

Utjecaj uklanjanja Cwp2, Scw4 i/ili Pir proteina iz stanične stijenke na efikasnost izlaganja heterolognih proteina na površini kvasca

Vukšić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:845886>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-22**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Lucija Vukšić
7880/BT**

**Utjecaj uklanjanja Cwp2, Scw4 i/ili Pir proteina iz stani-
čne stijenke na efikasnost izlaganja heterolognih proteina
na površini kvasca**

ZAVRŠNI RAD

**Predmet: Biokemija
Mentor: dr. sc. Mateja Lozančić**

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj uklanjanja Cwp2, Scw4 i/ili Pir proteina iz stanične stijenke na efikasnost izlaganja heterolognih proteina na površini kvasca

Lucija Vukšić, 7880/BT

Sažetak: Tehnologija izlaganja proteina na površinu stanične stijenke temelji se na fuzioniranju gena od interesa s nekim od gena koji kodira za proteine stijenke te se tako nastali rekombinantni protein ugrađuje u stijenku kvasca. Na ovaj način moguće je eksprimirati čitave enzimske sustave čime se postiže njihova imobilizacija, lakše izdvajanje produkta te produljeno prisustvo biokatalizatora u odnosu na procese koji koriste pročišćene enzime. Cilj ovog rada jest ispitati utjecaj uklanjanja nativnih proteina iz stanične stijenke na efikasnost izlaganja heterolognih proteina na površinu stanice. U tu svrhu korišteni su konstrukti u kojima je gen *bla* fuzioniran sa nativnim genom *PIR2* odnosno dijelom gena *CCW12* te je rekombinantni protein zatim eksprimiran u stanicama divljeg tipa i u stanicama mutanata. Uspješnost ugradnje enzima u staničnu stijenku analizirana je mjerenjem aktivnosti β -laktamaze izložene na površinu stanice. Najveće povećanje aktivnosti u odnosu na stanice divljeg tipa postignuto je eksprimiranjem konstrukta *CCW12bla* u stanicama *4pir Δ scw4 Δ* .

Ključne riječi: *Saccharomyces cerevisiae*, izlaganje proteina na staničnoj površini, Pir proteini, Scw4, Cwp2

Rad sadrži: 33 stranica, 6 slika, 7 tablica, 59 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: dr. sc. Mateja Lozančić

Datum obrane: 7. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis
University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

The effect of removing Cwp2, Scw4 and/or Pir proteins from the cell wall on the efficiency of yeast surface display of heterologous proteins

Lucija Vukšić, 7880/BT

Abstract: The yeast surface display technology is based on fusing the gene of interest with one of the genes that code for the proteins of the cell wall, and the resulting recombinant protein is incorporated in the wall. By using surface display it is possible to achieve expression and immobilisation of enzymes, simplification of product purification, and prolongation of biocatalysts presence in the reactions. This work aims to examine the influence of removing native proteins from the cell wall on the efficiency of surface display. For this purpose, constructs were used in which the *bla* gene, coding for beta-lactamase, was fused with the *PIR2* or fragment of *CCW12* gene. The recombinant protein was expressed in wild-type and mutated cells. Efficiency of enzyme incorporation into the wall was analyzed by measuring β -lactamase activity. Highest increase of activity compared to wild type was measured in *4pir Δ scw4 Δ* mutant when *CCW12bla* construct was expressed.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, yeast surface display, Pir proteins, Scw4, Cwp2

Thesis contains: 33 pages, 6 figures, 7 tables, 59 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Mateja Lozančić, PhD

Thesis defended: September 7th, 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KVASAC <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	2
2.2. STANIČNA STIJENKA KVASCA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	2
2.2.1. POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE	3
2.3. PROTEINI STANIČNE STIJENKE	3
2.3.1. NEKOVALENTNO VEZANI PROTEINI	4
2.3.2. KOVALENTNO VEZANI PROTEINI	5
2.4. SUSTAV IZLAGANJA PROTEINA.....	7
2.4.1. ENZIM B-LAKTAMAZA	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. KEMIČALIJE.....	11
3.1.2. UREĐAJI	11
3.1.3. KORIŠTENI SOJEVI KVASCA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	12
3.1.4. OTOPINE I PUFERI	13
A) HRANJIVA PODLOGA ZA UZGOJ KVASCA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (YNBP HIS-).....	13
B) HRANJIVA PODLOGA ZA INDUKCIJU PHO5 PROMOTORA	13
3.1.5. PLAZMIDI.....	15
A) PLAZMID PRSII423 <i>CCW12</i> BLA.....	15
B) PLAZMID PRSII423 <i>PIR2</i> BLA	16
3.2. METODE	17
3.2.1. UZGOJ TRANSFORMIRANIH STANICA KVASCA	17
3.2.2. ODREĐIVANJE BROJA STANICA MJERENJEM OPTIČKE GUSTOĆE	18
3.2.3. UZGOJ KVASCA ZA INDUKCIJU GENA POD REGULACIJOM PHO5 PROMOTORA.....	18
3.2.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI B-LAKTAMAZE NA POVRŠINI STANICA KVASCA.....	18
3.2.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI B-LAKTAMAZE U HRANJIVIM PODLOGAMA.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20

5. ZAKLJUČCI.....	26
6. POPIS LITERATURE	27

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam iz carstva *Fungi* te je radi jeftinog uzgoja i lake genetičke manipulacije jedan od najčešće korištenih modelnih sustava u laboratorijskim istraživanjima. Oblik i čvrstoća kvasca osigurani su staničnom stijenkom koja ujedno štiti stanicu od štetnih vanjskih utjecaja kao što su osmotski i temperaturni šok, djelovanje kemijskih i mikrobnih toksina te omogućava međustaničnu komunikaciju i interakciju sa okolinom. Stanična stijenka izvanstanična je organela građena od unutarnjeg polisaharidnog sloja nastalog umrežavanjem β -1,3-glukana i β -1,6-glukana s hitinom dok je vanjski sloj građen većinom od proteina glikoziliranih mananom. Razlikujemo tri do sada poznata načina vezanja proteina u staničnu stijenu, a to su: nekovalentnim interakcijama (Scw proteini), kovalentno preko glikozilfosfatidilinozitolnog sidra (GPI proteini) i kovalentno preko veze nestabilne u lužnatom (Pir proteini). Osim izrazito bitne uloge za normalnu fiziološku funkciju kvasca, stanična stijenka također je od velikog značaja u biotehnološkim procesima. Već više od dva desetljeća prakticira se tehnologija izlaganja proteina od interesa na površini stanične stijene uz brojne pogodnosti (Pepper i sur., 2008). Ova tehnologija temelji se na fuzioniranju željenog gena s nekim od gena koji kodira za proteine stanične stijene te se tako nastali rekombinantni protein ugrađuje u staničnu stijenu. Na ovaj način moguće je eksprimirati enzimske sustave čime se puno uspješnije postiže njihova imobilizacija, lakše izdvajanje i odvajanje produkta i biokatalizatora u biotehnološkom procesu te je produljeno prisustvo biokatalizatora u procesu u odnosu na procese koji koriste pročišćene enzime. S druge strane ova metoda ima još mnogo prostora za napredovanje, a najveće prepreke su posttranslacijske modifikacije proteina koje mogu dovesti do nepravilne konformacije proteina što posljedično može dovesti do gubitka funkcije te relativno ograničen kapacitet vezanja rekombinantnih proteina na površini stanične stijene (Lozančić, 2021). Upravo ograničeni kapacitet problem je kojim ćemo se baviti u ovom radu. U radu opisan je utjecaj delecije gena koji kodiraju za vrlo zastupljene kovalentno vezane proteine stanične stijene (Cwp2, Scw4 i/ili Pir proteini), na povećanje kapaciteta stanične stijene za ugradnju rekombinantno eksprimiranih proteina u svrhu izlaganja proteina od interesa na površini stanice.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KVASAC *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* nepatogeni je jednostanični eukariotski organizam te pripada carstvu *Fungi*. Karakteriziraju ga relativno kratko generacijsko vrijeme (90 minuta), jeftin uzgoj i jednostavna genetička manipulacija pa je zato vrlo praktičan i često korišten kao modelni organizam u mnogim istraživanjima. Uz sve navedeno genom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prvi je u potpunosti sekvencirani genom nekog eukariotskog organizma. Optimalna temperatura rasta kvasca je od 28 °C do 30°C te može rasti čak i u kiselom okruženju uz visoke koncentracije etanola i niske koncentracije kisika. Zbog navedenih prednosti pri uzgoju danas je često korišten u biofarmaceutskoj industriji te industriji općenito.

