

Unošenje mutacija u gen SCW4 kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i ispitivanje utjecaja uvedenih mutacija na vezanje Scw4 proteina u staničnu stijenku

Hrestak, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:593938>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2021.

Dora Hrestak
1276/BPI

**UNOŠENJE MUTACIJA U GEN
SCW4 KVASCA *Saccharomyces
cerevisiae* I ISPITIVANJE
UTJECAJA UVEDENIH
MUTACIJA NA VEZANJE Scw4
PROTEINA U STANIČNU
STIJENKU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Renate Teparić.

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Renati Teparić na nesebičnoj pomoći i mnogobrojnim savjetima pruženim tijekom izrade ovog rada. Veliko 'hvala' na beskrajnoj količini strpljenja i razumijevanja kad je bilo najpotrebnije te pristupačnosti van svih vremenskih okvira.

Također se zahvaljujem prof.dr.sc. Vladimiru Mrši na svim pruženim prilikama, ukazanom povjerenju i vjeri u moje sposobnosti koja me motivirala u trenucima kolebanja. Hvala na svakodnevnim riječima podrške koje su pomogle sačuvati moju nadu u bolje 'sutra' i ljude koji 'sutra' čine ljepšim mjestom.

Od srca zahvaljujem obitelji i prijateljima - mojoj potpori iza kulisa koja je imala ključnu ulogu u održavanju moje radoznalosti i pozitivnog stava. Sati utrošeni na slušanje varijacija istih problema i repetitivno savjetovanje ne mogu se izbrojati, ali čine vas velikim ljudima u mojem malom svijetu i najvećim blagom koje posjedujem.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

UNOŠENJE MUTACIJA U GEN *SCW4* KVASCA *Saccharomyces cerevisiae* I ISPITIVANJE UTJECAJA UVEDENIH MUTACIJA NA VEZANJE Scw4 PROTEINA U STANIČNU STIJENKU

Dora Hrestak, 1276/BPI

Sažetak: Scw4 protein u stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae* veže se kovalentnim i nekovalentnim vezama, međutim, točan mehanizam kovalentnog povezivanja i dalje je nepoznat. Polazišna je pretpostavka da je način vezanja sličan onome PIR proteina, s obzirom na jednak način ekstrakcije kovalentno vezane frakcije ovog proteina iz stijenke. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti koja je aminokiselina odgovorna za kovalentno vezanje Scw4 u stijenku kvasca. U ciljanu regiju gena *SCW4* uvedene su mutacije, a uzgoj mutanata proveden je u nepuferiranom mediju, te pri pH=4 i pH=7. Nakon uzgoja nekovalentno vezani proteini su izolirani iz stijenki pomoću vrućeg SDS-a, a kovalentno vezani pomoću 30 mM NaOH. Dobiveni proteinski ekstrakti analizirani su Western blot metodom. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti kako je za kovalentno vezanje Scw4 u stijenku *S. cerevisiae* odgovoran ostatak glutamina Q₂₄₁.

Ključne riječi: japsinske proteaze, Kex2 proteaza, stanična stijenka, *Saccharomyces cerevisiae*, Scw4

Rad sadrži: 48 stranica, 21 slika, 10 tablica, 63 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Renata Teparić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. Vladimir Mrša
2. prof.dr.sc. Renata Teparić
3. prof.dr.sc. Irena Landeka Jurčević
4. doc.dr.sc. Igor Stuparević

Datum obrane: 15. siječnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

INTRODUCTION OF MUTATIONS IN THE SCW4 GENE OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AND INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF INTRODUCED MUTATIONS ON BINDING OF Scw4 PROTEIN IN THE CELL WALL

Dora Hrestak, 1276/BPI

Abstract: The Scw4 protein of *Saccharomyces cerevisiae* yeast can be bound both covalently and non-covalently to the cell wall, however, the exact mechanism of covalent binding is still unknown. The initial assumption is that the binding mechanism is similar to that of PIR proteins, given the same method of extraction of covalently bound fraction of these proteins from the yeast cell wall. The aim of this study was to determine which amino acid is responsible for covalent binding of Scw4 to the yeast wall. Mutations were introduced into the target region of the *SCW4* gene, followed by the cultivation in an unbuffered medium, as well as at pH=4 and pH=7. After cultivation, non-covalently bound proteins were isolated by hot SDS, while covalently bound proteins were extracted by 30 mM NaOH. Protein extracts were analyzed by the Western blot method. The obtained results showed that glutamine Q₂₄₁ is responsible for covalent binding of Scw4 to the cell wall of *S. cerevisiae*.

Keywords: cell wall, Kex2 protease, *Saccharomyces cerevisiae*, Scw4, Yapsins

Thesis contains: 48 pages, 21 figures, 10 tables, 63 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph.D. Renata Teparčić, Full Professor

Reviewers:

1. PhD Vladimir Mrša, Full professor
2. PhD Renata Teparčić, Full professor
3. PhD Irena Landeka Jurčević, Full professor
4. PhD Igor Stuparević, Assistant professor

Thesis defended: 15 January 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. STANIČNA STIJENKA KVASCA.....	2
2.3. POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE.....	3
2.3.1. Glukan.....	4
2.3.2. Hitin	5
2.3.3. Manan.....	7
2.4. PROTEINI STANIČNE STIJENKE.....	8
2.4.1. Nekovalentno vezani proteini	8
2.4.2. Kovalentno vezani proteini.....	10
2.4.3. Scw4 protein.....	11
2.5. PROTEOLITIČKI ENZIMI KOJI SUDJELUJU U PROCESIRANJU PROTEINA STANIČNE STIJENKE	12
2.5.1. Proteaza Kex2	12
2.5.2. Proteaze iz porodice japsina.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Sojevi kvasca.....	15
3.1.3. Sojevi bakterija	15
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca.....	15
3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj bakterija	16
3.1.6. Plazmidi	17
3.2. METODE.....	21
3.2.1. Lančana reakcije polimeraze	21
3.2.2. Uvođenje mutacije u gen SCW4 PCR metodom.....	22
3.2.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	23
3.2.4. Transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>Escherichia coli</i>	23
3.2.5. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije <i>E. coli</i> ("mini prep")	24
3.2.6. Restriksijska analiza plazmida	24
3.2.7. Određivanje koncentracije DNA.....	24

3.2.8. Transformacija stanica kvasca LiAc metodom.....	24
3.2.9. Uzgoj kvasca uz indukciju <i>GAL</i> promotora	25
3.2.10. Izolacija staničnih stijenki kvasca	25
3.2.11. Izolacija nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke.....	26
3.2.12. Izolacija kovalentno vezanih proteina stanične stijenke.....	26
3.2.13. SDS elektroforeza u poliakrilamidnom gelu	26
3.2.14. Western blot.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	209
4.1. UVOĐENJE MUTACIJE U CILJANU REGIJU GENA <i>SCW4</i> PCR METODOM.....	30
4.2. RESTRIKCIJSKA ANALIZA PLAZMIDA.....	31
4.3. TRANSFORMACIJA KVASCA.....	34
6. ZAKLJUČCI	42
7. LITERATURA.....	43

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, jednostanični eukariotski organizam iz carstva *Fungi*, koji je u širokoj primjeni kao modelni organizam u laboratorijskim istraživanjima stanica eukariota, te kao idealan mikroorganizam za industrijske procese fermentacije. Oblik i čvrstoća *S. cerevisiae* definirana je njegovom staničnom stijenkom koja ujedno osigurava fleksibilnost. Njezin vanjski sloj čine manoproteini za koje se pretpostavlja da ograničavaju propusnost te određuju površinska svojstva stanice (Grbavac i sur., 2017). Unutrašnjost stanične stijenske nastaje umrežavanjem polisaharida β -1,3-glukana s β -1,6-glukanom i hitinom (Mrša i sur., 1997), a na polisaharidne komponente stijenske vežu se proteini. Razlikujemo nekovalentno vezane proteine koji se iz stijenske izoliraju pomoću vrućeg SDS-a, kovalentno vezane proteine koji se izoliraju djelovanjem glukanaza (Mrša i sur., 2007), te kovalentno vezane PIR (engl. Proteins with Internal Repeats) proteine koji se iz stijenske mogu izolirati prekonoćnom inkubacijom na +4 °C u 30 mM NaOH (Mrša i sur., 1997).

Scw4 protein prvotno se smatrao nekovalentno vezanim proteinom, međutim, daljnjim istraživanjima ustanovljeno je kako se veže i kovalentnim interakcijama u stijenku kvasca (Teparić i sur., 2007). Način njegova vezanja uvelike ovisi o posttranslacijskim modifikacijama, pri čemu značajan utjecaj imaju proteolitički enzimi Kex2 i japsinske proteaze. Usprkos dosadašnjim saznanjima, točan mehanizam odgovoran za kovalentno vezanje Scw4 ostaje nepoznanica, ali, zbog načina njegove izolacije, smatra se kako bi mogao biti sličan mehanizmu vezanja PIR-eva. PIR proteini kovalentno se povezuju sa staničnom stijenkom pomoću određenog glutaminskog ostatka. Iz tog razloga, za provedbu daljnjih eksperimenata bila je zanimljiva regija Scw4 proteina koja sadrži glutaminske ostatke najsličnije raspoređene onima u PIR sekvenci. Cilj ovog rada bio je uvesti mutacije u tu regiju gena *SCW4*, izolirati proteine iz uzgojenih mutanata, te Western blot metodom ustanoviti da li je neki od glutaminskih ostataka u ovoj regiji Scw4 proteina odgovoran za njegovo kovalentno vezanje u stijenku kvasca.

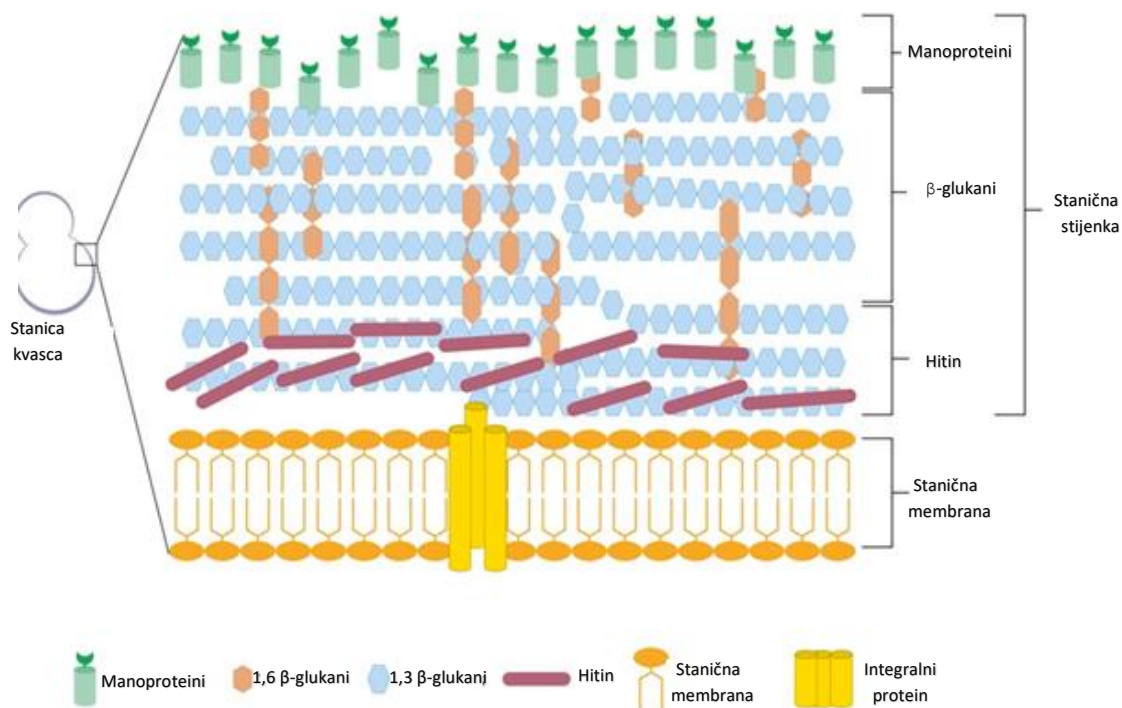
2. TEORIJSKI DIO

2.1. KVASAC *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je jednostanični eukariotski mikroorganizam, a spada u carstvo gljiva. Razmnožava se spolno (mejozom) ili nespolno (pupanjem), a karakterizira ga jednostavna genetička manipulacija, kratko generacijsko vrijeme, te potpuno sekvencionirani genom (Goffeau i sur., 1996). Optimalna temperatura za rast mu je od 28 do 30 °C, tijekom kojeg može koristiti različite šećere kao supstrate. U današnje vrijeme korišten je u mnogobrojnim znanstvenim istraživanjima i industrijskim postupcima zbog svoje tolerancije na različite pH-vrijednosti, visoke koncentracije etanola te nisku razinu kisika.

2.2. STANIČNA STIJENKA KVASCA

Dvoslojna stijenka ekstracelularni je organel koji predstavlja glavnu zaštitu stanice od vanjskih mehaničkih oštećenja (Eamus i Jennings, 1986.) i određuje joj oblik. Usprkos svojoj čvrstoj strukturi, fleksibilna je i elastična, te podložna kemijskim i fizikalnim promjenama (Teparić i Mrša., 2013). Njezin većinski dio čine ugljikohidrati (oko 90 %), a sadrži oko 10 % proteina. Osmotsku i mehaničku stabilnost osigurava unutarnji sloj stijenke građen od β -1,3-glukana (50 %), manana (35 %), β -1,6-glukana (5 %) i hitina (1-2 %) (Mrša i sur., 1997), pri čemu je razgranati β -1,3-glukan vezan za hitin i β -1,6-glukan kovalentnim vezama. Površinska svojstva i permeabilnost određene su vanjskim slojem koji se sastoji od manoproteina (Teparić, 2005). On je također odgovoran za komunikaciju stanice s okolinom, a manoproteini vezani su za glukane stijenke kovalentnim ili nekovalentnim vezama (Hartland i sur., 1994; Osumi, 1998; Osumi; 2012). Građa stanične stijenke prikazana je na slici 1. Proteini stijenke doprinose naboju i hidrofobnosti stijenke (Kollár i sur., 1997; Lipke i Ovalie, 1998), a osim toga imaju važnu ulogu u interakcijama između stanica tijekom procesa aglutinacije i flokulacije. Međutim, usprkos mnogim provedenim istraživanjima, konkretna uloga većine proteina stanične stijenke ostaje nepoznanica.



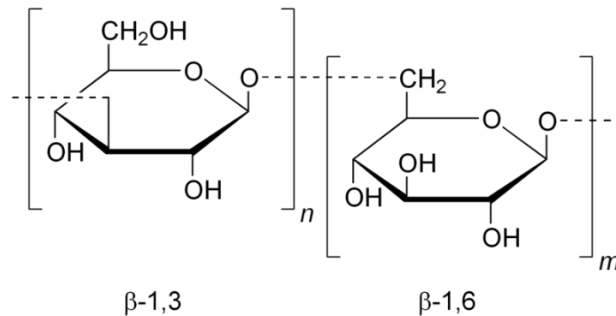
Slika 1. Građa stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Anonymous 1, 2019).

