinteza u trajanju od 10 minuta na 72 °C.

3.2.7. Pročišćavanje PCR produkta

Pročišćavanje PCR produkta provedeno korištenjem Nucleospin® Gel and PCR Clean Up seta prema uputama proizvođača.

3.2.8. Transformacija kvasca *S. cerevisiae* metodom pomoću litijevog acetata (LiAc metodom)

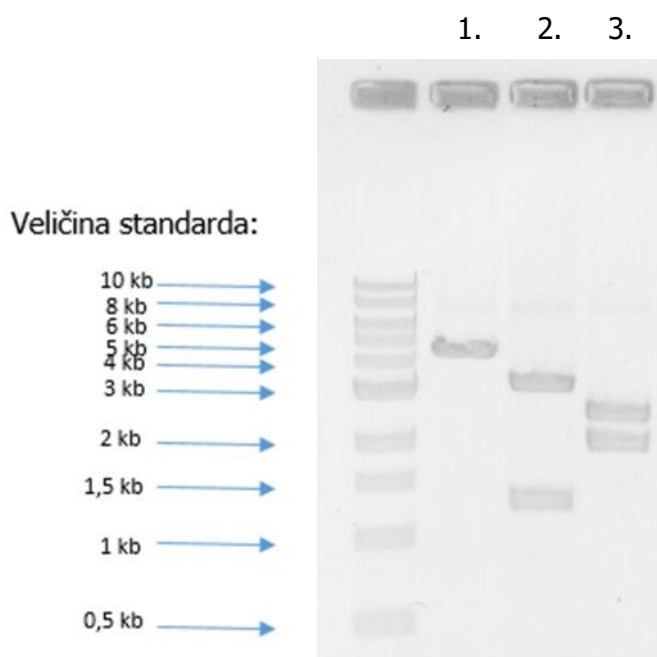
Stanice kvasca uzgojene su u tekućoj YPD podlozi do logaritamske faze rasta te se oko 10 OD jedinica odvaja od podloge centrifugiranjem 5 minuta na 3000 o/min. Supernatant se baci, a talog kvašćevih stanica se ispiri najprije sa sterilnom destiliranom vodom, a zatim sa 0,1 M litijevim acetatom. Nakon ispiranja na talog se redom dodaje: 240 µL 50%-tnog PEG-a, 36 µL 1 M LiAc, 25 µL jednolančane DNA („DNA carrier“), 45 µL PCR produkta i 5 µL sterilne destilirane vode. Smjesa je zatim vorteksirana do homogenosti i inkubirana u termobloku 30 minuta na 30 °C nakon čega je slijedio temperaturni šok na 42 °C u trajanju od 20 minuta. Uzorak se zatim centrifugira 15 sekundi na 8000 o/min, supernatant se uklanja, a talog se resuspendira u 5 ml YPD podloge. Nakon inkubacije kvasca na tresilici pri 30 °C 4 sata stanice kvasca se centrifugiraju 5 minuta na 3000 o/min, resuspendiraju u 100 µL sterilne destilirane vode te se nacijepe na krutu YPD podlogu koja sadrži antibiotik higromicin i inkubiraju pri 30 °C do porasta kolonija (3 dana).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog eksperimentalnog rada bio je obilježiti četiri proteina stanične stijenke – Pir1, Pir3, Pir5 i Spr1 s hemaglutininskom oznakom kako bi omogućili njihovo praćenje tijekom različitih faza životnog ciklusa u daljnjim eksperimentima. Hemaglutininska oznaka, kao i higromicinski marker sadržani su u plazmidu pYM16 izoliranom iz bakterije *E. coli*. Kako bi se omogućilo praćenje proteina Pir3, Pir5 i Spr1 i njihova usporedba u mitozu i mejozi HA oznaka je dodana iza tih proteina u divljem soju kvasca *S. cerevisiae* JHY222 koji je diploidan soj. Za usporedbu razine proteina Pir1 i Pir3 u logaritamskoj i stacionarnoj fazi dodana je HA oznaka iza tih proteina u haploidnim sojevima BMA41 divljeg tipa i BMA41 *rrp6* mutanta.

4.1. Provjera prisutnosti izoliranog plazmida pYM16 restrikcijskom analizom

Nakon izolacije plazmida pYM16 iz bakterije *E. coli* korištenjem metode koja je opisana u materijalima i metodama poglavlje 3.2.2., napravljena je restrikcijska analiza s tri enzima, HindIII, BglI i PvuI kako bi se provjerila uspješnost izolacije i prisutnost plazmida pYM16. Nastali fragmenti razdvojeni su gel elektroforezom u agaroznom gelu. Restrikcijska endonukleaza HindIII cijepa plazmid na jednom mjestu kojim se dobiva linearna molekula DNA veličine 4401 parova baza (pb). BglI i PvuI su restrikcijske endonukleaze koje cijepaju plazmid na dva mjesta, cijepanjem enzimom BglI dobivaju se fragmenti dugi 1251 pb i 3150 pb te cijepanjem enzimom PvuI se dobivaju fragmenti dugi 2457 pb i 1994 pb.