2.2. STANIČNA STIJENKA KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izvanstanična je struktura koja ima četiri osnovne uloge, a to su održavanje osmotske stabilnosti unutar stanice, zaštita od stresora u neposrednoj okolini, održavanje oblika i održavanje čvrstoće stanice (Klis i sur., 2006). Također, stanična stijenka omogućuje komunikaciju i interakciju s okolinom koja je vrlo bitna za njeno normalno fiziološko stanje. Iako je zaslužna za oblik i mehaničku zaštitu stanice, ne znači da je stanična stijenka kruta tvorevina, već naprotiv vrlo je dinamička struktura podložna mnogim promjenama tijekom rasta stanice, njene diobe ili razmještaja postojećih struktura. Sastoji se od dva sloja koja su građena od približno 85 % polisaharida i 15 % proteina (Hossain i sur., 2020). Unutarnji sloj stanične stijenke građen je od polisaharida (β -1,3-glukan i β -1,6-glukan) koji osiguravaju osmotsku stabilnost i služe kao prostor za ugradnju proteina. Osim glukana u staničnu stijenku smjestio se i polisaharid hitin koji je pričvršćen na okosnicu β -1,3-glukana. Vanjski sloj čine uglavnom manoproteini koji su kovalentnim ili nekovalentnim interakcijama povezani direktno ili indirektno na polisaharidnu okosnicu. Proteini su zaslužni za komunikaciju s okolinom, propuštanje bitnih nutrijenata u stanicu, vezanje za druge stanice u procesima aglutinacije, flokulacije ili stvaranja biofilma te imaju ulogu i kao strukturni elementi. Na proteine stanične stijenke u procesu glikozilacije pričvršćuje se polisaharid manan koji je kemijski inertan te na taj način formira vanjski sloj stijenke, štiteći pri tome stanice od vanjskih utjecaja i definirajući poroznost stanične stijenke (Teparić i Mrša, 2013).

2.2.1. Polisaharidi stanične stijenke

Najzastupljeniji polisaharid stanične stijenke je β -1,3-glukan koji čini oko 80 % ukupne mase glukana (Ruiz-Herrera, 1991). Kao što mu sam naziv kaže, građen je isključivo od molekula glukoze koje su međusobno povezane β -1,3-glikozidnom vezom (Klis i sur., 2006). Utvrđeno je da kvasac *Saccharomyces cerevisiae* u eksponencijalnoj fazi sadrži lance β -1,3-glukana sastavljene od ukupno 1500 molekula glukoze od kojih je desetak posto povezano β -1,6-glikozidnom vezom. Lanci β -1,3-glukana osim s β -1,6-glukanom povezani su i s hitinom i različitim glikoproteinima (Kollár i sur., 1997). Polisaharid β -1,3-glukan uglavnom zauzima konformaciju jednostruke uzvojnice ili formira strukturu sastavljenu od tri polisaharidna lanca međusobno povezana vodikovim vezama što značajno doprinosi čvrstoći stanične stijenke (Stokke, i sur., 1993; Williams i sur., 1991). β -1,6-glukan razgranati je polimer čiji se lanac uglavnom sastoji od 350 jedinica glukoza (Kollár i sur., 1997). Iako čini samo 10 % ukupnih glukana u stijenci od iznimne je važnosti jer se pomoću njega ostale komponente vežu u staničnu stijenkicu među kojima su hitin i manoproteini. Hitin je linearni polimer molekula *N*-acetilglukozamina povezanih β -1,4-glikozidnim vezama te doprinosi otpornosti stanice na djelovanje glukanaza i povećava čvrstoću stanične stijenke. Prilikom uzgoja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u laboratorijskim uvjetima njegov udio nije veći od 3 %, no stanice izložene velikoj količini stresa mogu dostići i udio od 20 % (Teparić i Mrša, 2013; Kapteyn i sur., 1997). Polisaharid manan u staničnoj stijenci ne stoji zasebno, već predstavlja mananski dio hibridnih molekula glikoproteina. Upravo je manan zaslužan za zaštitu stanice od nepovoljnih uvjeta i zauzimanje pravilne konformacije pa je njegovo prisustvo važno iako ne zauzima veliki udio u građi stanične stijenke.

2.3. PROTEINI STANIČNE STIJENKE

Vanjski dio stanične stijenke uglavnom se sastoji od manoproteina koji u staničnoj stijenci zauzimaju oko 35 % suhe tvari stanične stijenke (De Nobel, 1990). Sami proteini mogu se podijeliti u tri skupine prema načinu vezanja na β -1,3-glukan i β -1,6-glukan stanične stijenke (Orlean, 2012). Prvu skupinu čine kovalentno vezani proteini preko GPI sidra koje je moguće izolirati tretmanom glukanaazama. Iduća skupina su proteini vezani preko sustava *Pir* proteina koji se vežu direktno na β -1,3-glukan pomoću specifičnih ponavljajućih sekvenca te ih je moguće izolirati tretmanom NaOH. Posljednju skupinu čine nekovalentno vezani proteini te ih je moguće izolirati kuhanjem u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptetoetanolu (Mrša i sur., 1997). Proteine je također moguće podijeliti prema ulozi u

staničnoj stijenci. Prva skupina podrazumijeva proteine s potencijalom sudjelovanja u izgradnji stanične stijenke (npr. hidrolaze i transglikolaze), dok druga skupina obuhvaća proteine bez enzimске aktivnosti kao što su aglutinini i flokulini (Goossens i Willaert, 2010; Dranginis i sur., 2007; Klis i sur., 2006). Većina je proteina iz spomenutih skupina visoko *O*- ili *N*-glikozilirana. Također dio proteina posjeduje senzorsku ulogu u otkivanju stresa stanične stijenke te pokretanju CWI (en. *Cell Wall Integrity*) signalnog puta.

2.3.1. Nekovalentno vezani proteini

Nekovalentno vezani proteini čine čak 80% ukupnih proteina stanične stijenke, ali ih za sada većina nije uspješno izolirana i pročišćena. Ovi proteini uglavnom su *O*-glikozilirani pa nose samo 10 % ukupnog manana u stijenci (Teparić i Mrša, 2013). Moguće ih je izolirati tretmanom SDS-om uz zagrijavanje u nereducirajućim uvjetima što dovodi do pucanja veza i oslobađanja proteina. Izolaciju je također moguće provesti prekonoćnom inkubacijom u 2 mM otopini ditiotreitola. Smatra se da su nekovalentno vezani proteini vezani nespecifičnim interakcijama s β -1,3-glukanom no točan način vezanja i dalje nije istražen. Ova skupina proteina poznata je pod nazivom Scw proteini što stoji kao akronim engleskog naziva *Soluble Cell Wall Proteins*. Do sada poznati nekovalentno vezani proteini su: Scw9, Scw2, Scw3, Scw10, Scw6, Scw11, Scw4, Dse4, Bgl1, Knh1 i Kre9. Za ove proteine poznata je i njihova uloga pa je tako utvrđeno da Knh1 i Kre9 sudjeluju u sintezi β -1,6-glukana, Scw3 sudjeluje u septaciji, Scw9 djeluje kao endo- ili transglukozidaza, Scw2 djeluje kao endohitinaza, Eng1 je glukanaza, dok su Scw4, Scw10 i Scw11 koji potencijalne glukanaze. U ovom radu je, između ostalih, kao jedan od proteina stanične stijenke koji je uklonjen zbog potreba istraživanja, uklonjen i Scw4 zbog svojih specifičnih svojstava. Naime, Scw4 protein prvi je puta opisan kao protein koji sa stijenkom stvara nekovalentne veze (Cappellaro i sur., 1998), ali je kasnije utvrđeno kako dio ovog proteina ostaje vezan za stijenkku i nakon što se uklone nekovalentno vezani proteini (Teparić i sur., 2004). Protein Scw10 pokazuje znatnu homologiju sa proteinom Scw4 (više od 60 %). Kod oba proteina utvrđeno je postojanje signalne sekvence za upućivanje u sekretorni put, te sekvence koju prepoznaje proteaza Kex2, kao i nedostatak signala za vezanje GPI sidra. Utvrđeno je da disrupcija gena *SCW4* ne dovodi do vidljivog fenotipa, kao ni kod *SCW10*, ali mutanti *scw4scw10* pokazuju smanjenu mogućnost parenja, povećanu osjetljivost na inhibitore te produljeno generacijsko vrijeme (Cappellaro i sur., 1998).

2.3.2. Kovalentno vezani proteini

Kovalentno vezane proteine na staničnu stijenku moguće je prema prirodi veze podijeliti u dvije skupine, proteine vezane pomoću djelomično procesiranog GPI sidra i Pir proteine vezane pomoću esterske veze nestabilne u lužnatom mediju.