2.3. POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE

β -1,3-glukan i β -1,6-glukan građeni od glukoze, te hitin građen od N-acetilglukoamina polimeri održavaju oblik stanice, njezinu osmotsku stabilnost i mehaničku čvrstoću. Manan je polimer manoze koji čini ugljikohidratni dio manoproteina stijenke, a zaslužan je za njezinu propusnost. Jedini je polisaharid koji se nalazi na vanjskoj strani stijenke, a za proteine se veže tijekom procesa glikolizacije.

2.3.1. Glukan

Dvije vrste polimera glukoze koji čine staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae* su β -1,3-glukan i β -1,6-glukan (slika 2).



Slika 2. Prikaz strukturnih formula β -1,3-glukana i β -1,6-glukana (Anonymous 2, 2018).

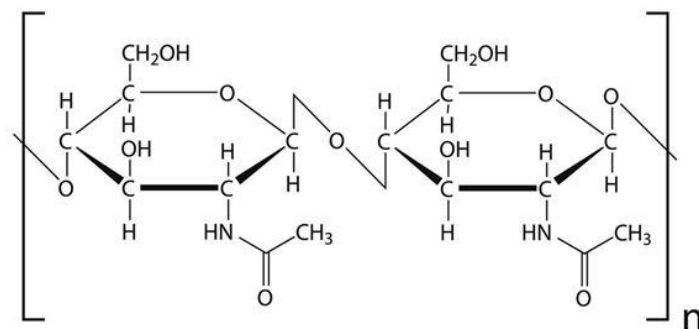
β -1,3-glukan ravnolančani je polimer nastao povezivanjem oko 1500 glukoznih jedinica, a stupanj polimerizacije ovisi o vanjskim čimbenicima, izvoru ugljika i fazi rasta (Klis i sur., 2002). Tri ovakva polisaharidna lanca povezivanjem vodikovim vezama mogu formirati strukturu uzvojnice koja stijenci daje oblik i čvrstoću. S ostalim dijelovima stijenke vezan je kovalentno, pri čemu su njegovi nereducirajući krajevi unakrsno povezani β -1,4-glikozidnom vezom s reducirajućim krajevima lanaca hitina (Lesage i Bussey, 2006). Sintaza β -1,3-glukana odvija se u citoplazminoj membrani, a katalizirana je multienzimskim kompleksom β -1,3-glukan sintazom (Qadota, 1996). β -1,3-glukan sintaza sastoji se od dvije katalitičke (Fks1 i Gsc2/Fks2) te jedne regulatorne (Rho1 GTPaza) podjedinice. Aktivacija enzima vrši se preko Rom2 proteina pomoću senzornog proteina Wsc1, a inhibicija djelovanjem Lrg1 proteina koji pripada grupi proteina skupine Rho1 (Watanabe i sur., 2002).

β -1,6-glukan, visoko razgranati polimer, nastaje povezivanjem oko 130 monomera glukoze pomoću UDP-glukoza-ovisnog enzima β -1,6-glukan sintaze (Orlean, 2002), pri čemu se na svakoj petoj glukozi nalaze mjesta grananja. β -1,6-glukan sudjeluje u stabilizaciji stanične stijenke zbog kovalentnog vezanja na β -1,3-glukan, hitin i manoproteine, povezujući međusobno sve komponente stijenke (Lipke i Ovalie, 1998). Topiv je u vodi, potencijalno ima ulogu akceptora za vezanje hitina u slučaju staničnog stresa, a može se ukloniti enzimom β -1,6-glukanazom. U sintezu β -1,6-glukana uključeno je više od 20 gena *KRE* skupine te njihovi

homolozi *SKNI* i *KNHI*, a na njegovu količinu velik utjecaj imaju proteini smješteni u endoplazmatskom retikulumu, staničnoj membrani te Golgijevu tijelu (Klis i sur., 2002; Aimanianda i sur., 2009).

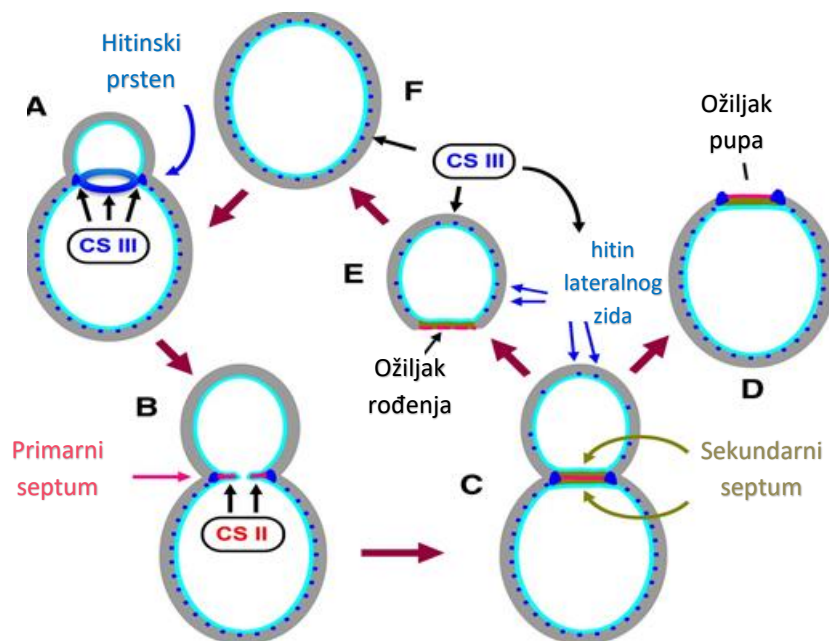
2.3.2. Hitin

Koncentriran u ožiljcima pupova stijenke, linearni polimer N-acetilglukoamina (GlcNac) nastaje djelovanjem enzima hitin sintaze koji katalizira reakciju povezivanja oko 190 monomernih jedinica β -1,4-glikozidnom vezom (slika 3). Kristalična struktura α -hitina slična je onoj α -celuloze, pri čemu su antiparalelni lanci N-acetilglukoamina međusobno povezani vodikovim vezama koje doprinose stabilizaciji kristala. Vodikove veze između amidnih grupa i hidrofobna jezgra kristala građena od acetamidometilnih grupa onemogućavaju otapanje hitina u vodi (Lipke i Ovalie, 1998). Lanci hitina nereducirajućim se krajevima vežu za β -1,3-glukan i β -1,6-glukan, a njegova sinteza i ugradnja u stijenku odvija se neposredno nakon citokineze. Udio hitina u bočnim zidovima stijenke i ožiljcima stanice majke iznosi samo oko 2% (Shaw i sur., 1991). Međutim, usprkos njegovoj maloj količini, hitin ima važnu strukturnu ulogu. Sinteza hitina aktivira se kao mehanizam spašavanja kod stanica s oslabljenom stijenkom, kada udio hitina u bočnim zidovima stanica može porasti i do 20 % (Dallies i sur., 1998; Garcia-Rodriguez i sur., 2000).



Slika 3. Prikaz strukturne molekule hitina (Anonymous 3, 2020).

U stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* sinteza hitina regulirana je pomoću tri hitin sintaze koje su aktivne u staničnoj membrani. Sva tri enzima – hitin sintaza I (Chs1), hitin sintaza II (Chs2) i hitin sintaza III (Chs3), pripadaju skupini GT2 invertirajućih glikoziltransferaza koje kao donore monomernih jedinica koriste UDP-N-acetilglukozamin. Hitin sintaza I produkt je gena *CHS1*. Membranski je protein koji katalizira prijenos N-acetilglukozamina s UDP-GlcNac na nereducirajući kraj rastućeg lanca hitina. Protein Chs3 zaslužan je za sintezu hitina oko pupa (Shaw i sur., 1991). Hitinski prsten formira se neposredno nakon pojave pupa, a sinteza hitina nastavlja se u centripetalnom smjeru. Na taj način stanica majka odvaja se od kćeri, a nastali primarni septum omogućava odvajanje membrana i citoplazmi. Sekundarni septum nastaje vezanjem β -glukana i manana s obje strane primarnog septuma, nakon čega se razdvajaju stanice. Zbog hidrolize hitinskih lanaca na stanici kćeri ostaje „ožiljak rođenja“, dok na stanici majci ostaje „ožiljak pupa“ (Powell i sur., 2003). Uloga hitin sintaze I i II tijekom formiranja pupa prikazana je na slici 4.

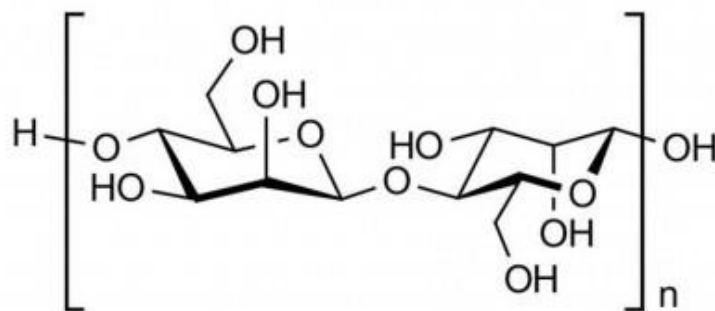


Slika 4. Prikaz uloga hitin sintaze I i hitin sintaze II tijekom rasta pupa (Orlean, 2012).

2.3.3. Manan

Manan (slika 5) čini ugljikohidratni dio (50 – 95 %) manoproteina koji su smješteni u vanjskom sloju stanične stijenke. Razgranati je polisaharid, a pridonosi stabilnosti konformacije proteina. S obzirom na tip glikozilacije manoproteina, razlikujemo N-glikozilirane asparaginske ostatke te O-glikozilirane serinske i/ili treoninske ostatke. Poremećaji u procesima glikozilacije proteina letalni su za stanicu, što znači da je glikozilacija neophodna za rast kvasca (Lesage i Bussey, 2006). Glikozilacija započinje u endoplazmatskom retikulumu tijekom sinteze proteina, a završava u Golgijevu tijelu. O-glikozidni lanci linearni su i kratki, te sadrže do pet manoznih jedinica koje se međusobno vežu α -1,2- i α -1,3-glikozidnim vezama. Nasuprot tome, N-glikozidni lanci sadrže razgranati unutarnji dio čije manozne jedinice mogu biti vezane β -1,2-, β -1,3- i β -1,6-glikozidnim vezama, pri čemu β -1,2- i β -1,3-glikozidne veze povezuju pobočne ogranke manoznih lanaca.

Osim N- i O-glikozilacije, poznata su još dva načina na koja se proteini mogu glikozilirati. Prvi način podrazumijeva vezanje oligosaharida sačinjenih od miješanih glukozno-manoznih lanaca gdje u podjednakim omjerima sudjeluju α -1,6-vezane glukoze. Dokaz da takvi lanci nisu N-glikozidno vezani je nemogućnost njihovog uklanjanja digestijom s endo H ili peptido-N-glikozidazom F (van Rinsum i sur., 1991; Montijn i sur., 1994). Još jedan način modifikacije proteina stijenke je dodatak glikozilfosfatidilinozitol (GPI) sidra koje sadrži jedinice manoze na C-terminus proteina.



Slika 5. Prikaz strukturne molekule manana (Anonymous 4, 2021).

2.4. PROTEINI STANIČNE STIJENKE

Manoproteini smješteni u vanjskom sloju stanične stijenke čine samo oko 35 % njezine suhe tvari, a obzirom na način vezanja svrstavaju se u dvije velike skupine. Proteini vezani nekovalentno na β -1,3-glukan pripadaju prvoj skupini i čine oko 80 % ukupnih proteina stijenke, dok u drugu spadaju proteini kovalentno vezani na glukan stanične stijenke. Kovalentno vezane proteine još možemo podijeliti na dvije podskupine. GPI-proteini vežu se na β -1,6-glukan preko ostatka GPI-sidra (Montijin i sur., 1994; van der Vaart i sur., 1995; Kapteyn i sur., 1996), dok PIR (Proteins with Internal Repeats) proteine karakterizira esterska veza između γ -karboksilne grupe specifičnog ostatka glutaminske kiseline proteina i hidroksilne grupe glukoze β -1,3-glukana stijenke (Ecker i sur., 2006).

2.4.1. Nekovalentno vezani proteini

Nekovalentno vezani proteini većinom su O-glikozilirani (Cappellaro i sur., 1998), a pretpostavlja se da imaju ulogu u pregradnji β -glukana tijekom pupanja, parenja i sporulacije kvasca (Teparić i sur., 2010). Iz stijenke se mogu izolirati zagrijavanjem na temperaturu od 95 – 100 °C uz dodatak SDS-a i β -merkaptetanola (Mrša i sur., 1997) ili prekonoćnom inkubacijom na temperaturi od 4 °C uz dodatak 2 mM ditiotreitola (DTT) (Cappellaro i sur., 1998). Proteini koji se mogu izolirati na spomenuta dva načina prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke kvasca

Scw-PROTEIN	VELIČINA (kDa)	FUNKCIJA
Cts1 / Scw2	116	hitinaza
Scw3	95	homolog glukanazama
Scw4	66	homolog glukanazama
Scw10	66	homolog glukanazama
Exg1 / Scw6	44	egzoglukanaza
Scw8 / Ccw5	41	nepoznata
Bgl2/ Scw9	29	endoglukanaza/transglukanaza

Prvi opisani proteini stanične stijenke su hitinaza (Cts1/Scw2) i egzoglukanaza (Exg1/Scw6). Dosadašnja istraživanja njihove lokalizacije pokazuju kako se samo oko 10 % svakog od ovih proteina ugrađuje u staničnu stijenku, dok se ostatak izlučuje u podlogu. Hitinaza vezana za stijenku fiziološki je aktivna, a protein Cts1 smatra se odgovornim za odvajanje stanice kćeri od stanice majke nakon stvaranja primarnog/sekundarnog septuma i razgradnje hitinskog prstena. Protein Exg1 ima egzo- β -1,3-glukanaznu aktivnost, međutim, njegova funkcija i supstrat i dalje su nepoznati. Cts2 protein homologan je hitinazama, a uključen je u proces sporulacije (Dünkler i sur., 2008).

Prvi izolirani nekovalentno vezani protein je Bgl2 koji ima egzoglukanaznu te transglikozidaznu aktivnost, ovisno o koncentraciji supstrata (Goldman i sur., 2005). Rezultati istraživanja pokazuju njegovu homologiju s Scw4, Scw10 i Scw11, pa je to osnovni razlog za pretpostavku da spomenuta tri proteina također pokazuju glukan-remodelirajuću aktivnost (Teparić i sur., 2010). Scw4 i Scw10 identificirani su pročišćavanjem biotiniziranog DTT ekstrakta, a Scw10 može se uspješno detektirati i izolirati isključivo iz *scw4* mutanta. Glavni razlog za to je njihova identična veličina od 66 kDa te 63 %-tna homologija zbog čega jednako putuju u gelu za elektroforezu. Oba proteina sadrže mjesto za procesiranje Kex2 proteolitičkim enzimom i nemaju mjesto za vezanje GPI-sidra (Mrša i sur., 1997). Vidljiva promjena fenotipa nije uočena nakon disrupcije pojedinačnih *SCW4* ili *SCW10* gena, međutim, kod dvostrukog *scw4scw10* mutanta uočena je smanjena sposobnost parenja kao potencijalna posljedica strukturnih promjena stijenke. Uz to, njegova stanična stijenka ima puno manje kovalentno vezanih proteina koji se izoliraju pomoću glukanaza, iz čega se zaključuje da bi proteini Scw4 i Scw10 mogli sudjelovati u kovalentnom vezanju proteina na β -1,6-glukan (Cappellaro i sur., 1998).