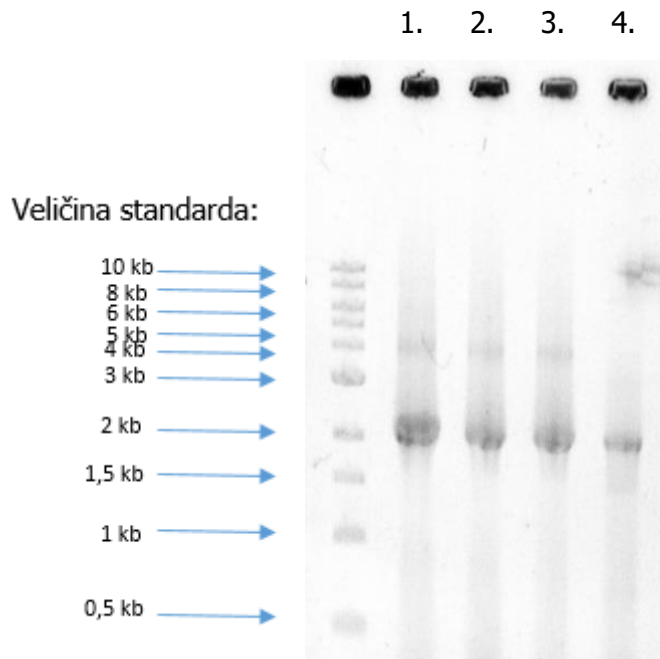


Slika 4. Provjera prisutnosti plazmida restrikcijskom analizom s enzimima 1. HindIII, 2. BglI i 3. PvuI

Slika 4. prikazuje provjeru prisutnosti plazmida pYM16 nakon restrikcijske analize enzimima HindIII, BglI i PvuI. Na 1%-tnom agaroznom gelu vidljive su vrpce veličine oko 4000 pb u prvom stupcu, zatim vrpce veličine oko 1000 pb i 3000 pb u drugom stupcu te dvije vrpce veličine oko 2000 pb u trećem stupcu. Time je potvrđeno da je izolirani plazmid upravo pYM16. Za transformaciju kvasca potrebno je umnožiti HA oznaku i higromicinski marker iz izoliranog plazmida.

4.2. Lančana reakcija polimerazom

Umnažanje dijela plazmida koji sadrži hemaglutininsku oznaku (HA) i regiju odgovornu za rezistenciju na higromicin provedeno je lančanom reakcijom polimeraze, PCR-om. Napravljena su četiri različita PCR-a s početnicama koje odgovaraju genima iza kojih se dodaje hemaglutininska oznaka, a to su *PIR1*, *PIR3*, *PIR5* i *SPR1*.

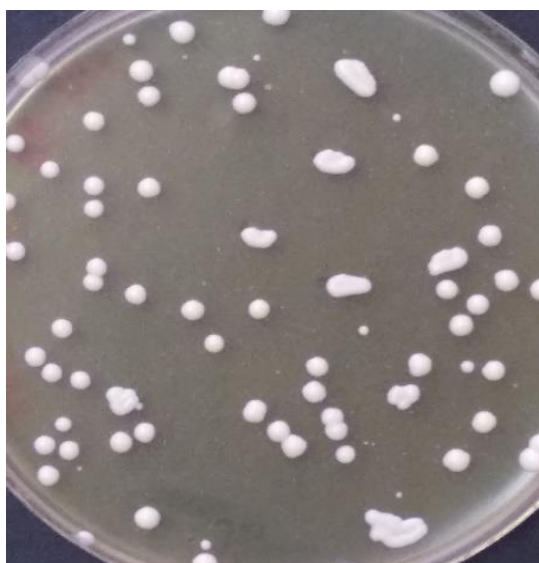


Slika 5. Provjera uspješnosti produkata lančane reakcije polimerazom 1. PCR produkt *PIR1-HA*, 2. PCR produkt *PIR3-HA*, 3. PCR produkt *PIR5-HA* i 4. PCR produkt *SPR1-HA*

Dodavanje HA oznake iza gena PCR metodom je brza i široko korištena metoda za označavanje proteina *in vivo* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (Janke i sur., 2004). Slika 5. prikazuje provjeru uspješnosti produkata lančane reakcije polimerazom. Uspješnost PCR reakcije provjerena je na 1%-tnom agaroznom gelu na kojem su vidljive vrpce veličine oko 2000 parova baza što odgovara veličini PCR – produkta te na temelju toga zaključujemo kako je lančana reakcija polimerazom uspješno provedena.