Prvu skupinu, proteine vezane pomoću GPI sidra, moguće je izolirati primjenom β -1,3-glukanaze ili β -1,6-glukanaze najčešće izolirane iz stanica bakterija *Escherichia coli*. GPI sidro u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* sastoji se od osnovne strukture protein-CO-NH₂-CH₂-CH₂-PO₄-6-Man- α -1,2-Man- α -1,6-Man- α -1,4-GlcN- α -1,6-mioinozitol fosfolipid (Fankhauser i sur., 1993). Najmanje dvadeset i jedna vrsta proteina uključena je u sintezu prekursora GPI sidra te njegovo vezanje u endoplazmatski retikulum. Osamnaest potrebnih proteina kodirano je esencijalnim genima te mutanti kojima nedostaje bilo koji drugi nekatalitički protein pokazuju ozbiljne nedostatke rasta (Orlean, 2012). Sama sinteza GPI sidra započinje transferom GlcNAc sa UDP-GlcNAc na fosfatidilinozitol vezan na citoplazmatsku stranu membrane ER (Sobering, 2004; Kostova, 2000). Na sintezu GPI sidra troši se velika količina energije te se sastoji od dvanaest opsežnih koraka u koje su uključeni brojni enzimi. Dio sinteze odvija se na citoplazmatskoj strani membrane i u lumenu endoplazmatskog retikuluma (Vishwakarma i Menon, 2005; Vidugiriene i Menon, 1993.; Watanabe i sur., 1999) nakon čega se formirano GPI sidro prebacuje na protein gdje podliježe remodeliranju (Tanaka i sur, 2004). U daljnjim koracima dolazi do transfera GPI-vezanog proteina u Golgijevo tijelo gdje sidro podliježe daljnjim modifikacijama. Postoji specifična regija unutar GPI proteina koji označavamo s ω te o njoj ovisi hoće li protein biti zadržan u plazmatskoj membrani ili će se transportirati do stanične stijenke (Hamada i sur., 1998; Yun i sur., 1997). Ukoliko ova regija sadrži dvije bazične aminokiseline (Frieman i Cormack, 2003; Hamada i sur., 1998), protein će uglavnom ostati u plazminoj membrani, no u slučaju da se bazične aminokiseline zamjene hidrofobnima proteinu je određena lokacija na staničnoj stijenci. Kako god, u nekim slučajevima iako protein sadrži bazične aminokiseline u ω sekvenci, protein se može naći na površini stanične stijenke zahvaljujući dugom nizu aminokiselina bogatom serinom i treoninom (Frieman i Cormack, 2004). Osim što određuje položaja u stanici, ω sekvenca dio je signalne sekvence koja služi za vezanje proteina na GPI sidro. Uz ω sekvencu, signalna sekvenca sastoji se od poteza od desetak polarnih aminokiselina koje služe kao fleksibilna povezujuća regija.

Zbog velike zastupljenosti GPI vezani proteini često su predmet istraživanja prilikom razvoja poboljšanih sustava za izlaganje proteina. Iako za većinu uloga nije potvrđena, pretpostavlja se da dio GPI vezanih proteina sudjeluju u procesima interakcije s okolnim stanicama. Prvi proces je aglutinacija što označava povezivanje stanica kvasca kao odgovor na prisustvo stanica suprotnog tipa te su najistaknutiji proteini skupine Aga (Roy i sur., 1991). Drugi proces uključuje flokulaciju, nakupljanje stanica nevezano uz spolno parenje, a najčešće se javlja kao odgovor na nedostatak nutrijenata u okolišu te su za njega odgovorni proteini flokulini (Flo) (Lozančić, 2021). Za ostatak proteina uloga je nepoznata ili je pripisana nekom složenom metaboličkom procesu do čije je promjene došlo delecijom gena koji kodiraju za određeni protein stanične stijenke. Nažalost, ova metoda pokazala se nepreciznom i sklonom pogreškama zbog mreže putova u stanici i međuovisnosti metaboličkih putova (Lozančić, 2021) Među proteine čija je uloga do sada nejasna ubrajamo sljedeće proteine: Cwp2, Ccw12, Ccw14, Cwp1, Dan1, Dan4, Ecm33, Pst1, Sed1, Spi1, Sps2, Sps22, Tip1 i Tir 1, Tir2, Tir 3 i Tir4 (Abramova i sur., 2001; Marguet i sur., 1998; Sertil i sur., 1997; Kowalski i sur., 1995). Od navedenih proteina u ovom radu fokus je na Cwp2 i Ccw12 GPI vezanim proteinima. Za sada je poznato da gen *CWP2* kodira za 180 kDa velik protein čija je ekspresija povećana u stresnim uvjetima, no smanjuje se u uvjetima anaerobnog rasta (Kapteyn i sur., 1996; Van Der Vaart i sur., 1995). Točna uloga proteina Cwp2 nije poznata, ali je pretpostavka da nema enzimsku aktivnost, već ima isključivo strukturnu ulogu. Također ni uloga proteina Ccw12 nije potpuno razjašnjena iako je prikupljeno dosta informacija o njegovoj građi i utjecaju na stanicu. Ccw12 je mali protein od svega 13 kDa, no na SDS elektroforezi putuje kao puno veći protein (otprilike 150 kDa) što je vjerojatno posljedica visokog stupnja glikozilacije (Mrša i sur., 1999). Ovaj protein nalazi se u izobilju u stanici budući da mu gen ima visoki indeks adaptacije kodona (Klis i sur., 2010). Uočeno je da delecija gena *CCW12* za protein Ccw12 uzrokuje preosjetljivost na CFW (en. *Calcofluor White*) i ostale stresne uvjete, pohranu hitina u stijenci, produljeno generacijsko vrijeme i manju efikasnost parenja (Narang i sur., 2008; Hagen i sur. 2004; Mrša i sur, 1999). Također omjer manoze i glukoze u stanicama *ccw12Δ* ostaje nepromijenjen, ali razine topljivosti u bazičnom mediju se povećavaju što ukazuje na promjene organizacije komponenti unutar stanične stijenke (Ragni i sur., 2007). Drugu skupinu kovalentno vezanih proteina stanične stijenke čine Pir proteini (en. *Proteins with Internal Repeats*). Ova vrsta proteina vezana je na β -1,3-glukan esterskom vezom koja se formira između γ -karboksilne grupe bočnog ogranka glutaminske kiseline nastale iz glutamata,

i hidroksilne skupine glukoze (Ecker i sur., 2006). Navedeni glutamat nalazi se unutar specifične ponavljajuće sekvence detektirane na *N*-terminalnom dijelu proteina. Ponavljajuća sekvenca po kojoj ova vrsta proteina nosi naziv sastoji se od slijeda Ser-Gln-Ile-Gly-Asp-Gly-**Gln-Ile-Gln-Ile-Gln**-Ala, a broj ponavljanja sekvence oscilira od dva do deset ponavljanja. Budući da je veza nestabilna u alkalnom mediju, najpraktičnije ih je izolirati postizanjem upravo alkalnih uvjeta ili djelovanjem β -1,3-glukanaze. Iako su Pir proteini izolirani i analizirani, njihova točna uloga nije poznata, ali je uočeno da je transkripcija *PIR2* značajno povišena pri uvjetima temperaturnog šoka i oksidativnog stresa (Russo i sur., 1993). Također, pri povećanoj ekspresiji Pir proteina povećana je otpornost stanice na kemikalije i toksine. Disrupcija svih proteina iz Pir skupine dovodi do produženja generacijskog vremena te je dokazano da mutanti rastu 30 % sporije od divljeg tipa. Morfološki gledano, mutirane stanice razlikuju se značajno od stanica divljeg tipa povećanim volumenom i nepravilnim oblikom. S druge strane, nije primijećena bitna razlika u količinskom sastavu glukoze, manana i *N*-acetilglukozamina u stijenki Pir mutanata u odnosu na stijenke stanice divljeg tipa (Mrša i sur., 1999). Pir2 protein najzastupljeniji je iz skupine Pir proteina te čini 16 % kovalentno vezanih proteina (Kapteyn i sur., 1999). Veličine je 180-220 kDa i sadrži sekvencu gena koja kodira za 413 aminokiselina. Sekvenca gena koja kodira za 413 aminokiselina proteina Pir2 gotovo je identična genetskom kodu proteina Hps150, no prethodno je smatrano da Pir2 i Hps150 možda nisu isti proteini, ali danas se ta dva naziva koriste kao alternativni nazivi istog gena/proteina uz dodatne nazive *CCW7* i *ORE1* (Mrša i sur., 1997; Yun i sur., 1997). Budući da je Hsp150/Pir2 opisan kao „heat shock“ protein možemo sa sigurnošću reći da Pir proteini imaju ulogu u odgovoru na stresne uvjete.