Scw8/Ccw5 protein pripada porodici PIR proteina, a nakon izolacije pomoću vrućeg SDS-a može se zaključiti kako se radi o prekursorskom obliku kovalentno vezanog proteina (Mrša i sur., 1997).

2.4.2. Kovalentno vezani proteini

Proteine kovalentno vezane na β -1,6-glukan stanične stijenke dijelimo u dvije podskupine. Prva podskupina obuhvaća proteine vezane na β -1,6-glukan preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra (tzv. „GPI-sidro“), dok u drugu spadaju proteini PIR porodice koji sadrže karakterističnu ponavljajuću sekvencu unutar koje se nalazi glutaminski ostatak zaslužan za vezu s β -1,3-glukanom (Ecker i sur., 2006).

GPI proteini, pretpostavlja se, zaslužni su za remodeliranje stanične stijenke te površinsku hidrofobnost (Klis i sur., 2002). Izoliraju se glukanazama, a mogu biti O-glikozilirani i/ili N-glikozilirani. Vezani su na β -1,6-glukan stijenke preko ostatka GPI-sidra nakon finalnog koraka transglikozilacije i translokacije proteina sa stanične membrane (Orlean, 2012). Proteine ove skupine karakteriziraju tri zajedničke strukturne osobine: posjedovanje regija bogatih serinom i treoninom unutar sekvence, signal na C-terminusu za dodavanje GPI-sidra transamidacijom, te signalna sekvenca za upućivanje u sekretorni put na N-terminalnom kraju. Pet proteina s glukan-remodelirajućom aktivnosti pripada GAS obitelji (Ram i sur., 1995; Popolo i Vai, 1999), a prikazani su u Tablici 2. Flokulini, pripadnici obitelji FLO proteina (Flo1, Flo5, Flo9, Flo10), slični su lektinima i neophodni za flokulaciju, dok u aglutinine spadaju Aga1/Aga2 kompleks i Sag1.

Tablica 2. Kovalentno vezani proteini izolirani pomoću glukanaza

GPI - PROTEIN	VELIČINA (kDa)	FUNKCIJA
Ccw12 / α 0.6	> 300	reguliran α -faktorom
Ccw13 / Dan1	> 300	anaeroban rast
Flo1	> 300	flokulacija
Sed1	300	stacionarne stanice
Ag α 1	250	α -aglutinin
Aga1	73	"core" dio α -aglutinina
Aga2	22	funkcionalni dio α -aglutinina
Tir1 / Srp1	100	anaerobni rast
Cwp1	55	nepoznata
Tip1	80	nepoznata
Cwp2	180	nepoznata
Icwp1 / Ccw1	250	nepoznata

Proteini PIR (eng. Proteins with Internal Repeats) porodice (tablica 3) kovalentno su vezani proteini koji se mogu izolirati iz stijenke prekonocnom inkubacijom na +4 °C u 30 mM NaOH (Mrša i sur., 1997). Karakterizira ih ponavljajuća sekvenca od 11 aminokiselina na N-terminalnom kraju koja je prisutna u 2 – 10 kopija, visoki stupanj homologije, te činjenica da su bogati serinom i treoninom. Osim spomenute ponavljajuće sekvence odgovorne za upućivanje u sekretorni put, sadrže i specifično mjesto za procesiranje Kex2 proteazom (Mrša i sur., 1997). Disrupcija pojedinačnih gena koji kodiraju za PIR proteine nije rezultirala promjenom fenotipa, međutim, disrupcija sva 4 PIR proteina uzrokovala je povećanu osjetljivost na inhibitore sinteze stijenke i promjenu njezinih morfoloških svojstava (Mrša i sur., 1997). Također, stanice četverostrukog mutanta često su nepravilnih oblika i veličina, te rastu u agregatima (Mrša i Tanner, 1999).

Tablica 3. Kovalentno vezani proteini izolirani pomoću 30 mM NaOH

PIR- PROTEIN	VELIČINA (kDa)	FUNKCIJA/REGULACIJA
Ccw5 / Ccw11 / Pir4	41	nepoznata
Ccw6 / Pir1	250	nepoznata
Ccw7 / Hsp150 / Pir2	115	"heat - shock" protein
Ccw8/ Pir3	57	nepoznata

2.4.3. Scw4 protein

Protein Scw4 prvotno je svrstan u skupinu nekovalentno vezanih proteina, s obzirom na to da je detektiran Western blot metodom nakon izolacije i tretmana vrućim SDS-om uz dodatak β -merkaptetoetanolu (Cappellaro i sur., 1998), te ne sadrži GPI-sidro. Teparić i sur. (2010) daljnjim su istraživanjima otkrili kako se Scw4 protein u stijenku veže i kovalentnim i nekovalentnim vezama, što je potvrđeno izolacijom ovog proteina pomoću 30 mM NaOH. Međutim, regija odgovorna za kovalentno vezanje Scw4 u staničnu stijenku nije poznata. Iz tog razloga, povlači se paralela s PIR skupinom proteina čija repetitivna sekvenca QIDGQVQ osigurava njihovo kovalentno vezanje. Osim specifičnih mjesta za djelovanje enzima Kex2 i japsinskih proteaza (Cappellaro i sur., 1998; Mrša i sur., 1997), Scw4 sadrži regiju sličnu QIDGQVQ regiji PIR proteina, na temelju čega se provode daljnji eksperimenti s ciljem otkrivanja aminokiselinskog ostatka zaslužnog za stvaranje kovalentne veze.

2.5. PROTEOLITIČKI ENZIMI KOJI SUDJELUJU U PROCESIRANJU PROTEINA STANIČNE STIJENKE

Scw4 protein sadrži specifične regije iza kojih se nalaze mjesta za djelovanje proteolitičkih enzima (Cappellaro i sur., 1998; Mrša i sur., 1997). Enzimi koji sudjeluju u proteolitičkom procesiranju Scw4 su Kex2 proteaze, te proteaze iz porodice japsina. Njihovo djelovanje potvrdili su Grbavac i sur. (2017) čiji rezultati nakon ekstrakcije Scw4 proteina iz stanične stijenke kvasca divljeg tipa pokazuju tri proteinske vrpce različitih veličina.

2.5.1. Proteaza Kex2

Transmembranska, Ca^{2+} ovisna serinska proteaza Kex2 uključena je u procesiranje proproteina (Fuller i sur., 1998), a pripada skupini prohormonskih i proproteinskih konvertaza koje su prisutne u sekretornom putu (Rockwell i Thorner, 2004). Najvećim postotkom (97 %) nalazi se u intracelularnom prostoru, dok je njen manji dio na površini stanice (Wilcox i Fuller, 1991). Karakterizira ju veličina od 68 kDa, a zaslužna je za procesiranje više proteina (Scw4, Scw10, Scw11, PIR proteini) na temelju čega zaključujemo kako ima ulogu i u formiranju stanične stijenke (Teparić i Mrša, 2013). Osim toga, sudjeluje u fuzioniranju stanica tijekom parenja (Heiman i sur., 2007), aktivaciji proteina "killer" toksina i procesiranju feromona α -faktora kod MAT α stanica (Bader i sur., 2008; Pignede i sur., 2000).

Proteaza Kex2 ima najveći afinitet za rezanje iza Lys-Arg ili Arg-Arg para bazičnih aminokiselina (vrijednost $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ do $1.1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$), te procesira proteine cijepanjem iza Lys-Arg/X ili Arg-Arg/X sekvenci. Hipoteza je potvrđena delecijom *KEX2* gena i dobivanjem pleiotrofnog fenotipa mutanata kod kojih nije došlo do proteolitičke modifikacije supstrata (Bader i sur., 2008).

Sinteza proteaze Kex2 odvija se u zimogenoj formi. Zimogena forma sadrži visokonabijeni C-terminus, N-terminalnu sekvencu odgovornu za usmjeravanje u endoplazmatski retikulum i prodomenu (89 aminokiselina) odgovornu za smatanje proteolitičke domene u aktivnu formu. Također, sadrži katalitičku domenu i P-domenu zaslužnu za njeno djelovanje, citosolni rep s „Trans Golgi Network“ (TGN) signalom za lokalizaciju, te O-glikoziliranu transmembransku regiju bogatu serinom i treoninom (Wilcox i Fuller, 1991; Germain i sur., 1992). Cijepanje N-terminusa autoproteolitički aktivira zimogenu formu Kex2. Slijedi O- i N-glikozilacija te

autoproteolitičko odcjepljivanje prodomene, te translokacija aktiviranog proteina iz endoplazmatskog retikuluma u Golgij. U Golgijevu tijelu odvija se glikozilacija proteina vezanjem manoze na postojeće O- i N-oligosaharidne lance α -1,3-glikozidnom vezom (Wilcox i Fuller, 1991).

2.5.2. Proteaze iz porodice japsina

Kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* otkriveno je pet homologa proteina iz porodice GPI-aspartatnih proteaza: *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*, *YPS6* i *YPS7* (Olsen i sur., 1999). Signal za vezanje GPI-sidra omogućava im lokalizaciju u staničnoj stijenci ili membrani, a nalazi se na C-terminusu. Prva četiri člana posjeduju signalnu sekvencu koja odgovara lokalizaciji u staničnoj membrani (Frieman i sur., 2003), dok *YPS7* sekvencu sugerira lokalizaciju u staničnoj stijenci (Hamada i sur., 1999). Pretpostavlja se da je ekspresija *YPS1* uzrokovana stresnim uvjetima, dok se *YPS2* smatra konstitutivno eksprimiranim i stalno aktivnim (Krysan i sur., 2005).

Poput Kex2 proteaze, japsini svoje supstrate hidroliziraju djelujući iza para bazičnih aminokiselina Lys-Arg i Arg-Arg, te iza pojedinačne bazne kiseline (Cawley i sur., 1998). Sintetiziraju se u zimogenoj formi poput svih peptidaza, i to kao projapsini (Cawley i sur., 1998; Olsen i sur., 1999). Aktivacija zimogena vrši se u kiselom mediju (pH<4) kad dođe do proteolize pro-regije na N-terminusu, a aspartatni ostaci se protoniraju. Konačni rezultat je destabilizacija projapsina te aktivacija japsina (Cawley i sur., 1998). Novija istraživanja pokazala su kako se zimogene forme aktiviraju autokatalitički u kiselom mediju ili pomoću Kex2 proteaze u mediju neutralne pH-vrijednosti (Grbavac i sur., 2017). Optimalni pH za aktivnost japsina je 4 (Komano i sur., 1999).

Japsinske proteaze imaju važnu ulogu u održavanju integriteta stanične stijenke. Pojačana ekspresija japsina evidentna je u uvjetima oštećenja stijenke te tijekom njezine aktivne sinteze i remodeliranja. Ovisna je o okolišnim uvjetima, posebice kada se radi o uvjetima temperaturnog stresa. Uslijed naglog rasta temperature s 24 na 37 °C ekspresija japsina povećava se 12 puta, dok na 37 °C dolazi do lize stanica (Krysan i sur., 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- agar – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- agaroza – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- amonijev persulfat, N,N' –metilenbisakrilamid, Triton X-100, akrilamid, β -merkaptoetanol i Na-dodecilsulfat (SDS) – Sigma-Aldrich (St.Louis, SAD)
- ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- anti-HA peroksidaza antitijela - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- D (+) galaktoza – Acros Organics (SAD)
- D (+) glukoza bezvodna – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- D (+) rafinoza pentahidrat – Acros Organics (SAD)
- ECL otopine za razvijanje blota – Bio-Rad (SAD)
- histidin, uracil, leucin, triptofan – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- kvašćev ekstrakt - Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- NucleoSpin® Plasmid kit - Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)
- pepton, baktotripton – Becton, Dickinson and Co. (Le Pont de Claix, France)
- Ponceau S i polietilenglikol 4000 (PEG 4000) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- restriksijski enzim SapI, BglI - New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- standardi za DNA elektroforezu – Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)

Ostale kemikalije korištene tijekom eksperimentalnog rada nabavljene su od standardnih proizvođača i analitičke su čistoće.

3.1.2. Sojevi kvasca

U radu su korišteni laboratorijski sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (tablica 4).

Tablica 4. Pregled korištenih laboratorijskih sojeva kvasca

SOJ KVASCA	GENOTIP
wt (BY4741)	Mat a, <i>his3Δ</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>met15Δ</i> , <i>ura3Δ</i>
<i>kex2</i>	BY4741; <i>kex2::kanMX</i>
wt <i>SCW4</i>	BY4741 + pBG1805 <i>SCW4</i>
<i>kex2 SCW4</i>	<i>kex2</i> + pBG1805 <i>SCW4</i>
wt <i>Scw4</i> mut V	BY4741 + pBG1805 <i>SCW4</i> mut V
<i>kex2 Scw4</i> mut V	<i>kex2</i> + pBG1805 <i>SCW4</i> mut V
wt <i>Scw4</i> mut P	BY4741 + pBG1805 <i>SCW4</i> mut P
<i>kex2 Scw4</i> mut P	<i>kex2</i> + pBG1805 <i>SCW4</i> mut P
wt <i>Scw4</i> AKA	BY4741 + pBG1805 <i>SCW4</i> AKA
<i>kex2 Scw4</i> mut AKA	<i>kex2</i> + pBG1805 <i>SCW4</i> AKA
wt <i>Scw4</i> Q1	BY4741 + pBG1805 <i>SCW4</i> Q1
wt <i>Scw4</i> Q2	BY4741 + pBG1805 <i>SCW4</i> Q2
wt <i>Scw4</i> Q3	BY4741 + pBG1805 <i>SCW4</i> Q3

3.1.3. Sojevi bakterija

Za umnažanje plazmida korišten je genotip bakterijskog soja *Escherichia coli* (Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells, Thermo Fisher Scientific):

F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-

3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca

Stanice kvasca submerzno su uzgajane u YNB selektivnoj podlozi koja se sastoji od 6,7 g L⁻¹ YNB (Yeast Nitrogen Base, bez aminokiselina) i 2 g L⁻¹ smjese aminokiselina, vitamina i nukleotidnih baza („drop out“) i odgovarajućeg šećera (0,02 g L⁻¹). „Drop out“ smjesa (tablica 5) sadrži sve aminokiseline potrebne za rast kvasca osim aminokiselina nužnih za selekciju

auksotrofnih sojeva (Sambrook i Russel, 2001). Iz tog razloga je, ovisno o auksotrofnosti, u podlogu potrebno dodati histidin (80 mg L^{-1}), uracil (80 mg L^{-1}), triptofan (80 mg L^{-1}) i leucin (160 mg L^{-1}). Uzgoj kvasaca u tekućoj podlozi odvija se na tresilici pri temperaturi od $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Krute hranjive podloge jednakog su sastava kao i tekuće, uz dodatak 15 g L^{-1} agara, a uzgoj se odvija u termostatu pri temperaturi od $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Hranjive podloge i otopine šećera steriliziraju se u autoklavu pri temperaturi od $121 \text{ }^\circ\text{C}$ i tlaku od 1 atm tijekom 45 minuta.