4.3. Transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Transformacija je provedena u soju kvasca BMA41 divljeg tipa i BMA41 *rrp6* mutanta te soju JHY222 divljeg tipa. U soj BMA41 divlji tip i mutant *rrp6* dodana je HA oznaka iza proteina Pir1 i Pir3, dok je u soj JHY222 divljeg tipa HA oznaka dodana iza proteina Pir1, Pir5 i Spr1. Transformirani kvasac naciepljen je na hranjivu podlogu s antibiotikom higromicinom. Na pločama koje sadrže ovaj antibiotik naraslo je između 30 i 60 kolonija za svaku transformaciju što je prva potvrda o uspješno provedenoj transformaciji. Ovim eksperimentom je dobiveno sedam novih sojeva kvasaca čiji je genotip naveden u tablici 5. Slika 6. prikazuje hranjivu podlogu s poraslim kolonijama transformiranog kvasca soja JHY222 divljeg tipa u kojemu je dodana HA oznaka iza proteina Pir5.



Slika 6. Porasle kolonije nakon transformacije kvasca soja JHY222 divljeg tipa s produktom PCR-a dobivenog početnicama PIR5 for i PIR5 rev.

Tablica 5. Genotip konstruiranih sojeva kvasaca.

IME	GENOTIP
BMA41 wt PIR1-HA	MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 PIR1-HA
BMA41 rrp6 PIR1-HA	MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp6::KanMX4 PIR1-HA
BMA41 wt PIR3-HA	MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 PIR3-HA
BMA41 rrp6 PIR3-HA	MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp6::KanMX4 PIR3-HA
JHY222 wt PIR3-HA	MATa/MATαHAP1/HAP1MKT1(D30G)/MKT1(D30G) RME1(INS308A)/RME1(INS308A)TAO3(E1493Q)/TAO3(E1493Q) PIR3-HA
JHY222 wt PIR5-HA	MATa/MATαHAP1/HAP1MKT1(D30G)/MKT1(D30G) RME1(INS308A)/RME1(INS308A)TAO3(E1493Q)/TAO3(E1493Q) PIR5-HA
JHY222 wt SPR1-HA	MATa/MATαHAP1/HAP1MKT1(D30G)/MKT1(D30G) RME1(INS308A)/RME1(INS308A)TAO3(E1493Q)/TAO3(E1493Q) SPR1-HA

Transformacija kvasca provedena je po postupku objašnjenom u poglavlju 3.2.8. Transformacija kvasca *S. cerevisiae* metodom pomoću litijeva acetata. Transformanti kvasca sadrže HA oznaku iza gena koji kodiraju za proteine Pir1, Pir3, Pir5 i Spr1 te marker za antibiotik higromicin koji omogućava rast transformanata na selektivnoj podlozi koja sadrži ovaj antibiotik. Porastom kolonija transformanta na selektivnoj podlozi (slika 6.) zaključujemo kako je transformacija kvasca uspješna, međutim dobivene transformante potrebno je dodatno provjeriti.

Transformanti se mogu provjeriti uporabom Western blot metodom. Western blot ili imunoblot je metoda koja se često koristi za odvajanje i identifikaciju proteina. Ova metoda sastoji se od tri koraka kojima prethodi izolacija proteina prema protokolu ovisnom o tipu stanice iz koje se protein izolira. Nakon izolacije slijedi razdvajanje proteina na temelju veličine. Razdvajanje proteina provodi se SDS elektroforezom. Izolirani proteini tretiraju se SDS puferom čime postaju negativno nabijeni što omogućava kretanje u električnom polju. Proteini veće molekulske mase kreću se sporije kroz mrežu gela, dok se oni manje molekulske mase kreću brže te se na taj način vrši razdvajanje proteina na temelju veličine. Sljedeći korak je prijenos razdvojenih proteina na nitroceluloznu membranu. Prijenos se provodi pomoću električnog polja orijentiranog okomito na površinu gela zbog čega se proteini kreću prema pozitivnom

naboju te se vežu za membranu nekovalentnim vezama. Prije trećeg koraka provodi se blokiranje membrane kako ne bi došlo do nespecifičnog vezanja antitijela na prazna mjesta u membrani. Treći korak uključuje obilježavanje ciljanog proteina primjenom odgovarajućeg primarnog i sekundarnog antitijela za vizualizaciju. Primarno antitijelo dodaje se na membranu te se veže za ciljani protein. Ukoliko primarno antitijelo nije obilježeno, dodaje se sekundarno označeno antitijelo koje se veže za primarno u kompleks koji se detektira. Ovako označeni protein može se detektirati na različite načine od kojih je najčešći upotreba antitijela konjugiranih peroksidazom iz hrena koja stvara produkt iz kojeg se oslobađaju fotoni svjetla. Fotoni se detektiraju pomoću rendgenskog filma koji se razvija u tamnoj komori. Na ovaj način moguće je provesti istovremenu detekciju proteina i kvantifikaciju njegove ekspresije (Mahmood i Yang, 2012).