2.4. SUSTAV IZLAGANJA PROTEINA

Stanična stijenka kvasca izrazito je korisna za biotehnološke svrhe te se koristi kao nosač imobiliziranih proteina. U novije vrijeme sve se češće koristi u industriji razvoja „živih“ cjepiva te kao biosenzor za detekciju produkta reakcije koju provodi enzim izložen na površini stanice čija je ekspresija pod kontrolom promotora koji podliježe indukciji ili represiji analitom koji želimo detektirati (Park, 2020). Ova metoda omogućava nam izlaganje heterologno i homologno eksprimiranih proteina na površinu stanice uz kontinuiranu proizvodnju enzima sve dok je stanica metabolički aktivna. Također na ovaj način moguće je eksprimirati čitave enzimske sustave te se postiže lakše izdvajanje produkata i biokatalizatora biotehnološkog procesa, jednostavna produkcija te produljeno prisustvo biokatalizatora. Kako bi sustav funkcionirao za

nama bitne proteine mora imati četiri važne osobine, a to su: (1) osiguranje prolaska proteina kroz sekretorni put, (2) pravilno smatanje, (3) stabilnost rekombinantnog proteina i (4) čvrsta imobilizacija proteina u staničnu stijenku (Lozančić, 2021). Sustav izlaganja proteina na površinu stanične stijenke kao prvi korak uključuje fuziju gena koji kodira za protein od interesa s genom koji kodira za protein stanične stijenke koji se veže na glukan kovalentnim interakcijama (Cherf i Cochran, 2015). Imobilizaciju proteina na staničnu stijenku moguće je provesti vezanjem preko N- ili C-terminalnog kraja proteina, ali postoji i mogućnost vezanja proteina unutar sekvence gena za protein stanične stijenke. Način vezanja proteina unutar sekvence gena za protein stanične stijenke umanjuje mogućnost promjene konformacije važnih regija unutar proteina od interesa koje bi mogle dovesti do nedostatka njegove fiziološke uloge (Andrés i sur., 2005). Upravo zbog očuvanja efikasnosti imobilizacije, stabilnosti, posttranslacijskih modifikacija i aktivnosti važno je odabrati pravi način vezanja heterolognog proteina od interesa na staničnu stijenku. Do sada su poznati ovi mehanizmi: (1) nekovalentnim interakcijama, (2) kovalentno vezani na staničnu stijenku vezom nestabilnom u lužnatom i (3) kovalentnom vezom preko GPI (glikozilfosfatidilinozitolnog) sidra (Lozančić, 2021). Kada su u pitanju proteini kojima je aktivno mjesto bliže N-terminalnom dijelu, preporučuje se imobilizacija preko njihovog C-terminalnog kraja kako ne bi došlo do narušavanja aktivnosti i funkcije proteina od interesa. U tom slučaju uglavnom se preporučuje vezanje kovalentnom vezom preko GPI sidra budući da se protein od interesa svojim C-terminalnim krajem veže na GPI vezani protein. Najčešće korišteni proteini u tu svrhu su: α -aglutinin, α -aglutinin, Flo1, Cwp1, Cwp2, Ccw12, Spi1, Dan4, Tos6, Srp2, Tip1 i Sed1 (Lozančić, 2021). Aglutinini su uključeni u proces parenja pa se pretpostavlja da su smješteni na vanjskoj strani stanične stijenke (Lipke i Kurjan, 1992), što ih čini izrazito prikladnim za primjenu u procesu izlaganja. Prilikom korištenja α -aglutinina, protein od interesa veže se svojim C-terminalnim dijelom na N-terminalni dio α -aglutinina budući da je C-terminalni dio α -aglutinina potreban za vezanje na GPI sidro. Moguće je i direktno vezanje proteina od interesa na GPI sidro zahvaljujući signalnoj sekvenci na C-terminalnom dijelu. Sama signalna sekvenca građena je od niza od 10 polarnih aminokiselina, aminokiselinskog ostatka pomoću kojeg se protein veže na GPI sidro (najčešće glicinski, serinski, alaninski, asparaginski, aspartatni ili cisteinski aminokiselinski ostaci), dva aminokiselinska ostatka (uglavnom glicin, aspartat i/ili serin), regije od najmanje 3 do 10 umjereno polarnih aminokiselinskih ostataka te poteza hidrofobnih aminokiselina različite duljine (Udenfriend i Kodukula, 1995; Eisenhaber i Eisenhaber, 1998; Eisenhaber i sur., 2003; Eisenhaber i sur., 2004; de Groot i sur., 2007; Orlean i Menon, 2007).

Također često korišteni protein kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, a-aglutinin sastoji se od dvije podjedinice. Prva podjedinica, Aga1, vezana je pomoću GPI sidra na staničnu stijenk, dok je druga podjedinica, Aga2, vezana na prvu pomoću disulfidnih mostova. Upravo se s Aga2 podjedinicom fuzionira protein od interesa preko svog N ili C terminalnog dijela. Budući da je Aga2 vezana na Aga1 disulfidnim mostovima nije potrebna specifična konformacija njihovih terminalnih regija kako bi se navedena veza uspostavila. Kada je u pitanju protein flokulin, Flo1, on sadrži regiju s varijabilnim brojem ponavljanja na svom N-terminalnom kraju, a koja su zaslužna za uspostavljanje veze s ugljikohidratima. S druge strane na svom C-terminalnom kraju vezan je na GPI sidro te se prilikom imobilizacije proteina od interesa vrši fuzija C-terminalnog kraja proteina od interesa i N-terminalnog kraja Flo1. S obzirom da GPI vezani proteini nisu pogodni za fuziju proteina kojima je aktivna grupa bliža C-terminalnom kraju, u tom slučaju preporuka je fuzionirati proteine od interesa s Pir proteinima (Mrša i sur., 1997). Kao što je ranije spomenuto, proteine karakteriziraju ponavljajuće sekvence duljine dvanaest aminokiselina koje omogućuju sidrenje u staničnoj stijenci i koje se nalaze bliže njihovim N-terminalnim krajevima. Ipak u literaturi postoje i podaci kako se Pir proteini mogu vezati u staničnu stijenk i svojim C-terminalnim krajem za što su zaslužni cisteinski ostaci koji se u njemu nalaze te se pretpostavlja da sudjeluju u formiranju disulfidnih mostova kojima se Pir proteini mogu vezati čak i kada ponavljajuće sekvence nisu prisutne (Castillo i sur., 2003). Prilikom korištenja Pir sustava za izlaganje, protein od interesa se imobilizira preko svog N-terminalnog kraja. Protein od interesa veže se na način da se konstrukt sastoji od redom signalne sekvence fuzionirane na N-terminalnom kraju proteina od interesa nakon čega slijedi Pir protein koji ne sadrži signalnu sekvencu ni pro-regiju (Tanaka i sur., 2012). Također je moguće korištenje nativnih Pir proteina s postojećom signalnom sekvencom i pro-regijom. Drugi, rjeđe korišteni način podrazumijeva fuziju gena od interesa unutar gena koji kodira za Pir protein pomoću tri postojeća restrikcijska mjesta u Pir4 proteinu (Andrés i sur., 2005). Iako su se kvasci pokazali kao najbolji sustavi za izlaganje proteina na površinu stanice, u usporedbi s bakterijama, sustav ima još mnogo nedostataka kao što su ograničeni kapacitet stanice za izlaganje proteina te posttranslacijske modifikacije proteina (*O*- i *N*-glikozilacija (Park, 2020). Upravo iz tog razloga potrebno je istraživati nove moguće sustave i raditi na rješenju problema u postojećima.