Tablica 5. Sastav smjese aminokiselina, vitamina i nukleotidnih baza („drop out“)

adenin	3,0 g	L-metionin	2,0 g
L-arginin	2,0 g	L-fenilalanin	2,0 g
L-asparagin	2,0 g	L-prolin	2,0 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g	L-serin	6,0 g
L-cistein	2,0 g	L-treonin	2,0 g
L-glutamin	2,0 g	L-tirozin	2,0 g
L-glutaminska kiselina	2,0 g	L-valin	2,0 g
L-glicin	2,0 g	p-aminobenzojeva kiselina	0,2 g
L-izoleucin	2,0 g	inozitol	2,0 g

3.1.5. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Nakon transformacije plazmidima bakterija *Escherichia coli* uzgajana je u tekućoj i/ili krutoj LB podlozi uz dodatak ampicilina koncentracije 100 mg mL^{-1} u omjeru $1 \mu\text{L}$ ampicilina na 1 mL LB hranjive podloge. Sastav podloge prikazan je u Tablici 6. Podloge je potrebno autoklavirati na temperaturi od $121 \text{ }^\circ\text{C}$ te tlaku od 1 atm tijekom 45 minuta.

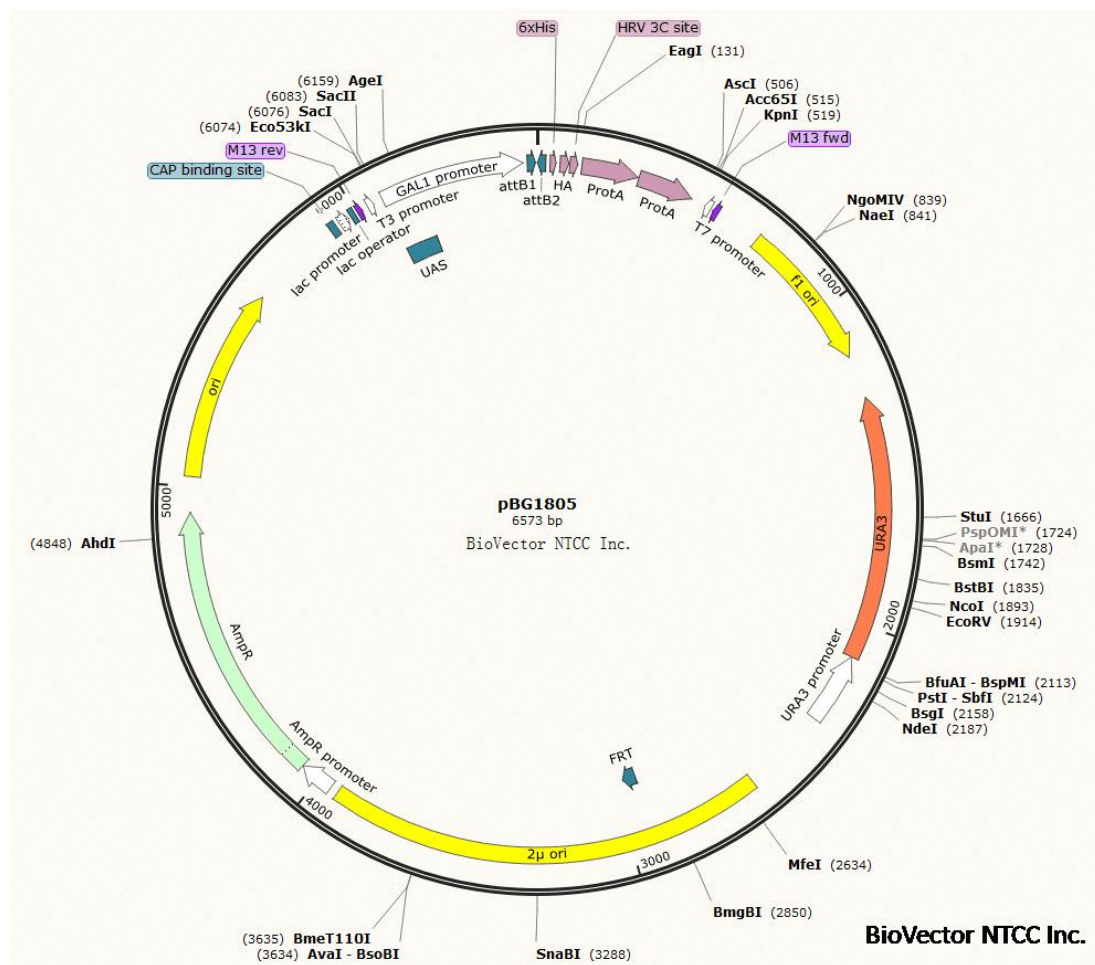
Tablica 6. Sastav LB hranjive podloge za uzgoj *E. coli*

	baktotripton	kvašćev ekstrakt	NaCl	agar
Tekuća hranjiva podloga [g L⁻¹]	10	5	5	-
Kruta hranjiva podloga [g L⁻¹]	10	5	5	15

3.1.6. Plazmidi

3.1.6.1. Plazmid pBG1805 SCW4

Plazmid pBG1805 SCW4 (slika 6) sadrži nativni gen koji kodira za protein Scw4, *ori* ishodišnu sekvenciju koja mu omogućava umnažanje u bakteriji *E.coli*, *BLA* gen za selekciju bakterija koje sadrže spomenuti plazmid na podlozi s ampicilinom, te kvašćev *URA* gen koji omogućuje selekciju transformiranih stanica kvasca na hranjivim podlogama bez uracila. *SCW4* gen se nalazi pod kontrolom promotora *GALI*, a nizvodno od gena nalazi se hemaglutininski nastavak koji omogućava detekciju Scw4 proteina antitijelima. Plazmid pBG1805 SCW4 umnožen je u *E. coli* nakon čega je plazmid izoliran te potom korišten za transformaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.



Slika 6. Prikaz plazmida pBG1805 (Anonymous 5, 2020).

3.1.6.2. Plazmidi pBG1805 SCW4 mut P, pBG1805 SCW4 mut V, pBG1805 SCW4 AKA, pBG1805 SCW4 Q1, pBG1805 SCW4 Q2 i pBG1805 SCW4 Q3

Plazmidi pBG1805 SCW4 mut P, pBG1805 SCW4 mut V, pBG1805 SCW4 AKA, pBG1805 SCW4 Q1, pBG1805 SCW4 Q2 i pBG1805 SCW4 Q3 sadrže mutirani gen za protein Scw4 u kojem je mutirana jedna od regija sličnih PIR repetitivnoj sekvenci, ori ishodišnu sekvenciju koja im omogućava umnažanje u bakteriji *E.coli*, *BLA* gen za selekciju bakterija koje sadrže spomenute plazmide na podlozi s ampicilinom, te kvaščev *URA* gen koji omogućuje selekciju transformiranih stanica kvasca na hranjivim podlogama bez uracila. *SCW4* gen se nalazi pod kontrolom promotora *GALI*, a nizvodno od gena nalazi se hemaglutininski nastavak koji omogućava detekciju Scw4 proteina antitijelima. Plazmidi su umnoženi u *E. coli* nakon čega su plazmidi korišteni za transformaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

MRLSNLIASA	SLLSAATLAA	PANHEHKDKR	AVTTTTVQKQ	TTIIVNGAAS	TPVAALEENA
VVNSAPAAAT	FTAFNDYWKA	TAAASSENN	SQVSAASPA	SSSAATSTQS	SSSSQASSSS
SSGEDVSSFA	SGVRGITYTP	YESSGACKSA	SEVASDLAQL	TDFPVIRLYG	TDCNQVENVF
KAKASNQKVF	LGIIYVDQIQ	DGVNTIKSAV	ESYGSWDDVT	TVSIGNELVN	GNQATPSQVG
QYIDSGRSAL	KAAGYTGPVV	SVDTFIAVIN	NPELCDYSDY	MAVNAHAYFD	KNTVAQDSGK
WLLEQIQRVW	TACDGKKNVV	ITESGWPSKG	ETYGVAVPSK	ENQKDAVSAI	TSSCGADTFI
FTAFNDYWKA	DGAYGVEKYW	GILSNE*			

Slika 7. Prikaz aminokiselinske sekvence proteina Scw4. Plavom bojom označeno je mjesto za procesiranje Kex2 proteazom, narančastom bojom označeno je mjesto za procesiranje japsinskim proteazama, crvenom i ljubičastom bojom označeni su dijelovi sekvence ispitivani u ovom radu.

U proteinskoj sekvenci (slika 7) plavom bojom označeno je mjesto procesiranja Kex2 proteazom, a narančastom mjesto procesiranja japsinskim proteazama. Narančastom bojom naznačeni dio ujedno je mutiran u ovom radu, a konstrukt koji sadrži ovu mutiranu regiju nazvan je pBG1805 *SCW4* AKA jer je ova regija mutirana iz QKQ u AKA. Crvenom i ljubičastom bojom također su naznačeni mutirani dijelovi sekvence ispitivani u ovom radu. Konstrukt s mutacijom u regiji označenoj crvenom bojom nazvan je pBG1805 *SCW4* mut P, a regija je mutirana iz DQIQD u GALLG. Konstrukt s mutacijom u regiji označenoj ljubičastom bojom nazvan je pBG1805 *SCW4* mut V, a regija je mutirana iz Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁ u ALVLGALLG.

MRLSNLIASA	SLLSAATLAA	PANHEHKDKR	AVTTTTVQKQ	TTIIVNGAAS	TPVAALEENA
VVNSAPAAAT	FTAFNDYWKA	TAAASSENN	SQVSAASPA	SSSAATSTQS	SSSSQASSSS
SSGEDVSSFA	SGVRGITYTP	YESSGACKSA	SEVASDLAQL	TDFPVIRLYG	TDCNQVENVF
KAKASNQKVF	LGIIYVDQIQ	DGVNTIKSAV	ESYGSWDDVT	TVSIGNELVN	GNQATPSQVG
QYIDSGRSAL	KAAGYTGPVV	SVDTFIAVIN	NPELCDYSDY	MAVNAHAYFD	KNTVAQDSGK
WLLEQIQRVW	TACDGKKNVV	ITESGWPSKG	ETYGVAVPSK	ENQKDAVSAI	TSSCGADTFI
FTAFNDYWKA	DGAYGVEKYW	GILSNE*			

Slika 8. Prikaz aminokiselinske sekvence proteina Scw4 za konstrukt pBG1805 *SCW4* Q1, pBG1805 *SCW4* Q2 i pBG1805 *SCW4* Q3. Plavom bojom označeno je mjesto za procesiranje

Kex2 proteazom, narančastom bojom označeno je mjesto za procesiranje japsinskim proteazama, crvenom bojom označen je dio sekvence ispitivan u ovom radu.

Na proteinskoj sekvenci (slika 8) plavom bojom označeno je mjesto procesiranja Kex2 proteazom, a narančastom mjesto procesiranja japsinskim proteazama. Crvenom bojom naznačen je dio sekvence u koji su u ovom radu unesene i ispitivane mutacije. Uvođenjem tri različite mutacije u ovu ciljanu regiju dobivena su tri konstrukta korištena za daljnje eksperimente. Konstrukt koji sadrži mutiranu regiju označenu žutom bojom nazvan je pBG1805 *SCW4* Q1, a regija je mutirana iz Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁u A₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁. Konstrukt koji sadrži mutiranu regiju označenu sivom bojom nazvan je pBG1805 *SCW4* Q2, a regija je mutirana iz Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁u Q₂₃₃ATPSA₂₃₈VGQ₂₄₁. Konstrukt koji sadrži mutiranu regiju označenu zelenom bojom nazvan je pBG1805 *SCW4* Q3, a regija je mutirana iz Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁u Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGA₂₄₁.

3.2. METODE

3.2.1. Lančana reakcije polimeraze

PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) tj. lančana reakcija polimeraze *in vitro* je metoda selektivnog umnažanja određenog dijela DNA prema postojećem lancu koji se naziva kalup. Reakcija se provodi u uređaju zvanom „Thermocycler“ koji, ovisno o podešenom programu, tijekom vremena povisuje i snizuje temperaturu reakcije na zadane vrijednosti u zadanim vremenskim intervalima. Reakcijska smjesa mora sadržavati DNA kalup, smjesu sva četiri dNTP-a, dvije početnice te enzim DNA polimerazu (Taq polimeraza) s odgovarajućim puferom. Pufer za DNA polimerazu sadrži ione Mg^{2+} čija prisutnost je neophodna za sintezu DNA. Početnice („primeri“) naručuju se od proizvođača, a najčešće su sastavljene od 16 do 30 oligonukleotida čiji je slijed komplementaran određenom dijelu sekvence DNA koja se želi umnožiti. DNA polimeraza enzim je koji provodi replikaciju. Taq polimeraza veličine 94 kDA izolirana je iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, a optimalnu aktivnost ima u temperaturnom intervalu od 72 do 75 °C. Poluživot Taq polimeraze na 95 °C je 40 min, što znači da se pomoću nje može provesti oko 50 ciklusa PCR-a.

PCR metoda standardno se provodi kroz tri osnovna stupnja. Prvi stupanj podrazumijeva denaturiranje kalupa DNA zagrijavanjem na 95 °C. Pri tome dolazi do pucanja slabih vodikovih veza te razdvajanjem lanaca DNA, što rezultira dvama jednolančanim DNA lancima. Svaki lanac služi kao kalup za replikaciju. Nakon toga smjesa se hladi na tzv. „melting“ temperaturu od 50-70 °C koja omogućava sparivanje početnica s komplementarnim dijelovima lanca. Ovaj korak traje kratko kako bi se spriječila potencijalna renaturacija DNA lanaca. Početnice su nakon sparivanja suprotno orijentirane u odnosu na ciljane DNA sekvencu, što omogućava njenu daljnju sintezu. Treći stupanj PCR-a podrazumijeva sintezu komplementarne DNA pri temperaturi od 72 °C koja je optimalna za Taq polimerazu. Trajanje trećeg stupnja ovisi i određuje se s obzirom na duljinu fragmenta (jedna minuta za sintezu fragmenta duljine 1 kb).

3.2.2. Uvođenje mutacije u gen SCW4 PCR metodom

Željene mutacije unešene su upotrebom Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit-a koji omogućava uvođenje mutacije u ciljanoj regiji dvolančanog DNA plazmida. Kao enzim koristi se „Q5 Hot Start High-fidelity“ DNA polimeraza, a nakon provedenog PCR-a umnoženom materijalu dodaje se KLD smjesa enzima. KLD sastoji se od kinaze, ligaze i enzima DpnI, koji tijekom inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi osiguravaju cirkularizaciju plazmida i uklanjanje kalupa. Sastav reakcijske smjese za PCR od ukupno 25 μ L prikazana je u Tablici 7. Temperaturni uvjeti pri kojima su se odvijali pojedini stupnjevi lančane reakcije polimeraze i njihovo trajanje prikazani su u Tablici 8.