5. ZAKLJUČAK

- 1) Uspješno je provedena transformacija kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* te izolacija plazmidne DNA pYM16
- 2) Uspješno je provedeno umnažanje hemaglutininske oznake i higromicinskog markera metodom lančane reakcije polimeraze
- 3) Uspješno je provedena transformacija različitih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* metodom transformacije pomoću litijeveg acetata (LiAc).

6. LITERATURA

- Bekatorou A., Psarianos C., Koutinas A. A. (2006) Production of food grade yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, **44**(3): 407–415.
- Castillo L., Martínez A. I., Garcerá A., Elorza M. V., Valentín E., Sentandreu, R. (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: The repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan. *Yeast*, **20**(11): 973–983.
- De Groot P. W. J., Ruiz C., De Vázquez Aldana C. R., Duenas E., Cid V. J., Rey F. Del, Rodríguez-Peña J. M., Pérez P., Andel A., Caubín J., Arroyo J., García J. C., Gil C., Molina M., García L. J., Nombela C., Klis F. M. (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**(3): 124–142.
- Duina A. A., Miller M. E., Keeney J. B. (2014) Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, **197**(1): 33–48.
- Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mersa V., Tanner W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(17): 11523–11529.
- Fleet G. H. (1985) Composition and structure of yeast cell walls. *Current Topics in Medical Mycology*, **1**(132): 24–56.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. (1996) Life with 6000 Genes conveniently among the different interna- Old Questions and New Answers The genome . At the beginning of the se- of its more complex relatives in the eukary- *Saccharomyces cerevisiae* has been completely sequenced *Schizosaccharomyces pombe* indicate. *Science*, **274**(October): 546–567.
- Grba S. (2010) *Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji*, 1. izd., Plejada. str. 39-68.
- Herskowitz I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Microbiological Reviews*.
- Holaway B. L., Kao G., Finn M. C., Clancy M. J. (1987) Transcriptional regulation of sporulation genes in yeast. *MGG Molecular & General Genetics*, **210**(3): 449–459.

- Janke C., Magiera M. M., Rathfelder N., Taxis C., Reber S., Maekawa H., Moreno-Borchart A., Doenges G., Schwob E., Schiebel E., Knop, M. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, **21**(11): 947–962.
- Kapteyn J. C., Van Egmond P., Sievi E., Van Den Ende H., Makarow M., Klis F. M. (1999) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and β 1,6-glucan-deficient mutants. *Molecular Microbiology*, **31**(6): 1835–1844.
- Klis F. M., Boorsma A., De Groot P. W. J. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23**(3): 185–202.
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. In *FEMS Microbiology Reviews*.
- Mahmood T., Yang P. C. (2012) Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, **4**(9): 429–434.
- Mrša V., Tanner W. (1999) Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (Members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*, **15**(10 A): 813–820.
- Muthukumar G., Suhng S. H., Magee P. T., Jewell R. D., Primerano D. A. (1993) The *Saccharomyces cerevisiae* SPR1 gene encodes a sporulation-specific exo- 1,3- β -glucanase which contributes to ascospore thermoresistance. *Journal of Bacteriology*, **175**(2): 386–394.
- Neiman A. M. (2011) Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **189**(3): 737–765.
- Orlean P. (2012) Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, **192**(3): 775–818.
- Sherman F. (2002) Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, **350**(2002): 3–41.
- Strathern J., Hicks J., Herskowitz I. (1981) Control of cell type in yeast by the mating type locus. The α 1- α 2 hypothesis. *Journal of Molecular Biology*, **147**(3): 357–372.
- Sumita T., Yoko-o T., Shimma Y., Jigami Y. (2005) *Ordenación de diácono - Ritual*. **4**(11): 1872–1881.

- Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2010) Incorporation of homologous and heterologous proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Food Technology and Biotechnology*, **48**(3): 317–328.
- Walker G. M. (2009) Yeasts. *Encyclopedia of Microbiology*, 478–491.
- Yin Q. Y., De Groot P. W. J., 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**(21): 20894–20901.
- Yun D. J., Zhao Y., Pardo J. M., Narasimhan M. L., Damsz B., Lee H., Abad L. R., D'Urzo M. P., Hasegawa P. M., Bressan R. A. (1997) Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**(13): 7082–7087.
- Zlotnik H., Pilar Fernandez M., Bowers B., Cabib E. (1984) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *Journal of Bacteriology*, **159**(3): 1018–1026.

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.

Matea Škarupka

Matea Škarupka