2.4.1. Enzim β -laktamaza

Za potrebe ispitivanja efikasnosti sustava izlaganja proteina na površinu kvasca prethodno su razvijena dva sustava u kojima se nalazi enzim β -laktamaza te se izlaže na površinu kvasca korištenjem Pir ili Ccw12 proteina za imobilizaciju. Enzim β -laktamaza izoliran je iz stanica bakterije *E. coli* te katalizira reakciju razgradnje nitrocefina do cefalosporinske kiseline. Poznato je preko 190 tipova enzima β -laktamaze podijeljenih u četiri razreda, A, B, C i D, a korišteni enzim pripada C razredu. Pripadnost razredu enzima određuje se na temelju primarne sličnosti sekvenci i katalitičkih mehanizama. Razredi A, C i D koriste serin aktivnog mjesta u svojim mehanizmima djelovanja, dok B skupina zahtjeva ketone dvovalentnih metala, najčešće cinka, kako bi provela reakciju (Oteo i sur., 2010). Budući da korišteni enzim pripada skupini C pobliže ćemo objasniti mehanizam djelovanja ove skupine. Hidroksilna skupina enzima nalazi se na bočnom lancu aktivnog mjesta serina potrebnog za provođenje reakcije. Prva faza reakcije je reverzibilno nekovalentno vezanje laktamaze i laktamskog prstena; zatim ruptura laktamskog prstena koji postaje kovalentno vezan na serin aktivnog mjesta te kao zadnji korak hidroliza enzima za reaktivaciju laktamaze i oslobađanje inaktivne molekule (Livermore, 1998). Sam enzim β -laktamaza kodiran je genom *bla* koji je sastavljen od 286 aminokiselina te je prosječne veličine 25-30 kDa (Hyeon-Myong Eun, 1996). U *CCW12bla* konstrukt gen *bla* fuzioniran je s dijelom gena *CCW12* koji kodira za dvije signalne sekvence (signalna sekvenca na N- terminalnom kraju upućuje rekombinantni protein u sekretorni put te signalna sekvenca na C-terminalnom kraju koja je zaslužna za vezanje rekombinantnog proteina na GPI-sidro), dok je u *PIR2bla* konstrukt fuzioniran direktno s genom *PIR2* tako da je N-terminalni kraj β -laktamaze u navedenom konstrukt povezan s C-terminalnim krajem *PIR2*. Ekspresijom *PIR2bla* nastaje rekombinantni protein Pir2bla koji se kovalentno veže na staničnu stijenku. Oba spomenuta sustava eksprimirana su u stanicama u kojima nedostaje ili Cwp2 ili 4 Pir proteina te Scw4 kako bi se ispitala mogućnost povećanja kapaciteta stijenke za ugradnju heterolognih proteina nakon uklanjanja vrlo zastupljenih, kovalentno vezanih nativnih proteina stijenke.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Nitrocefin - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Agar – Biolife (Milano, Italija)
- Aminokiseline uracil, leucin i histidin – ACROS Organics (Antwerpen, Belgija)
- Kalij dihidrogen fosfat, kalijev hidrogen fosfat – Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev klorid -Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Asparagin – ACROS Organics (Antwerpen, Belgija)
- Magnezijev sulfat heptahidrat – Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
- Natrijev klorid – Gram mol (Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid dihidrat – Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Natijev citrat – T.T.T. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Borna kiselina – Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Bakrov sulfat pentahidrat – Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Kalijev jodid – Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Cinkov sulfat heptahidrat – Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- P-aminobenzojeva kiselina – Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Biotin – Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Ca-pantotenat – Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Niacin – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Folna kiselina – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Glukoza – ACROS Organics (Antwerpen, Belgija)

3.1.2. Uredaji

- Vortex MX-S – dLab (New York, USA)
- Pipetman (0,5-1000 μ L) – Sartorius (Göttingen, Njemačka)
- Centrifuga – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- Termoblok – Biosan (Riga, Latvija)
- Spektrofotometar – Thermo Electron Corporation (Waltham, Massachusetts, USA)

- Spektrometar – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- Tresilica – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)

3.1.3. Korišteni sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Tablica 1. Genotip kvasaca korištenih u ovom radu

Soj	Genotip
wt BY4741 + pRSII423 <i>CCW12bla</i>	MAT a; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0
BY4741 <i>cwp2Δ</i> + pRSII423 <i>CCW12bla</i>	MAT a; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0 <i>cwp2Δ</i>
wt BY4741 + pRSII423 <i>PIR2bla</i>	MAT a; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0
BY4741 <i>cwp2Δ</i> + pRSII423 <i>PIR2bla</i>	MAT a; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0 <i>cwp2Δ</i>
wt BY4741 + pRSII423 <i>PIR2</i>	MAT a; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0
BY4741 <i>cwp2Δ</i> + pRSII423 <i>PIR2</i>	MAT a; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0 <i>cwp2Δ</i>
wt BY4741 + pRSII423 <i>CCW12</i>	MAT a; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0
wt BY4741 <i>cwp2Δ</i> + pRSII423 <i>CCW12</i>	MAT a; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0 <i>cwp2Δ</i>
wt SEY6210 + pRSII423 <i>PIR2 bla</i>	MAT α; leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL
SEY6210 <i>4pirΔscw4Δ</i> + pRSII423 <i>PIR2bla</i>	MAT α; leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL <i>pir1Δ</i> <i>pir2Δ pir3Δ pir4Δ scw4Δ</i> ;
wt SEY6210 + pRSII423 <i>CCW12bla</i>	MAT α; leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 suc2-Δ9 lys2-01; GAL
SEY6210 <i>4pirΔscw4Δ</i> + pRSII423 <i>CCW12bla</i>	MAT α; leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL <i>pir1Δ</i> <i>pir2Δ pir3Δ pir4Δ scw4Δ</i> ;
wt SEY6210 + pRSII423 <i>PIR2</i>	MAT α; leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL
SEY6210 <i>4pirΔscw4Δ</i> + pRSII423 <i>PIR2</i>	MAT α; leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL <i>pir1Δ</i> <i>pir2Δ pir3Δ pir4Δ scw4Δ</i> ;
wt SEY6210 + pRSII423 <i>CCW12</i>	MAT α; leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL
SEY6210 <i>4pirΔscw4Δ</i> + pRSII423 <i>CCW12</i>	MAT α; leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL <i>pir1Δ</i> <i>pir2Δ pir3Δ pir4Δ scw4Δ</i>

3.1.4. Otopine i puferi

a) Hranjiva podloga za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (YNBP his-)

Prema navedenoj tablici (Tablica 2) pripremimo i izvažemo sastojke potrebne za hranjivu podlogu te potom otopimo u deioniziranoj vodi. Tako pripremljenu hranjivu podlogu potrebno je sterilizirati u autoklavu pri uvjetima od 121 °C i 1 atm 20 u trajanju od 20 minuta. Hranjivu podlogu potrebno je ohladiti prije korištenja te neposredno prije naciepljivanja kvasca dodati glukozu u omjeru takvom da konačna koncentracija iznosi 2 %.

Tablica 2. Sastav hranjive podloge

YNBP podloga		Koncentracija
Kvaščeve dušične baze bez aminokiselina		6,7 g L ⁻¹
glukoza		20 g L ⁻¹
„drop out“		1,6 g L ⁻¹
agar		15 g L ⁻¹
Aminokiseline	Uracil	2 g L ⁻¹
	Leucin	15 g L ⁻¹
	Triptofan	5 g L ⁻¹

b) Hranjiva podloga za indukciju *PHO5* promotora

Sastojci sintetske hranjive podloge bez fosfata navedeni su u tablici 3. Sastojke krutog agregatnog stanja potrebno je izvagati i dodati u 480 mL deionizirane vode. Nakon otapanja krutih sastojaka potrebno dodati 1 mL 500 puta koncentrirane otopine elemenata u tragovima (tablica 4) te podesiti pH uz korištenje pH elektrode na vrijednost 5,5 dodatkom koncentrirane otopine HCl-a. Potom je potrebno otopinu sterilizirati u autoklavu pod uvjetima od 121 °C i 1 atm 20 minuta. Neposredno nakon sterilizacije u hranjivu podlogu dodaje se 2 mL sterilne 250 puta koncentrirane otopine riboflavina (tablica 5) i 0,5 mL 1000 puta koncentrirane otopine biotina (tablica 6).

Tablica 3. Sastav Wickerhamove sintetske minimalne podloge bez fosfata i histidina (500 mL)

Wickerhamova sintetska minimalna podloga (P ⁻)	Koncentracija
KCl	0,5 g L ⁻¹
Asparagin	1 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g L ⁻¹
NaCl	0,05 g L ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05 g L ⁻¹
Na-citrat	2,941 g L ⁻¹

Drop out	1 g L ⁻¹
Elementi u tragovima 500X	1 mL
Riboflavin 250X	2 mL
Biotin 1000X	0,5 mL
Uracil	0,04 g
Leucin	0,08 g
Triptofan	0,04 g

Tablica 4. Sastav 500 puta koncentrirane otopine elemenata u tragovima

„Elementi u tragovima“ 500X, 200 mL	Koncentracija (g L⁻¹)
4 mM borna kiselina	2,5
0,08 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2
0,3 mM KJ	0,5
0,4 mM FeCl ₃ ·6H ₂ O	1
0,7 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
0,08 mM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1
0,7 mM ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2

Tablica 5. Sastav 250 puta koncentrirane otopine riboflavina

Riboflavin 250X	Koncentracija (g L⁻¹)
0,13 mM riboflavin	0,5
0,3 mM p-aminobenzojeva kiselina	0,5
2,8 mM inozitol	5

Tablica 6. Sastav 1000 puta koncentrirane otopine biotina

Biotin 1000X	Koncentracija (g L⁻¹)
0,08 mM biotin	0,2
8 mM Ca-pantotenat	40
32,5 mM niacin (nikotinska kiselina)	40
20 mM piridoksal-HCl	40
Tiamin-HCl	40
Folna kiselina	0,2