Tablica 7. Prikaz sastava PCR reakcijske smjese

	Σ : 25 μ L	Konačna koncentracija
Q5 Hot Start High Fidelity 2x Master Mix	12,5 μ L	1x
10 μ M Forward Početnica (Scw4 QKQ- F)	1,25 μ L	0,5 μ M
10 μ M Reverse Početnica (Scw4 QKQ- R)	1,25 μ L	0,5 μ M
Kalup DNA (1-25 ng ml ⁻¹), PBG1805Scw4	2 μ L	20 ng
Destilirana voda bez nukleaza	8,0 μ L	-

Tablica 8. Prikaz uvjeta pri kojima je provedena PCR reakcija

	TEMPERATURA	VRIJEME
	T ₁ (denaturacija)= 98 °C	t ₁ = 45 s
25 x	T ₂ (denaturacija)= 98 °C	t ₂ = 10 s
	T ₃ (anealing)= 65°C	t ₃ = 30 s
	T ₄ (elongacija) = 72°C	t ₄ = 30 s/kb
	T ₅ (završna elongacija)= 72°C	t ₅ = 2 min
	T ₆ = 4°C	t ₆ = ∞

3.2.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

DNA gel elektroforeza provedena je pri naponu od 70 V u 1 %-tnom agaroznom gelu. Gel se priprema otapanjem agaroze u TAE puferu (40 mmol L⁻¹ TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol L⁻¹ EDTA), zagrijavanjem otopine do vrenja, a zatim izlijevanja djelomično ohlađene otopine u kadu. Nakon umetanja češljica koji će formirati jažice, gel polimerizira na ravnoj površini 45-60 minuta. Uzorci plazmida pocijepani restrikcijskim enzimima nanose se u jažice. Po završetku elektroforeze gel se uranja u otopinu etidij-bromida (1 mg L⁻¹) nakon čega se vrpce DNA vizualiziraju pomoću UV svjetla na transiluminatoru (Hoefler, Macrovue UVis-20).

3.2.4. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli*

Alikvot bakterijskih stanica (50 µL kulture kompetentnih stanica (Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells, Thermo Fisher Scientific)) uzet iz zamrzivača (-70 °C) otapa se 20-30 minuta na ledu. U suspenziju stanica se dodaje 5 µL ligacijske smjese i inkubira se na ledu u trajanju od 30 minuta, a zatim podvrgava temperaturnom šoku inkubacijom kroz 30 sekundi na 42 °C u termobloku. Poslije termo-škoka smjesa se hladi 5 minuta na ledu, te joj se dodaje 950 µL prethodno zagrijanog SOC medija (2 % tripton, 0,5 % kvašćev ekstrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoza). Slijedi inkubacija 1 h na 37 °C nakon čega se 100 µL suspenzije stanica nacijepi na LB krute podloge s ampicilinom. Transformacija se smatra uspješnom kad na podlogama poslije prekonoćne inkubacije na 37 °C narastu kolonije koje su tada spremne za precjepljivanje i uzgoj u tekućoj LB podlozi s ampicilinom.

3.2.5. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije *E. coli* ("mini prep")

Stanice *E. coli* koje sadrže željene plazmide uzgojene su preko noći na 37 °C u tekućoj LB podlozi uz dodatak ampicilina. Prema uputama proizvođača plazmida su iz bakterijskih stanica izolirani pomoću NucleoSpin® Plasmid kit-a (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

3.2.6. Restriksijska analiza plazmida

Cijepanja DNA provedena su restirksijskim enzimima SapI ili BglI prema uputama proizvođača („New England Biolabs“ Ipswich, MA, SAD) s ciljem provjere ispravnosti konstruiranih plazmida koji su prethodno izolirani iz stanica *E. coli*.

3.2.7. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija plazmidne DNA dobivene izolacijom iz bakterijskih stanica određena je pomoću Qubit 3.0 fluorometra (Invitrogen, Life Technologies, SAD) prema uputama proizvođača.

3.2.8. Transformacija stanica kvasca LiAc metodom

Kako bi mogao početi postupak transformacije, kvasac je prethodno uzgojen u 5 mL kompletne tekuće hranjive podloge (YNB ili YPD uz dodatak 2 % glukoze) do logaritamske faze rasta. Suspenzija se centrifugira 6 minuta na 6000 rpm, te se talog u sterilnim uvjetima ispere u 5 mL destilirane vode. Postupak centrifugiranja se ponavlja, a rezultat su stanice kvasca odvojene i isprane od hranjive podloge. Talog sa stanicama resuspendira se u 1 mL 0,1 M LiAc i centrifugira 30 sekundi na 8000 rpm u sterilnoj eppendorf epruveti. Nakon uklanjanja supernatanta, na talog se redom dodaje: 240 µL PEG-a (50% w/v), 36 µL litijevog acetata (1M), 25 µL jednolančane DNA (eng. „DNA carrier“) te 50 µL smjese plazmida i sterilne vode. Transformacijska smjesa vorteksira se 1 minutu s ciljem homogenizacije, a zatim dvaput inkubira u termobloku. Prva inkubacija provodi se 30 minuta na 30 °C, a druga inkubacija traje 20 minuta na temperaturi od 42 °C. Nakon temperaturnog šoka suspenzija se centrifugira 15 sekundi na 8000 rpm, supernatant se uklanja, a talog resuspendira u 1 mL sterilne vode. 100 µL suspenzije nacijepi se na YNB selektivnu krutu podlogu bez uracila, a inkubacija ploča traje 2-3 dana na 30 °C.

3.2.9. Uzgoj kvasca uz indukciju *GAL* promotora

Uzgoj transformiranih stanica kvasca započinje naciepljivanjem u 5 mL selektivne podloge bez uracila s dodatkom 2 % glukoze, te traje preko noći na tresilici pri 30 °C. *GAL* promotor koji kontrolira gen *SCW4* uz prisustvo glukoze je reprimiran. Sljedeće jutro izračunati alikvot suspenzije kvasca naciepljuje se u novih 15 mL selektivne podloge uz dodatak 2 % šećera rafinoze s tako da je početna OD₆₀₀ vrijednost 0,5. Nakon inkubacije na tresilici pri 30 °C u trajanju od 4-5 sati postiže se OD₆₀₀ vrijednost 2-2,5 kada je kvasac u eksponencijalnoj fazi rasta. Alikvot suspenzije kvasca izuzima se i prebacuje u podlogu s 2 % galaktoze, 0,1 % rafinoze te odgovarajućim puferom (10 mM fosfat-citratni pufer pH=4 ili pH=7), pri čemu je ukupni volumen 50 mL. *GAL* promotor koji kontrolira gen *SCW4* uz prisustvo galaktoze je induciran. Ukoliko se radi o dodatku 10 mM fosfat-citratnog pufera pH=4, početna OD₆₀₀ vrijednost iznosi 0,1, a dodaje li se 10 mM fosfat-citratni pufer pH=7, početna OD₆₀₀ vrijednost iznosi 0,5. Uzgoj traje preko noći na tresilici pri 30 °C.

3.2.10. Izolacija staničnih stijenki kvasca

Prethodno uzgojeni kvasac nalazi se u ukupno 50 mL YNB selektivne podloge bez uracila s dodatkom rafinoze, galaktoze i odgovarajućeg pufera. Optimalna je konačna vrijednost OD₆₀₀ od 2,5-3 za daljnju izolaciju stijenki. pH suspenzije provjerava se pomoću indikatorskog Lakmus papirića i, ukoliko odgovara pH-vrijednosti dodanog pufera, nastavlja se s protokolom izolacije. Suspenzija kvasca centrifugira se 6 minuta na 6000 rpm s ciljem odvajanja stanica u obliku taloga od tekućeg dijela podloge (supernatant). Talog se ispiri s 30 mL destilirane vode, a zatim dva puta s 30 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH=8. Između svakog ispiranja vrši se centrifugiranje 6 min na 6000 rpm. Na talog stanica dodaje se 300 µL kalij-fosfatnog pufera i suspenzija se prebacuje u kivete za razbijanje stanica, a zatim se dodaju staklene kuglice u omjeru 1:1 naspram volumena suspenzije. Razbijanje stanica odvija se na BeadBug™ uređaju u dva do tri ciklusa u trajanju od 3 minute, između kojih je obavezna inkubacija na ledu u trajanju od 1 minute kako ne bi došlo do denaturacije proteina. Suspenzija razbijenih stanica prebaci se u eppendorf epruvete od 1,5 mL. Slijedi centrifugiranje 1 min na 12000 rpm nakon čega se odvaja supernatant, a na talog dodaje 1 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH=8. Ispiranje puferom ponavlja se četiri puta.

3.2.11. Izolacija nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Talog stijenki prethodno je četiri puta ispran 50 mM kalij-fosfatnim puferom pH=8. Nakon posljednjeg odvajanja supernatanta, talog stijenki resuspendira se u 1 mL Laemmli pufera (50 mM Tris-HCl pufer pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2 % SDS, 0,001 % boja bromfenol plavo i 5 % β -merkaptetanol). Epruvete se umeću u stiroporni plovak te kuhaju u vodenoj kupelji 10 minuta. Po završetku kuhanja, suspenzija u epruvetama se centrifugira 3 min na 12000 rpm. Supernatant koji sarži nekovalentno vezane proteine sprema se u hladnjak na temperaturu od -20 °C.

Na talog se ponovno dodaje 1 mL Laemmli pufera i ponavlja postupak kuhanja u vodenoj kupelji u trajanju od 10 minuta. Suspenzija se potom centrifugira 3 minute na 12000 rpm, supernatant se uklanja, a talog se ispiru četiri puta s 1 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH=8.

3.2.12. Izolacija kovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Nakon završenog SDS-tretmana stijenki, četiri puta puferom isprani talog resuspendira se u 1 mL destilirane vode i centrifugira 3 min na 12000 rpm. Supernatant se ukloni pipetom. Na talog koji sadrži stanične stijenke sa kovalentno vezanim proteinima dodaje se 30 mM NaOH (50 μ L NaOH na 100 OD jedinica suspenzije), suspenzija se resuspendira i inkubira preko noći u hladnjaku na +4 °C. Nakon prekonoćne inkubacije slijedi centrifugiranje 5 min na 12000 rpm. Supernatant se izdvaja i dodaje mu se Laemmli pufer za uzorke tako da razrjeđenje pufera bude maksimalno pet puta. Ovako pripremljeni uzorci spremaju se u hladnjak na temperaturu od -20 °C.

3.2.13. SDS elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Proteini izdvojeni SDS i NaOH tretmanima stijenki denaturiraju se dodatkom Laemmli pufera (50 mM Tris-HCl pufer pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2 % SDS-a, 10 % glicerol, 0,001 % boja bromfenol plavo i 5 % β -merkaptetanol). Pufer se dodaje SDS uzorcima tako da bude razrijeđen maksimalno pet puta kako bi uzorci "sjeli" na dno jažice u gelu. Proteini dobiveni NaOH tretmanom stijenki već sadrže Laemmli pufer pa ga nije potrebno naknadno dodavati. Za elektroforezu koristi se diskontinuirani sustav kojeg čine gornji gel za sabijanje (5%

akrilamida, pH=6,8) te donji gel za razdvajanje (12% akrilamida, pH=8,8). Sastav gelova prikazan je u tablici 9. U prvu, zadnju te u sve jažice u kojima se ne nalaze uzorci nanosi se oko 2 μ L Laemmler pufera. Pored uzoraka također se nanosi 4 μ L smjese LMW (Low Molecular Weight) (Amersham Pharmacia Biotech) standarda. Elektroforeza se provodi u 25 mM Tris-glicin puferu pH=6,8 s 0,1 % SDS-a pri naponu od 180 V tijekom 2,5 sata.

Tablica 9. Sastav gelova za SDS PAGE elektroforezu

	GEL ZA SABIJANJE pH=6,8	GEL ZA RAZDVAJANJE pH=8,8
0,5 M Tris-HCl pufer pH=6,8	4,26 mL	-
1,5 M Tris-HCl pufera pH 8,8	-	2,5 mL
Destilirana voda	-	2,2 mL
30 %-tni akrilamid	600 μ L	3 mL
TEMED	5 μ L	5 μ L
APS	45 μ L	38 μ L

3.2.14. Western blot

Nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze proteini se prenose „semi-dry“ transferom iz poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu pri 1,0 A i 25 V tijekom 25 minuta u uređaju za transfer (Trans-Blot®Turbo™ Transfer System, BioRad). „Semi-dry“ transfer podrazumijeva slaganje gela na nitrocelulozu u „sendvič“ između dva sloja od po osam filter papira prethodno potopljenih u odgovarajućem puferu (3,03 g TRIS-a, 14,4 g glicina, 200 mL metanola i 800 mL destilirane vode). Nakon 25 minuta gel se uklanja, a na nitrocelulozu s proteinima dodaje se boja Ponceau S (0,1 % Ponceau S u 5 %-tnoj octenoj kiselini) koja služi za vizualizaciju LMW standarda i proteina. Standardi se označe tupom grafitnom olovkom, boja se ispere destiliranom vodom, a zatim slijedi inkubacija tijekom 45 minuta na tresetici i sobnoj temperaturi u 10 mL pufera za blokiranje (50 mM TRIS-HCl pufer pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100) s 1 % obranog mlijeka. Pufera s obranim mlijekom odlije se nakon inkubacije, a s novih 5 mL pufera dodaju se i antitijela sa svrhom specifičnog obilježavanja proteina. Na membranu na kojoj se nalaze SDS uzorci dodaje se 4 μ L HA-antitijela (Sigma-

Aldrich), dok se na membranu s NaOH uzorcima dodaje 5 μ L HA-antitijela. Membrane se inkubiraju minimalno 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega se 3 puta po 10 minuta ispiru sa po 5 mL pufera za blokiranje. Područje nitroceluoze na kojem se nalaze olovkom označeni standardi posuši se staničevinom te se standardi označe kemiluminiscentnim flomasterom (WesternSure Pen), nakon čega slijedi 5-minutna inkubacija membrane u reagensima za razvijanje blota (800 μ L peroksidaze i 800 μ L luminola, BioRad, SAD). Preliminarna vizualizacija proteinskih vrpca vrši se pomoću C-digit skenera (C-DiGit[®] Blot Scanner – LICOR Biosciences), nakon čega se kemiluminiscencija proteina zabilježi na RTG-filmu tijekom prekonoćne ekspozicije filma.

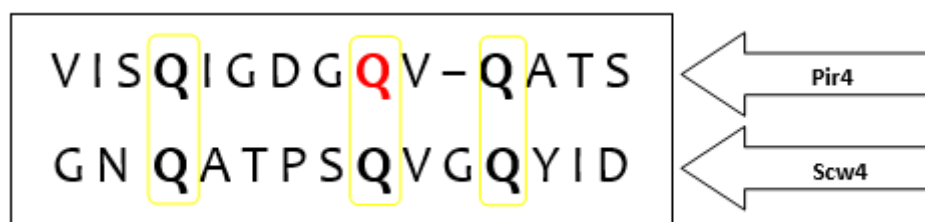
4. REZULTATI I RASPRAVA

Na osnovu dosadašnjih istraživanja provedenih u ovom Laboratoriju zaključeno je da se iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* mogu izolirati tri forme Scw4 proteina koje se međusobno razlikuju po molekulskoj masi. Prema pretpostavci, uzrok tome je različito proteolitičko procesiranje proteina. Forme manjih molekulskih masa smatraju se proteolitički procesiranima, dok se ona najveće mase smatra neprocesiranom. Enzimi koji sudjeluju u procesiranju su Kex2 i japsinske proteaze. Kex2 proteolitički enzimi djeluju iza mjesta K₂₇D₂₈K₂₉R₃₀, a rezultiraju po molekulskoj masi srednjom formom proteina, dok japsinske proteaze djeluju iza K₃₉ mjesta i zaslužne su za nastajanje najmanje forme proteina. Uloga pojedinog enzima ustanovljena je nakon uvođenja mutacija u gen *SCW4* u dijelove sekvence koje kodiraju za regije proteina koje podliježu cijepanju s Kex2 ili japsinima (aminokiselinski ostaci od N₂₃ do R₃₀, te ostatak K₃₉) (slika 9), što je potvrđeno Western blot metodom.



Slika 9. Prikaz sekvence proteina Scw4. Na proteinskoj sekvenci plavom strelicom označeno je mjesto procesiranja Kex2 proteazom, a narančastom strelicom mjesto procesiranja japsinskim proteazama.

Mehanizam vezanja Scw4 proteina u stijenku kvasca još nije poznat, međutim, pretpostavlja se kako bi mogao biti sličan onome za vezanje PIR proteina. Zaključak je donesen na temelju eksperimenata provedenih od strane Teparić i sur. (2010) i Grbavac i sur. (2017) koji dokazuju da se Scw4 veže kovalentno i nekovalentno. Kao nepoznanica ostaje vrsta veze te pitanje koji dio sekvence proteina je odgovoran za kovalentno povezivanje u stijenku. Kako bi se dobio odgovor na postavljeno pitanje, u ovom radu proveden je set eksperimenata s novim konstruiranim mutantima nazvanim: pBG1805 *SCW4* mut V, pBG1805 *SCW4* mut P, pBG1805 *SCW4* AKA, pBG1805 *SCW4* Q1, pBG1805 *SCW4* Q2 i pBG1805 *SCW4* Q3. Mutacije su uvedene u regiju sličnu onoj PIR proteina koja sadrži glutaminske ostatke za koje se smatra da su odgovorni za kovalentno vezanje, te u regiju iza koje djeluju japsini koja također sadrži glutaminski ostatak (slika 10).



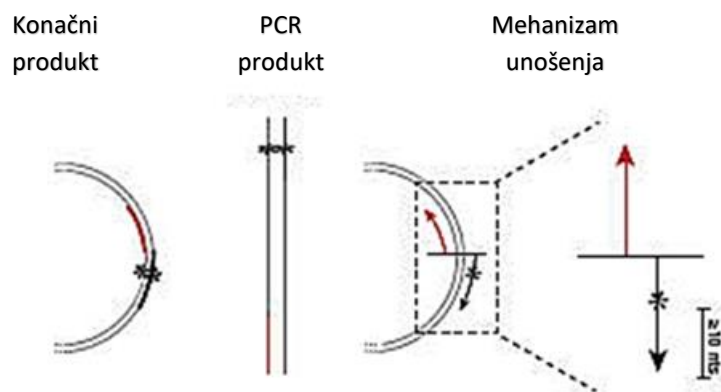
Slika 10. Usporedba dijelova sekvenci Pir4 i Scw4 proteina. Žutom bojom uokvireni su glutaminski ostaci zaslužni za kovalentno povezivanje PIR proteina te slično raspoređeni glutaminski ostaci u sekvenci Scw4 proteina. Crvenom bojom označen je glutaminski ostatak ključan za kovalentno vezanje PIR proteina.

4.1. UVOĐENJE MUTACIJE U CILJANU REGIJU GENA SCW4 PCR METODOM

Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit upotrebljen je za uvođenje mutacije u ciljanu regiju gena. Početnice za navedeni sustav dizajnirane su upotrebom NeBaseChangera i prikazane u Tablici 10. Prvi korak podrazumijeva eksponencijalnu amplifikaciju regije upotrebom smjese koja sadrži „Q5 Hot Start High-Fidelity“ DNA polimerazu, kalup i dvije početnice. Željena mutacija nalazi se u središnjem dijelu jedne početnice („Forward primer“), pri čemu je njen 3'- kraj dugačak minimalno 10 komplementarnih nukleotida, dok druga početnica („Reverse primer“) ne sadrži mutaciju. Početnice su orijentirane tako da se sinteza dvaju lanaca odvija u suprotnome smjeru (slika 11.). Drugi korak podrazumijeva inkubaciju PCR produkta s KLD smjesom kinaze, ligaze i enzima DpnI koji osiguravaju cirkularizaciju plazmida sa željenom mutacijom te uklanjanje kalupa. Rezultat je reakcijska smjesa spremna za transformaciju kompetentnih stanica *E. coli* konstruiranim cirkulariziranim plazmidom.

Tablica 10. Prikaz početnica i odgovarajućih sekvenci korištenih za uvođenje mutacije QKQ/AKA

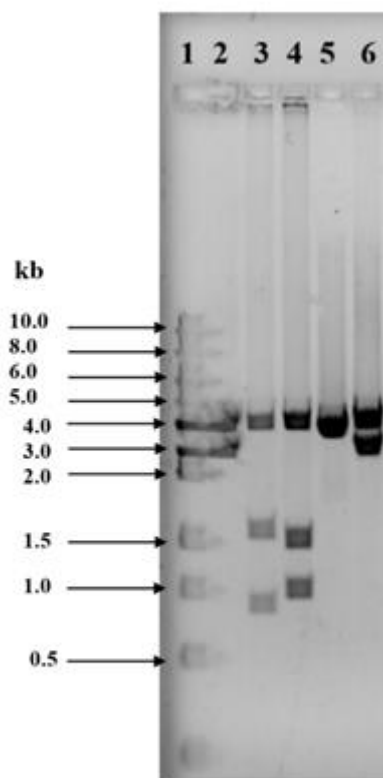
Naziv početnice	Sekvenca (oligonukleotid)
SCW4QKQ_R	TTAGCAACAGTGGTAGTGACCAC
SCW4QKQ_F	AGCTACCACTATCATTGTTAATGG



Slika 11. Prikaz mehanizma PCR reakcije pomoću Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit-a. „Forward primer“ označen je crnom bojom, a „Reverse primer“ označen je crvenom bojom. Strelice na slici predstavljaju 5'-3' smjer sinteze lanaca (Anonymous 6, 2021).

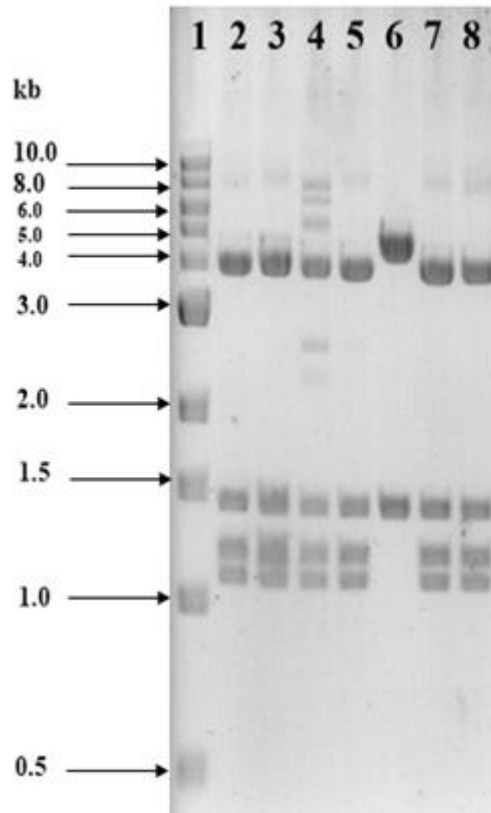
4.2. RESTRIKCIJSKA ANALIZA PLAZMIDA

Kompetentne stanice bakterije *Escherichia coli* transformirane su ligacijskom smjesom prethodno opisanom metodom, a zatim su uzgojene u LB podlozi uz dodatak ampicilina. Nakon prekonoćnog uzgoja iz umnoženih stanica izolirani su plazmidi pomoću NucleoSpin Plasmid kit-a prema protokolu proizvođača (Macherey-Nagel). Određene su koncentracije izoliranih plazmida upotrebom Qubit 3,0 (Invitrogen, Life Technologies, USA) fluorometra, a cijepanje plazmida provedeno je pomoću restrikcijskih enzima SapI i BglI kako bi se ustanovila uspješnost unošenja mutacije. Plazmidi su uz dodatak boje nanešeni u jažice 1 %-tnog agaroznog gela, koji je nakon elektroforeze uronjen u otopinu etidij-bromida te su restrikcijom dobiveni fragmenti vizualizirani na transiluminatoru.



Slika 12. Restriksijska analiza pBG1805 *SCW4*, pBG1805 *SCW4* AKA, pBG1805 *SCW4* mutV, pBG1805 *SCW4* mutP. Uzorci: 1. standard DNA Ladder (1 kb), 2. plazmid pBG1805 *SCW4* pocijepan enzimom SapI, 3. plazmid pBG1805 *SCW4* mut V pocijepan enzimom SapI, 4. plazmid pBG1805 *SCW4* mut P pocijepan enzimom SapI, 5. uzorak koji nije obrađen u ovom radu, 6. plazmid pBG1805 *SCW4* AKA pocijepan enzimom SapI.

Iz slike 12 gel elektroforeze vidljivo je da plazmid pBG1805 *SCW4* koji sadrži nativni gen koji kodira za protein Scw4 i dva restriksijska mjesta za enzim SapI, te su na gelu očekivano vidljive dvije vrpce veličina 4202 pb i 3499 pb. Plazmidi pBG1805 *SCW4* mut V i pBG1805 *SCW4* mut P koji sadrže mutaciju u genu koji kodira za protein Scw4 također sadrže tri restriksijska mjesta za enzim SapI što je rezultiralo trima vrpčama veličina 4227 pb, 2119 pb i 1380 pb. Plazmid pBG1805 *SCW4* AKA koji sadrži mutaciju gena koji kodira za Scw4 protein pocijepan je restriksijskim enzimom SapI, te su uočene očekivane dvije vrpce veličina 4202 pb i 3499 pb.



Slika 13. Restriksijska analiza plazmida pBG1805 SCW4, pBG1805 SCW4 Q1, pBG1805 SCW4 Q2, pBG1805 SCW4 Q3. Uzorci: 1. standard DNA Ladder (1 kb), 2. plazmid pBG1805 SCW4 Q1 pocijepan enzimom BglI, 3. uzorak koji nije obrađen u ovom radu, 4. uzorak koji nije obrađen u ovom radu, 5. plazmid pBG1805 SCW4 Q2 pocijepan enzimom BglI, 6. uzorak koji nije obrađen u ovom radu, 7. uzorak koji nije obrađen u ovom radu, 8. plazmid pBG1805 SCW4 Q3 pocijepan enzimom BglI.

Iz slike 13 gel elektroforeze evidentna je uspješno provedena mutacija u plazmidima pBG1805 SCW4 Q1, pBG1805 SCW4 Q2 i pBG1805 SCW4 Q3 koji sadrže mutacije u genu koji kodira za protein Scw4 i četiri restriksijska mjesta za enzim BglI što je rezultiralo vrpčama veličina 3994 pb, 1379 pb, 1276 pb i 1077 pb.

4.3. TRANSFORMACIJA KVASCA

Nakon uzgoja kompetentnih stanica *E.coli* u LB podlozi s ampicilinom te izolacije plazmida slijedi provjera uspješnosti uvođenja mutacije restrikcijom i DNA elektroforezom. Restriksijska analiza provodi se kako bi kvasac u idućem koraku nedvojbeno bio transformiran ispravno konstruiranim željenim plazmidom. Postupak transformacije detaljno je opisan u poglavlju Materijali i metode, a nakon provedene transformacije kvasac je nacjepljen na krutu YNB Ura⁻ podlogu. Kvasac divljeg tipa auksotrof je za uracil, što znači da neće rasti na podlogama bez uracila. Nakon inkubacije od 2-3 dana, odabranih 8 naraslih kolonija transformanata precijepljeno je na novu selektivnu ploču i spremljeno u hladnjak na +4 °C.

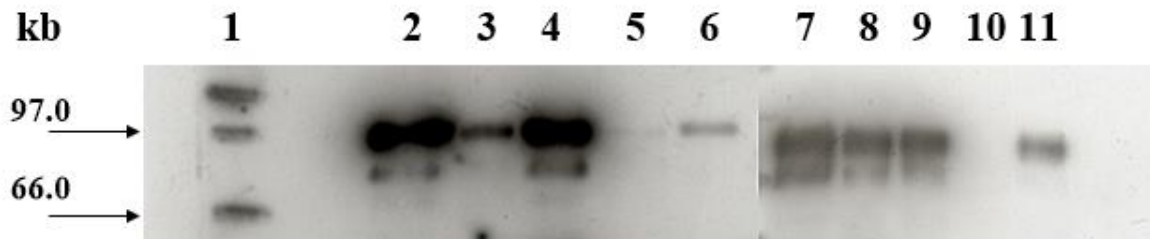
4.4. WESTERN BLOT METODA ZA PROVJERU NAČINA VEZANJA PROTEINA

Stanice kvasca transformirane su pBG1805 plazmidima u koje su ligirani mutirani konstrukti *SCW4* gena. Kvasac je uzgojen do logaritamske faze rasta u YNB Ura⁻ selektivnoj podlozi uz dodatak galaktoze s ciljem indukcije *GALI* promotora pod čijom kontrolom se nalaze konstrukti gena *SCW4*. Nakon uzgoja proteini stanične stijenke su izolirani te razdvojeni SDS elektroforezom, a zatim i detektirani Western blot metodom pomoću specifičnih antitijela, što je detaljno opisano u poglavlju Materijali i metode.



Slika 14. Western blot analiza proteina iz SDS ekstrakata stijenki kvasca uzgojenog pri pH=7. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi, 2. nativni Scw4 u wt kvascu, 3. mutirani oblik Scw4 AKA u wt kvascu, 4. nativni Scw4 u wt kvascu, 5. mutirani oblik Scw4 mut V u wt kvascu, 6. mutirani oblik Scw4 mut P u wt kvascu, 7. nativni Scw4 u *kex2* kvascu, 8. mutirani oblik Scw4 AKA u *kex2* kvascu, 9. nativni Scw4 u *kex2* kvascu, 10. mutirani oblik Scw4 mut V u *kex2* kvascu, 11. mutirani oblik Scw4 mut P u *kex2* kvascu.

Na slici 14 prikazani su uzorci SDS ekstrakata izolirani nakon uzgoja u puferiranom mediju pH=7. Vidljive su proteinske vrpce svih uzoraka što dokazuje da su svi mutirani oblici proteina uspješno eksprimirani u stanicama i da se vežu nekovalentnim vezama u stijjenu kvasca.