Tablica 7. Sastav „drop out“ mješavine

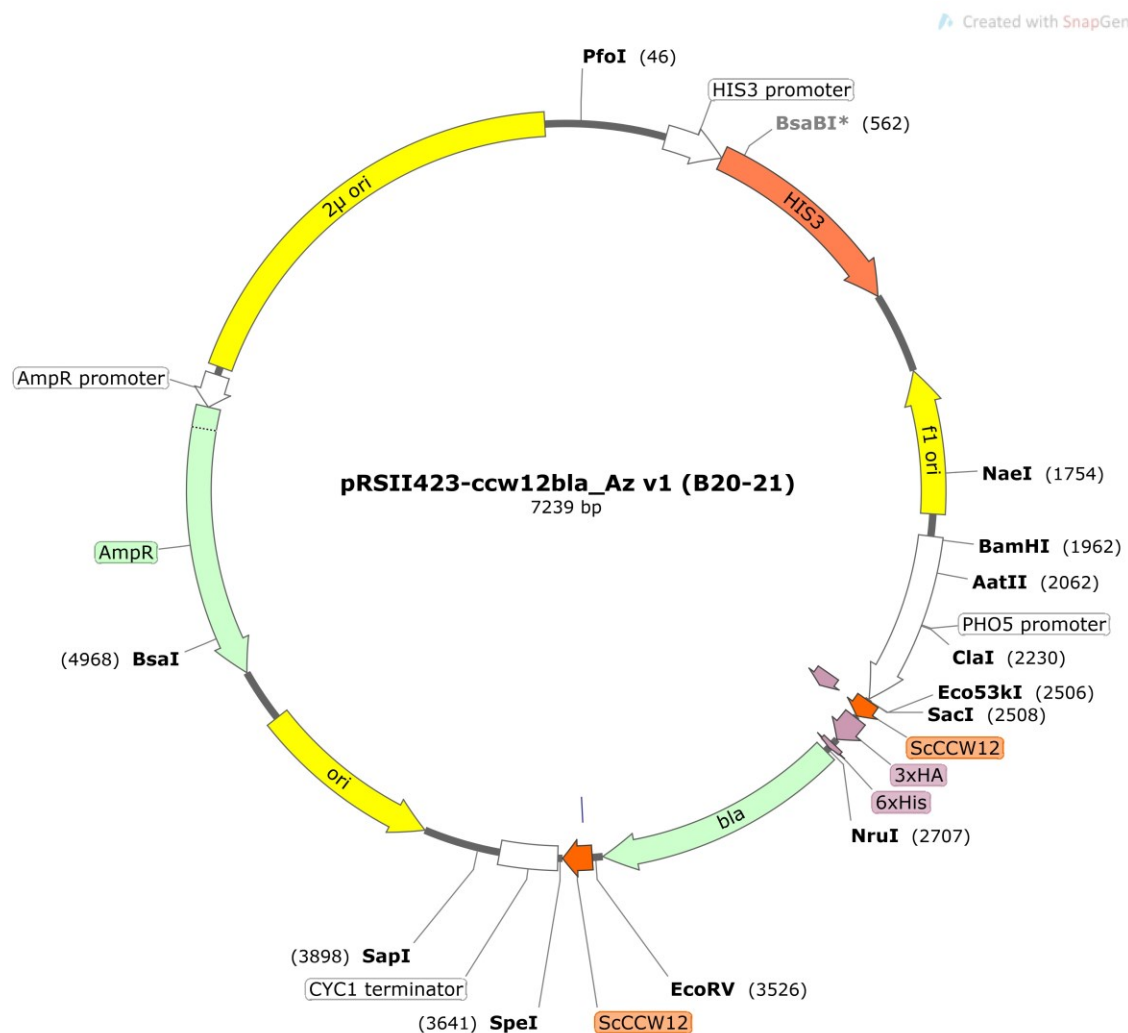
„Drop out“ mješavina	Masa (g)
adenin	3,0
L-arginin	2,0
L-asparagin	2,0
L-asparaginska kis.	6,0
L-cistein	2,0
L-glutamin	2,0
L-glutaminska kis.	2,0
L-glicin	2,0

L-izoleucin	2,0
L-metionin	2,0
L-fenilalanin	2,0
L-prolin	2,0
L-serin	6,0
L-treonin	2,0
L-tirozin	2,0
L-valin	2,0
p-aminobenzojeva kis.	0,2
Inozitol	2,0

3.1.5. Plazmidi

a) Plazmid pRSII423 *CCW12bla*

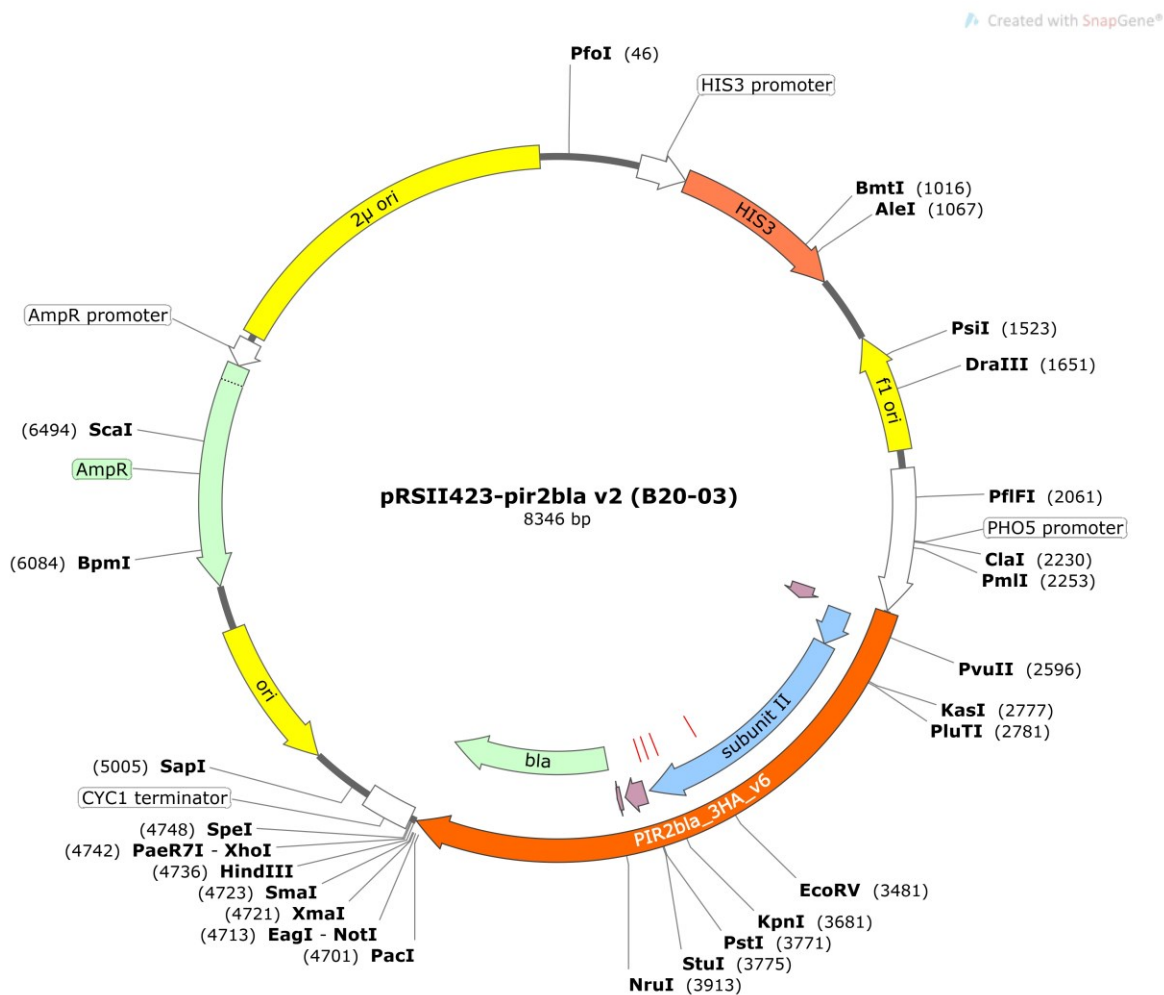
Plazmid pRSII423 *CCW12bla* (slika 1.) sadrži gen *bla* fuzioniran s dijelom gena *CCW12* koji kodira za dvije signalne sekvence. Signalna sekvenca na N- terminalnom kraju upućuje rekombinantni protein u sekretorni put te signalna sekvenca na C-terminalnom kraju koja je zaslužna za vezanje rekombinantnog proteina na GPI-sidro. Između signalne sekvence zaslužne za upućivanje rekombinantnog proteina u sekretorni put i gena *bla* nalaze se his-oznake i hemaglutininske oznake. Upravo hemaglutininska oznaka od velike je važnosti jer nam omogućuje vizualizaciju proteina pomoću anti-HA antitijela općenito ili tijekom vizualizacije metodom imunoblot te olakšava pročišćavanje proteina iz smjese. Plazmid je konstruiran PCR metodom te je za umnožavanje korištena bakterija *E. coli*. Gen *CCW12bla* pod kontrolom je promotora *PHO5*, koji inducira ekspresiju gena u uvjetima uzgoja bez fosfata. Plazmid obuhvaća dva selektivna markera koja omogućuju selekciju transformiranih stanica od kojih je jedan potreban za bakterijske stanice, a drugi služi za selekciju stanica kvasca. Pripadajući gen *bla* kodira za β -laktamazu koja omogućuje ekspresiju gena u bakterijskim stanicama te je selektivni marker koji omogućava rast stanica na podlogama koje sadrže antibiotik ampicilin (Amp^R). S druge strane, selektivni je marker za kvaščeve stanice gen *HIS3* koji omogućuje rast stanicama na podlozi koje ne sadrže histidin.