Slika 15. Western blot analiza proteina iz NaOH ekstrakata stijjenu kvasca uzgojenog pri pH=7. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi, 2. nativni Scw4 u wt kvascu, 3. mutirani oblik Scw4 AKA u wt kvascu, 4. nativni Scw4 u wt kvascu, 5. mutirani oblik Scw4 mut V u wt kvascu, 6. mutirani oblik Scw4 mut P u wt kvascu, 7. nativni Scw4 u *kex2* kvascu, 8. mutirani oblik Scw4 AKA u *kex2* kvascu, 9. nativni Scw4 u *kex2* kvascu, 10. mutirani oblik Scw4 mut V u *kex2* kvascu, 11. mutirani oblik Scw4 mut P u *kex2* kvascu.

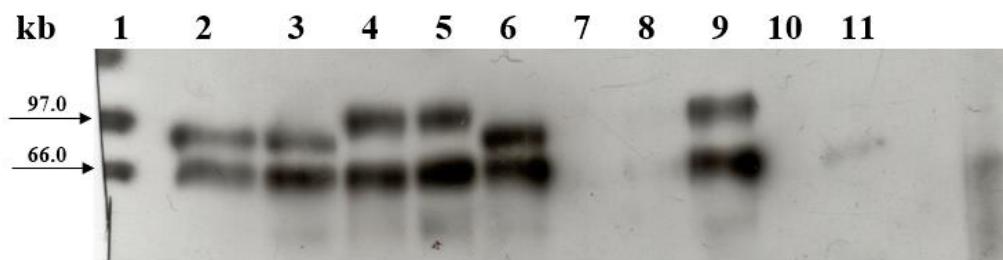
Na slici 15 prikazani su uzorci NaOH ekstrakata izolirani nakon uzgoja kvasca u puferiranom mediju pri pH=7. Kod uzorka Scw4 AKA i Scw4 mut P i u divljem tipu kvasca i u *kex2* mutantu vidljiva je proteinska vrpca Scw4 proteina što znači da mutacije u ovim regijama nisu utjecale na sposobnost kovalentne ugradnje Scw4 proteina u stijjenu. Naprotiv, Scw4 mut V forma proteina nije vidljiva niti u divljem tipu kvasca niti u *kex2* mutantu što navodi na zaključak kako je ta regija odgovorna za kovalentno vezanje proteina u stijjenu.



Slika 16. Western blot analiza proteina iz SDS ekstrakata stijjenu kvasca uzgojenog pri pH=4. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi, 2. nativni Scw4 u wt kvascu, 3. mutirani oblik Scw4 AKA u wt kvascu, 4. nativni Scw4 u *kex2* kvascu, 5. mutirani oblik Scw4 AKA u *kex2* kvascu,

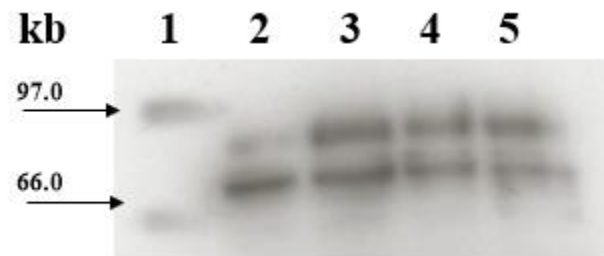
6. nativni Scw4 u wt kvascu 7. mutirani oblik Scw4 mut V u wt kvascu, 8. mutirani oblik Scw4 mut P u wt kvascu, 9. nativni Scw4 u *kex2* kvascu, 10. mutirani oblik Scw4 mut V u *kex2* kvascu, 11. mutirani oblik Scw4 mut P u *kex2* kvascu.

Na slici 16 prikazani su uzorci SDS ekstrakata izolirani nakon uzgoja kvasca u puferiranom mediju pH=4. Vidljive su proteinske vrpce svih uzoraka što dokazuje kako su svi mutirani oblici proteina uspješno eksprimirani i transportirani u stijenku te se vežu nekovalentnim vezama u stijenku kvasca. Evidentne su samo najmanje forme proteina, što potvrđuje aktivnost japsinskih i Kex2 proteaza pri niskim pH-vrijednostima.



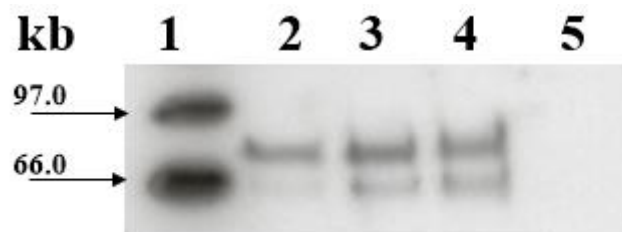
Slika 17. Western blot analiza proteina iz NaOH ekstrakata stijenki kvasca uzgojenog pri pH=4. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi, 2. nativni Scw4 u wt kvascu, 3. mutirani oblik Scw4 AKA u wt kvascu, 4. nativni Scw4 u *kex2* kvascu, 5. mutirani oblik Scw4 AKA u *kex2* kvascu, 6. nativni Scw4 u wt kvascu, 7. mutirani oblik Scw4 mut V u wt kvascu, 8. mutirani oblik Scw4 mut P u wt kvascu, 9. nativni Scw4 u *kex2* kvascu, 10. mutirani oblik Scw4 mut V u *kex2* kvascu, 11. mutirani oblik Scw4 mut P u *kex2* kvascu.

Na slici 17 prikazani su uzorci NaOH ekstrakata izolirani nakon uzgoja kvasca u puferiranom mediju pH=4. Wt Scw4 AKA poput nativnog dolazi u dvije vrpce srednje i najmanje veličine jer su pri niskom pH i u divljem tipu aktivne japsinske i Kex2 proteaze. Uzorci *kex2* Scw4 nativni i *kex2* Scw4 AKA očekivano ne pokazuju srednju vrpcu, s obzirom na to da stanice *kex2* nemaju Kex2 proteazu. Wt Scw4 mut V i *kex2* Scw4 mut V nisu vidljivi ni u jednom od kvasaca što navodi na zaključak kako je ta regija odgovorna za kovalentno vezanje proteina u stijenku. Uzorci wt Scw4 mut P i *kex2* Scw4 mut P su iznimno slabo vidljivi, iako se očekivalo njihovo vezanje. Ovakav rezultat bi mogao biti posljedica promjene konformacije mutiranog proteina koja posredno utječe na uspješnost uspostavljanja kovalentnih interakcija sa staničnom stijenkom u ovim pH uvjetima.



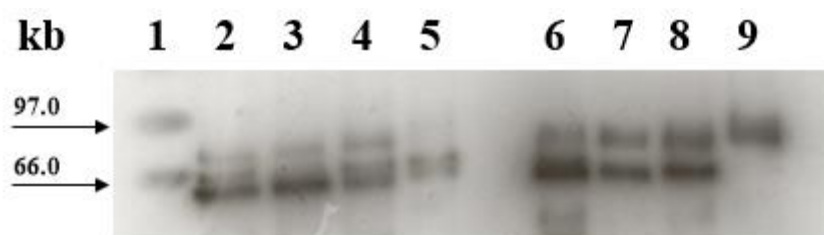
Slika 18. Western blot analiza proteina SDS ekstrakata stijenki kvasca nakon uzgoja u nepuferiranom mediju. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi, 2. nativni Scw4 u wt kvascu, 3. mutirani oblik Scw4 Q1 u wt kvascu, 4. mutirani oblik Scw4 Q2 u wt kvascu, 5. mutirani oblik Scw4 Q3 u wt kvascu.

Na slici 18 prikazani su uzorci SDS ekstrakata izolirani iz stijenki divljeg tipa kvasca transformiranih plazmidima koji nose Scw4 Q1, Scw4 Q2 i Scw4 Q3 mutirane forme proteina nakon uzgoja kvasca u nepuferiranom mediju. Svi uzorci su vidljivi, pa se iz toga može zaključiti da su svi konstrukti uspješno eksprimirani i transportirani u stijenku te da se vežu u stijenku kvasca nekovalentnim vezama.



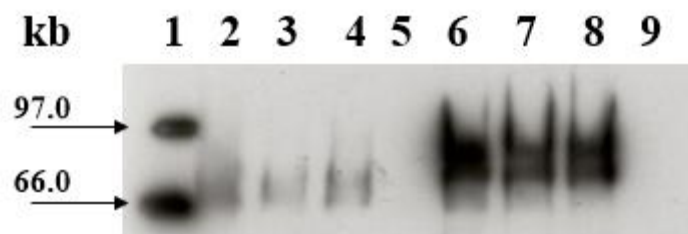
Slika 19. Western blot analiza proteina NaOH ekstrakata stijenki kvasca nakon uzgoja u nepuferiranom mediju. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi, 2. nativni Scw4 u wt kvascu, 3. mutirani oblik Scw4 Q1 u wt kvascu, 4. mutirani oblik Scw4 Q2 u wt kvascu, 5. mutirani oblik Scw4 Q3 u wt kvascu.

Na slici 19 prikazani su uzorci NaOH ekstrakata izolirani nakon uzgoja kvasca u nepuferiranom mediju. Rezultati pokazuju fragmente srednje i najmanje veličine za prva tri uzorka, dok se uzorak wt Scw4 Q3 ne vidi, što ukazuje da je ovaj glutaminski ostatak odgovoran za kovalentno vezanje ovog proteina u stijenku.



Slika 20. Western blot analiza proteina SDS ekstrakata stijenki kvasca nakon uzgoja pri pH=4 i pH=7. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi; 2. nativni Scw4 u wt kvascu na pH=4; 3. mutirani oblik Scw4 Q1 u wt kvascu na pH=4; 4. mutirani oblik Scw4 Q2 u wt kvascu na pH=4; 5. mutirani oblik Scw4 Q3 u wt kvascu na pH=4; 6. nativni Scw4 u wt kvascu na pH=7; 7. mutirani oblik Scw4 Q1 u wt kvascu na pH=7; 8. mutirani oblik Scw4 Q2 u wt kvascu na pH=7; 9. mutirani oblik Scw4 Q3 u wt kvascu na pH=7.

Na slici 20 prikazani su uzorci SDS ekstrakata izolirani nakon iz stijenki nakon uzgoja kvasca u puferiranom mediju pri pH=7 odnosno pH=4. Vidljive su proteinske vrpce svih uzoraka što dokazuje kako su svi mutirani oblici proteina uspješno eksprimirani i transportirani u stijenk u koju se vežu nekovalentnim vezama.



Slika 21. Western blot analiza proteina NaOH ekstrakata stijenki kvasca nakon uzgoja pri pH=4 i pH=7. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi; 2. nativni Scw4 u wt kvascu pri pH=4; 3. mutirani oblik Scw4 Q1 u wt kvascu pri pH=4; 4. mutirani oblik Scw4 Q2 u wt kvascu pri pH=4; 5. mutirani oblik Scw4 Q3 u wt kvascu pri pH=4; 6. nativni Scw4 u wt kvascu pri pH=7; 7. mutirani oblik Scw4 Q1 u wt kvascu pri pH=7; 8. mutirani oblik Scw4 Q2 u wt kvascu pri pH=7; 9. mutirani oblik Scw4 Q3 u wt kvascu na pH=7.

Na slici 21 prikazani su uzorci NaOH ekstrakata izolirani iz stijenki nakon uzgoja u puferiranom mediju pri pH=4 odnosno pri pH=7. Nativni Scw4, wt Scw4 Q1 i wt Scw4 Q2 vidljivi su na oba pH. Kao i kod uzgoja u nepuferiranom mediju, uzorak proteina wt Scw4 Q3 ne vidi se ni pri jednom pH, što potvrđuje kako je odgovoran za kovalentno vezanje u stijenk u.

Zbog mogućnosti jednostavne genetičke manipulacije, kratkog generacijskog vremena te potpuno sekvencioniranog genoma (Goffeau i sur., 1996), kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je modelni organizam za istraživanja različitih procesa u eukariotskim stanicama. Idealan je i za provođenje procesa fermentacije zbog visoke učinkovitosti i brzog rasta tijekom kojeg kao supstrat može koristiti različite šećere. Oblik i čvrstoća stanica *S. cerevisiae* definirana je njegovom staničnom stijenkom koja ujedno osigurava fleksibilnost stanice tijekom sporulacije i rasta (Teparić i sur., 2007). Vanjski sloj stijenke čine manoproteini za koje se pretpostavlja da ograničavaju njenu propusnost te određuju površinska svojstva stanice (Grbavac i sur., 2017). Unutrašnjost stanične stijenke nastala je umrežavanjem polisaharida β -1,3-glukana s β -1,6-glukanom i hitinom, a zaslužna je za mehaničku stabilnost i osmotsku stabilnost stanica (Mrša i sur., 1997). Na polisaharidne komponente stijenke kovalentnim ili nekovalentnim interakcijama vežu se proteini. Nevalentno vezani proteini tvore veze s β -1,3-glukanom, a iz stijenke se mogu izolirati pomoću vrućeg SDS-a i β -merkaptioetanol (Mrša i sur., 2007). Kovalentno vezani proteini iz PIR porodice (engl. Proteins with Internal Repeats) na N-terminusu sadrže karakteristične ponavljajuće sekvence čiji glutaminski ostaci mogu tvoriti estersku vezu s hidroksilnom skupinom glukoze β -1,3-glukana (Ecker i sur., 2006). PIR proteini iz stijenke se mogu izolirati prekonoćnom inkubacijom na +4 °C u 30 mM NaOH (Mrša i sur., 1997). Za razliku od proteina PIR porodice, drugu skupinu od ukupno dvanaest proteina karakterizira povezivanje s β -1,6-glukanom stanične stijenke preko ostatka GPI (glikozilfosfatidil-inozitolnog) sidra, a izoliraju se pomoću glukanaza (Lipke i sur., 1989; Roy i sur., 1991).

Scw4 protein smatrao se nekovalentno vezanim proteinom i prvotno je izoliran u SDS ekstraktu (Cappellaro i sur., 1998), međutim, daljnjim istraživanjem ustanovljeno je kako se Scw4 protein veže i kovalentnim vezama u stijenku. Nakon disrupcije sva 4 PIR gena i izolacije proteina iz takvog četverostrukog *pir* mutanta u NaOH ekstraktu dobivena je vrpca veličine 67 kDa koja odgovara veličini Scw4. Zaključak da se Scw4 protein veže na oba načina u stijenku potvrđen je disrupcijom *SCW4* gena u četverostrukom *pir* mutantu nakon čega proteinska vrpca veličine 67 kDa više nije bila vidljiva (Teparić i sur., 2010). Usprkos napretku svih dosadašnjih istraživanja, mehanizam odgovoran za kovalentno vezanje Scw4 u stijenku još uvijek nije poznat, međutim, zbog načina njegove izolacije, smatra se kako bi mogao biti sličan mehanizmu vezanja PIR proteina. Obzirom da se PIR proteini kovalentno povezuju sa staničnom stijenkom pomoću određenog glutaminskog ostatka, u ovom radu za provedbu eksperimenata odabrana je regija Scw4 proteina koja sadrži glutaminske ostatke najbližnje raspoređene onima u

odgovarajućoj regiji PIR proteina, a mutirani konstrukti nazvani su pBG1805 SCW4 mut V, pBG1805 SCW4 Q1, pBG1805 SCW4 Q2 i pBG1805 SCW4 Q3. Također, mutacija je uvedena u još jednu regiju koja je donekle slična PIR repetitivnoj sekvenci po sadržaju glutaminskih ostataka (konstrukt pBG1805 SCW4 mut P), te u regiju na koju djeluju japsinske proteaze, a koja sadrži dva glutaminska ostatka (konstrukt pBG1805 SCW4 AKA). Mutacije su uvedene PCR-om upotrebom Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit-a, a dobivenim plazmidima transformirana je bakterija *Escherichia coli* s ciljem njihovog umnažanja. Nakon uzgoja bakterije, plazmidi su izolirani i provjereni restriksijskom analizom, te vizualizacijom uz dodatak etidij-bromida nakon provedene elektroforeze. Plazmidima je potom transformiran kvasac i uzgojen do logaritamske faze rasta, nakon čega je provedeno razbijanje stanica i izolacija stijenki i proteina stijenki. Nekovalentno vezani proteini izdvojeni su pomoću vrućeg SDS-a uz dodatak β-merkaptetanola, dok su kovalentni proteini ekstrahirani pomoću 30 mM NaOH. Vizualizacija proteina vrši se pomoću Western blot metode detaljno opisane u poglavlju Materijali i metode.