Slika 1. Plazmid pRSII423 *CCW12bla* (kreirano pomoću programa SnapGene)

b) Plazmid pRSII423 *PIR2bla*

Na slici 2. prikazan je plazmid pRSII423 *PIR2bla* koji sadrži gen *bla* fuzioniran s genom *PIR2* preko njegovog N-terminalnog kraja. Ekspresijom gena *PIR2bla* nastaje rekombinantni protein koji se kovalentno veže na staničnu stijenku kvasca svojim N-terminalnim krajem. Plazmid je konstruiran PCR metodom, a zatim je umnožen stanicama bakterije *E. coli*. Također, na plazmidu se nalaze selektivni markeri (za stanice kvasca i bakterijske stanice) koji omogućuju selekciju transformiranih stanica. Ekspresija strukturnih gena je pod kontrolom *PHO5* promotora koji se inducira u uvjetima bez fosfata.



Slika 2. Plazmid pRSII423 *PIR2bla* (kreirano pomoću programa SnapGene)

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj transformiranih stanica kvasca

Za eksperiment korištene su transformirane stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koje su nacičepšene u selektivni YNBP his⁻ medij uz glukozu kao izvor ugljika (ukupnog udjela 2 %) te povećanu količinu fosfata u odnosu na standardni YNB medij. Budući da hranjiva podloga ne sadrži histidin, moguć je rast isključivo transformiranih stanica kvasca. Stanice su uzgajane prekonočno pri temperaturi od 30 °C do kasne eksponencijalne faze rasta. Nakon prekonočnog uzgoja određujemo broj stanica mjerenjem optičke gustoće pomoću spektrofotometra. Ukoliko je izmjerena apsorbancija otprilike 7 OD₆₀₀ mL⁻¹ pretpostavlja se da je stanica zaista u stacionarnoj fazi te slijedi razrjeđivanje na gustoću 0,5 OD₆₀₀ mL⁻¹ kako bi se ponovo pokrenuo rast i dioba stanica.

3.2.2. **Određivanje broja stanica mjerenjem optičke gustoće**

Broj stanica kvasca moguće je odrediti mjerenjem optičke gustoće suspenzije stanica pri 600 nm. Pri tome se suspenzija stanica razrijedi 10 puta i njena gustoća izmjeri se uporabom spektrofotometra. Dobivenu vrijednost apsorbancije potrebno je pomnožiti s razrjeđenjem otopine i time se dobiva broj OD jedinica. U slučaju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 1 OD izmjeren pri 600 nm predstavlja 10^7 stanica mL^{-1} suspenzije.

3.2.3. **Uzgoj kvasaca za indukciju gena pod regulacijom *PHO5* promotora**

Kvašćev promotor *PHO5* jak je inducibilni promotor čija je indukcija ovisna o unutarstaničnoj koncentraciji fosfata. Stanice se prethodno uzgoje u podlozi s visokom koncentracijom fosfata (YNBP his-) do logaritamske faze rasta, a potom se prebacuju u uvjete indukcije *PHO5* promotor pod čijom se kontrolom nalaze konstrukti. Uzgoj u uvjetima indukcije provodi se kroz 2 do 3 generacije kako bi došlo po potrošnje unutarstaničnih zaliha fosfata i indukcije transkripcije s promotora. Ovi koraci provode se na način da nakon što se postigne logaritamske faze rasta u podlozi bogatoj fosfatom, odnosno dok im OD₆₀₀ vrijednost ne postigne približno 2, određeni volumen suspenzije stanica potrebno prebaciti u podlogu bez fosfata kako bi koncentracija stanica bila 0,3 OD₆₀₀ mL^{-1} . Preneseni volumen potrebno je centrifugirati 5 minuta na 3000 rpm te talog stanica dva puta isprati sterilnom deioniziranom vodom kako bi se uklonio zaostali fosfat. Nakon ispiranja talog stanica potrebno je resuspendirati u 10 mL sintetske podloge bez fosfata i inkubirati kulturu prekonoćno na tresilici pri temperaturi od 30°C.

3.2.4. **Određivanje aktivnosti β -laktamaze na površini stanica kvasca**

Kao supstrat za enzim β -laktamazu korištena je 0,1 mM otopina nitrocefina. Nitrocefina je antibiotik koji apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 217 nm dok svojom razgradnjom u reakciji koju katalizira enzim β -laktamaza nastaje produkt koji apsorbira svjetlost pri valnoj duljini od 482 nm. Moguće su dva načina praćenja tijeka reakcije, mjerenje apsorbancije nitrocefina ili mjerenje apsorbancije produkta reakcije. U ovom slučaju spektrofotometrijski je mjerena apsorbancija nastalog produkta pri 482 nm. Stanice uzgojene prema poglavlju 4.4. centrifugiranjem su odvojene od hranjive podloge. Hranjivu podlogu spremamo na +4 °C te u njoj također mjerimo aktivnost. Talog odvojen od podloge potrebno je isprati u sterilnoj vodi, centrifugirati i odbaciti supernatant.

Dodatno ispiranje vrši se upotrebnom 100 mM K-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7. Nakon drugog ispiranja, odbacuje se supernatant te se stanice resuspendiraju u istom puferu kako bi se postigla konačna koncentraciju od $100 \text{ OD}_{600} \text{ mL}^{-1}$. Potom ponovo izmjerimo $\text{OD}_{600} \text{ mL}^{-1}$ sa svrhom provjere preciznosti radi kasnijeg računa. Mjerenje je provedeno s $5 \text{ }\mu\text{L}$ suspenzije kvasca i $795 \text{ }\mu\text{L}$ destilirane vode, odnosno sa 160 puta razrijeđenom suspenzijom kvasca. Nakon toga je iz originalne suspenzije kvasca ($100 \text{ OD}_{600} \text{ mL}^{-1}$) pripremljeno prvo decimalno razrijeđenje tako da je na $10 \text{ }\mu\text{L}$ originalne suspenzije dodano $90 \text{ }\mu\text{L}$ K-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7. Mjerenje aktivnosti provedeno je u 3 paralele u kojima je po $7,5 \text{ }\mu\text{L}$ razrijeđene suspenzije kvasca pomiješano sa $467,5 \text{ }\mu\text{L}$ spomenutog pufera. Slijepa proba pripremljena je korištenjem $475 \text{ }\mu\text{L}$ K-fosfatnog pufera pH 7 te $25 \text{ }\mu\text{L}$ otopine nitrocefina. Reakcija se provodi pri 30°C i uz miješanje pri brzini od 8000 rpm. Prvi korak u protokolu mjerenja aktivnosti je predinkubacija uzoraka stanica i slijepe probe na termobloku dvije minute kako bi se postigla stabilna temperatura reakcijske smjese. Nakon dvije minute dodano je $25 \text{ }\mu\text{L}$ supstrata te je reakcija trajala 5 minuta pri prethodno navedenim uvjetima. Potom je uzorke potrebno centrifugirati na 8000 o min^{-1} 30 sekundi kako bi se prekinula reakcija uklanjanjem stanica s imobiliziranim enzimom iz reakcijske smjese. Nakon prekida reakcije odvajamo supernatant i u njemu spektrofotometrijski mjerimo apsorbanciju produkta reakcije pri 482 nm.