Prema rezultatima prethodno provedenih istraživanja u ovom Laboratoriju, na temelju vidljivih proteinskih vrpca možemo donijeti zaključke o njihovom procesiranju. Najveća forma odgovara neprocesiranom obliku proteina, forma srednje veličine predstavlja protein procesiran Kex2 proteazom, a najmanja forma predstavlja protein procesiran japsinskim proteazama. Na formu utječe i pH medija u kojem se odvijao uzgoj proteina, pa tako znamo da su proteolitički enzimi aktivniji pri pH=4, dok pri pH=7 imaju smanjenu aktivnost. To je potvrđeno i u ovom radu, te je evidentno na svim uzorcima pri pH=7 gdje se ne vidi vrpca koja predstavlja najmanju formu proteina. Također, u uzorcima izoliranim iz *kex2* kvasca koji ne posjeduje Kex2 proteazu, nema pojave srednje vrpce, što je sukladno dosadašnjim istraživanjima.

Forma proteina Scw4AKA u kojoj su mutirani glutaminski ostatci u regiji u kojoj se vrši procesiranje japsinskim proteazama vidljiva je u NaOH ekstraktima pri oba pH. Međutim, pri pH=4 evidentna je najmanja forma proteina, što znači da su japsinske proteaze aktivne. Kod pH=7 izostanak donje, te vidljivost samo najveće vrpce možemo pripisati utjecaju pH kada je aktivnost proteolitičkih enzima smanjena. Budući da se ovaj mutirani protein uspješno veže u stijenku kovalentnim vezama može se zaključiti da glutaminski ostatci u ovoj regiji nisu odgovorni za kovalentno vezanje proteina u stijenku.

Uzorci Scw4mutP u divljem tipu kvasca i u *kex2* mutantu vidljivi su u NaOH ekstraktima pri pH=7, međutim pri pH=4 vide se jako slabo. Ovakav rezultat bi mogao biti posljedica promjene

konformacije mutiranog oblika proteina koja se negativno odražava na mogućnost kovalentnog vezanja ovog proteina na stijenku. Konačni zaključak je, međutim, kako ova regija nije odgovorna za kovalentno vezanje proteina u stijenku.

Uzorci Scw4mutV proteina u divljem tipu kvasca i u *kex2* mutantu nisu vidljivi u NaOH ekstraktima ni pri jednom pH, što navodi na zaključak kako je mutirana regija Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁ odgovorna za kovalentno vezanje proteina Scw4 u stijenku. Obzirom da se radi o regiji koja sadrži tri glutaminska ostatka, sljedeći cilj ovog rada bio je ustanoviti koji od tri glutamina je odgovoran za kovalentno vezanje. Iz tog razloga konstruirana su tri mutanta. U konstrukt pBG1805 SCW4Q1 mutiran je prvi, u konstrukt pBG1805 SCW4Q2 drugi, a u pBG1805 SCW4Q3 treći glutamin. Nakon uzgoja kvasca do logaritamske faze, razbijanja stanica te izolacije proteina iz stijenki, Western blot metodom dobiveni su rezultati prikazani na slikama 14-21. Uzgoj je proveden u nepuferiranom mediju, te pri pH=4 i pH=7. U NaOH ekstraktu uzoraka za nepuferirani medij vidljivi su najmanji fragmenti te fragmenti srednje veličine za uzorke Scw4Q1 i Scw4Q2, tj. proteolitički procesirane forme, dok uzorak Scw4Q3 nije vidljiv. Uzorak Scw4Q3 također nije vidljiv ni u puferiranom mediju, dok se za uzorke Scw4Q1 i Scw4 Q2 pri pH=4 vide obje procesirane forme, a pri pH=7 najmanje vrpce nema jer su tada japsinske proteaze slabo aktivne. Sumarno, može se zaključiti kako je za kovalentno vezanje proteina Scw4 u stijenku kvasca odgovoran glutaminski ostatak Q₂₄₁ regije Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁.

Kako je već prethodno spomenuto, regija Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁ odabrana je iz razloga što pokazuje sličnosti s ponavljajućom regijom PIR proteina u rasporedu glutaminskih ostataka (slika 10). Rezultati provedenih eksperimenata u ovom radu donekle se razlikuju od očekivanih da bi za kovalentno vezanje trebao biti odgovoran glutaminski ostatak Q₂₃₈ u sekvenci, obzirom da je on ključan u kovalentnom povezivanju PIR proteina. Međutim, ponavljanje eksperimenata u puferiranom i nepuferiranom mediju, te provjera plazmida sekvencioniranjem ukazuju na njihovu točnost.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Rezultati ovog rada dokazali su kako je regija Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁ Scw4 proteina odgovorna za njegovo kovalentno vezanje u stijenku kvasca.
2. Glutaminski ostatci koji se nalaze u regiji za procesiranje Scw4 djelovanjem japsinskih proteaza nisu odgovorni za kovalentno vezanje Scw4 proteina u stijenku.
3. Nakon mutacije svakog od tri glutaminska ostatka regije Q₂₃₃ATPSQ₂₃₈VGQ₂₄₁, rezultati su pokazali kako je glutamin Q₂₄₁ odgovoran za kovalentno vezanje proteina Scw4 u stijenku kvasca.

7. LITERATURA

- Azuma, M., Levinson, J. N., Pagé, N., Bussey, H. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* Big1p, a putative endoplasmic reticulum membrane protein required for normal levels of cell wall β -1,6-glucan. *Yeast*. **19**, 783-793.
- Bassi, D. E., Lopez De Cicco, R., Magloogi, H., Zucker, S., Thomas, G., Klein-Szanto, A. J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10326-10331.
- BiologyWise, <<https://biologywise.com/chitin-structure-function-uses>>. Pristupljeno 7. siječnja 2021.
- BioVector NTCC Collection Center, <<http://www.biovector.net/product/1511965.html>>. Pristupljeno 7. siječnja 2021.
- Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P., Blondin, B. (1997) Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J. Bacteriol.* **179**, 4929-4936.
- Brenner, C., Fuller, R. S. (1992) Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 922-926.
- Brickner, J. H, Fuller, R. S. (1997) SOI1 encodes a novel, conserved protein that promotes TGN-endosomal cycling of Kex2p and other membrane proteins by modulating the function of two TGN localization signals. *J. Cell Biol.* **139**, 23-36.
- Cabib, E., Drgonova, J., Drgon, T. (1998) Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 307-333.
- Cabib, E., Roh, D.H., Schmidt, M., Crotti, L.B., Varma, A. (2001) The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 19679-19682.
- Cappellaro, C., Mrša, V., Tanner, W. (1998) New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J. Bacteriol.* **180**, 5030-5037.
- Cawley, N. X., Chino, M., Maldonado, A., Rodriguez, Y. M., Loh, Y. P., Ellman, J. A. (2003) Synthesis and characterization of the first potent inhibitor of yapsin 1. Implications for the study of yapsin-like enzymes. *J. Biol. Chem.* **278**, 5523–5530.

Cawley, N. X., Olsen, V., Zhang, C. F., Chen, H. C., Tan, M., Loh, Y.P. (1998) Activation and processing of non-anchored yapsin 1 (Yap3p). *J. Biol. Chem.* **273**, 584-591.

Dallies, N., Francois, J., Paquet, V. (1998) A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **14**, 1297-1306.

Dempski, R. E., Jr., Imperiali, B. (2002) Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 844-850.

Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrša, V., Tanner, W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J. Biol. Chem.* **281**, 11523-11529.

Elicityl (2002), <<https://www.elocityl-oligotech.com/mannan/595-mannan-polysaccharide-from-yeast.html>>. Pristupljeno 7. siječnja 2021.

Fontaine, T., Magnin, T., Melhert, A., Lamont, D., Latge, J. P., Ferguson, M. A. (2003) Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane proteins. *Glycobiology*. **13**, 169-177.

Frieman, M. B., Cormack, B. P. (2003) The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol. Microbiol.* **50**, 883-896.

Gagnon-Arsenault, I., Tremblay, J., Bourbonnais, Y. (2006) Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. *FEMS Yeast Res.* **6**, 966-978.

Garcia-Rodriguez, L. J., Duran, A., Roncero, C. (2000) Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J. Bacteriol.* **182**, 2428-2437.

Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N., Kitada, K. (1999) Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J. Bacteriol.* **181**, 3886-3889.

- Heiman, M.G., Engel, A., Walter, P. (2007) The Golgi-resident protease Kex2 acts in conjunction with Prm1 to facilitate cell fusion during yeast mating. *J. Cell Biol.* **176**, 209-222.
- Huges, S., Moody, A. (2007) *PCR*. Scion Publishing Limited, Oxfordshire.
- Imhof, I., Flury, I., Vionnet, C., Roubaty, C., Egger, D., Conzelmann, A. (2004) Glycosylphosphatidylinositol (GPI) proteins of *Saccharomyces cerevisiae* contain ethanolamine phosphate groups on the α 1,4-linked mannose of the GPI anchor. *J. Biol. Chem.* **279**, 19614-19627.
- Kitagaki, H., Shimoji, H., Itoh, K. (1997) Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, Tir1p/Srp1p in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.* **249**, 343-349.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews.* **26**,239-256.
- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., Cabib, E. (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta (1-6)-glucan interconnects mannoprotein, beta-(1-3)-glucan and chitin. *J. Biol. Chem.* **272**, 17762-17775.
- Komano, H., Fuller, R. S. (1999) Shared functions in-vivo of a glycosyl-phosphatidylinositol linked aspartyl protease, Mkc7, and the proprotein processing protease Kex2 in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10752–10756.
- Komano, H., Rockwell, N., Wang, G. T., Krafft, G. A., Fuller, R. S. (1999) Purification and characterization of the yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored, monobasic-specific aspartyl protease yapsin 2 (Mkc7p). *J. Biol. Chem.* **274**, 24431–24437.
- Krysan, D. J, Ting, E. L., Abeijon, C., Kroos, L., Fuller, R. S. (2005) Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot.Cell.* **4**, 1364-1374.
- Lesage, G., Bussey, H. (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 318-322.
- Lesage, G., Prat, A., Lacombe, J., Thomas, D., Seidah, N., Boileau, G. (2000) The Kex2p proregion is essential for the biosynthesis of an active enzyme and requires a C-terminal basic residue for its function. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 1947-1957.

- Levinson, J., N., Shahinian, S., Sdicu, A., Tessier, D., C., Bussey, H. (2002) Functional, comparative and cell biological analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Kre5p. *Yeast*. **19**, 1243-1259.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., Tang, J. (2000) Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the betasecretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 1456–1460.
- Lipke, P. N., Ovalie, R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**, 3735-3740.
- Mazzoleni S.p.A. (1984), Mazzoleni Prodotti Zootecnici, <<https://www.mazzoleni.com/en/news/yeast-cell-wall-benefits-all>>. Pristupljeno 7. siječnja 2021.
- Montijn, R. C., van Rinsum, J., van Schagen, F. A., Klis, F. M. (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J. Biol. Chem.* **269**, 19338-19342.
- Mouassite, M., Camougrand, N., Schwob, E., Demaison, G., Laclau, M., Guerin, M. (2000) The ‘SUN’ family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation. *Yeast*. **16**, 905-919.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P., Latge, J. P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**, 14882-14889.
- 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 Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*. **15**, 813-820.
- NEB (1970) New England BioLabs Inc., <<https://international.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit#Product%20Information>>. Pristupljeno 7. siječnja 2021.

- Newport, G., Kuo, A., Flattery, A., Gill, C., Blake, J. J., Kurtz, M., Abruzzo, G., Agabian, N. (2002) Inactivation of Kex2p diminishes virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **278**, 1713-1720.
- 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. *Biochem. J.* **339**, 407-411.
- Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M., Nicaud, J. M. (2000) Characterization of extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolitica*. *J. Bacteriol.* **182**, 2802-2810.
- Popolo, L., Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**, 385-400.
- Powell, C. D., Quain, D., Smart, K. A. (2003) Chitin scar breaks in aged *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* **149**, 3129-3137.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., Barrett, A. J. (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J.* **378**, 705-716.
- Richter, C., Tanaka, T., Yada, R. Y. (1998) Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem J.* **335**, 481-490.
- Rockwell, N.C., Thorner, J. W. (2004) The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends. Biochem. Sci.* **29**, 80-87.
- Rodriguez-Pena, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J. & Nombela, C. (2000) A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3245-3255.
- Sambrook, J., Russel, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.
- Seidl, J., Tanner, W. (1997) Characterization of two new genes down-regulated by α -factor. *Yeast.* **13**, 809-817.
- Sertil, O., Cohen, B. D., Davies, K. J. A., Lowry, C. V. (1997) The *DANI* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated in parallel with the hypoxic genes, but by a different mechanism. *Gene.* **192**, 199-205.

Shimoi, H., Kitagaki, H., Ohmor, H., Iimura, Y., Ito, K. (1998) Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J. Bacteriol.* **177**, 3381-3387.

Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., Fucier, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 3273-3297.

Stuparević, I. (2010) Identifikacija i uloga proteina stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izoliranih alkalnom ekstrakcijom. *Doktorska disertacija*, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Šestak, S., Hagen, I., Tanner, W., Strahl, S. (2004) Scw10p, a cell wall glucanase/transglucosidase important for cell wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* **150**, 3197-3208.

Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 753-766.

Van Rinsum, J., Klis, F.M. and van den Ende, H. (1991) Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae* *mnn9*. *Yeast.* **7**, 717-726.

Wilcox, C. A., Redding, K., Wright, R., Fuller, R. S. (1992) Mutation of a tyrosine localization signal in a cytosolic tail of yeast Kex2 protease disrupts Golgi retention and results in default transport to the vacuole. *Mol. Biol. Cell.* **3**, 1353-1371.

Wolff, A. M., Din, N., Petersen, J. G. (1996) Vacuolar and extracellular maturation of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast.* **12**, 823-832.

Zhou, A., Webb, G., Zhou, X., Steiner, D. F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 20745-20748.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Dora Hrestak

Dora Hrestak