3.2.5. **Određivanje aktivnosti β -laktamaze u hranjivim podlogama**

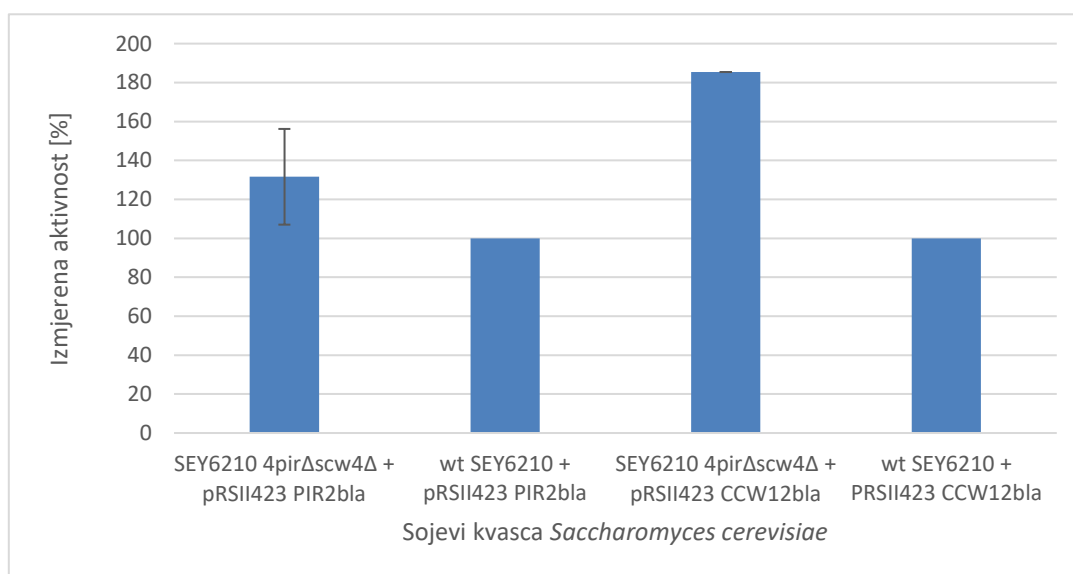
Mjerenje aktivnosti provodi se i u hranjivim podlogama koje su centrifugiranjem odvojene od stanica i pohranjene na $+4^{\circ}\text{C}$. Mjerenja se također provode u 3 paralele u omjeru $220 \text{ }\mu\text{L}$ hranjive podloge i $255 \text{ }\mu\text{L}$ K-fosfatnog pufera pH 7. Postupak mjerenja jednak je mjerenju aktivnosti na površini stanica kvasca, osim što uzorke hranjive podloge nije potrebno centrifugirati već se direktno po završetku reakcije mjeri apsorbancija pomoću spektrofotometra.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Proteklih nekoliko godina sve se više razvija tehnika imobilizacije heterolognih i homolognih proteina na staničnoj stijenci kvasca. Izlaganje proteina na površini stanice poznato je i pod engleskim nazivom „*surface display*“ te se uvelike primjenjuje u biotehnološkim procesima, imunološkim studijama s ekspresijom antitijela ili antigena na staničnoj površini te u studijama karakteristika pojedinih proteina i protein-protein interakcija s izlaganjem čitavih knjižnica generiranih proteina na staničnim površinama (Cherf i Cochran, 2015). Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* pokazao se pogodnim modelnim sustavom s obzirom da posjeduje mehanizme smatanja proteina, posttranslacijskih modifikacija i sekretorni put sličan višim eukariotima. Ove karakteristike omogućuju nam promatranje utjecaja navedenih procesa na strukturu i funkciju proteina te smanjuje mogućnost zauzimanja nepravilne konformacije enzima koja bi mogla dovesti do gubitka fiziološke aktivnosti. Stanična stijenka kvasca osim što ima važan biotehnološki značaj od izrazitog je značaja za osmotsku stabilnost stanice, održavanje oblika i čvrstoće, zaštitu od stresora u neposrednoj blizini stanice te komunikaciju i interakciju sa okolinom. Građena je od dva sloja od kojih je unutarnji sloj građen je od polisaharida, β -1,3-glukana, β -1,6-glukana i hitina dok je vanjski sloj sastavljen od proteina glikoziliranih mananom. Sami proteini mogu se podijeliti u tri skupine prema načinu ugradnje u staničnu stijenkku. Prvu i količinski najveću skupinu čine Scw (en. *Soluble Cell Wall Proteins*) proteini koji su na staničnu stijenkku vezani nekovalentnim interakcijama. Sljedeću grupu čine Pir proteini koji su kovalentno vezani vezom nestabilnom u lužnatim uvjetima na β -1,3-glukan preko glutaminskih ostataka koji se nalaze unutar specifičnih ponavljajućih sekvenca detektiranih na N-terminalnom dijelu proteina. Posljednju skupinu čine proteini vezani pomoću GPI sidra koji se vežu na β -1,6-glukan također kovalentnim vezama te su najzastupljeniji kovalentno vezani proteini u kvascu. Kao prvi korak izlaganja proteina na površinu stanične stijenke podrazumijeva se fuzija gena koji kodira za protein od interesa s genom koji kodira za protein stanične stijenke koji se na glukan veže kovalentnim interakcijama. Izlaganje i ugradnja proteina u staničnu stijenkku omogućava njihovu stabilizaciju, lako izdvajanje i razdvajanje produkta i biokatalizatora u biotehnološkom procesu te relativno jednostavno obnavljanje biokatalizatora potrebnih za provođenje biotehnološkog procesa. Iako je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* naveden kao najkompatibilniji sustav za površinsko izlaganje proteina postoje prepreke kao što su potencijalna hiperglikozilacija te ograničen kapacitet vezanja rekombinantnih proteina na površinu stanične stijenke pa je potrebno istražiti nove

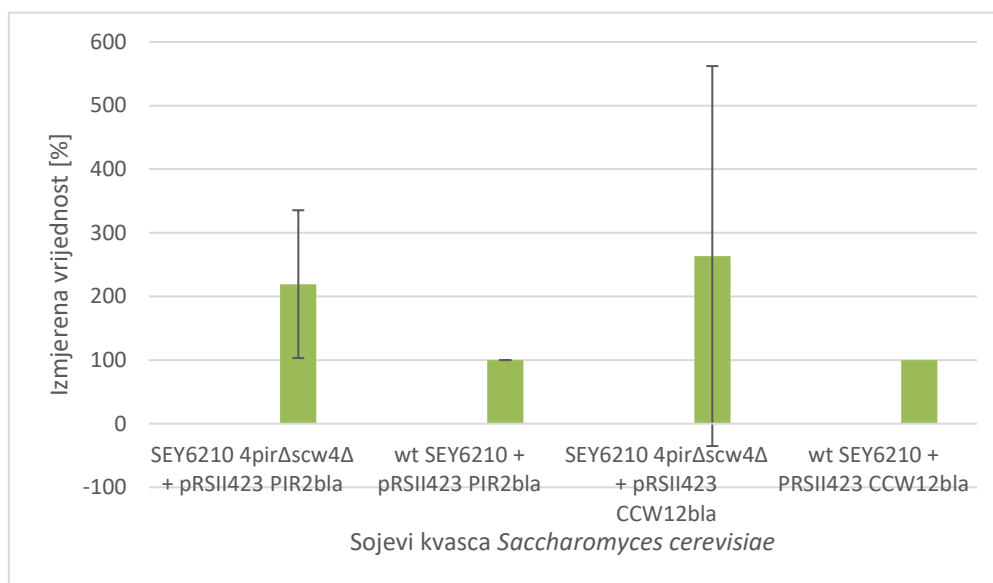
potencijalne sustave ili mogućnosti unaprjeđenja postojećih. Problem koji želimo adresirati u ovom radu ograničeni je kapacitet stanične stijenke kvasca za izlaganje proteina. Postoji više načina na koji se može pokušati prevladati ovaj problem, no mi smo odlučili pokušati smanjiti količinu nativnih proteina stijenke te provjeriti utječemo li na taj način na povećanje kapaciteta stijenke. To smo ispitivali korištenjem sustava za izlaganje β -laktamaze na površini stanice pomoću Pir i Ccw12 proteina. U tu svrhu korišteni su konstrukti u kojima su nativni gen *PIR2*, odnosno dio gena *CCW12* fuzionirani sa genom *bla*. Gen *bla* fuzioniran je s dijelom gena *CCW12* koji kodira za dvije signalne sekvence. Prva signalna sekvenca na N-terminalnom kraju upućuje rekombinantni protein u sekretorni put dok druga signalna sekvenca na C-terminalnom kraju služi za vezanje rekombinantnog proteina na GPI-sidro. Plazmidi koji sadrže samo *PIR2* ili dio gena *CCW12* su korišteni kao negativna kontrola kako bismo eliminirali pozadinsku aktivnost intracelularne β -laktamaze kodirane genom *bla* na okosnici plazmida koji služi kao selektivni biljeg prilikom transformacije bakterijskih stanica plazmidom. Stanice kvasca divljeg tipa, SEY6210 i BY4741, kao i stanice mutanata *44pir Δ scw4* i *Δ cwp2* transformirane su plazmidima i naciyepljene na YNB podlogu bez histidina kako bi uzgojili isključivo transformirane stanice. Kako bi eksprimirali rekombinantni protein potrebno je tijekom uzgoja stanica inducirati promotor *PHO5* pod čijom je regulacijom. Indukcija promotora *PHO5* ovisi o unutarstaničnoj koncentraciji fosfata stoga su prethodno uzgojene stanice izdvojene iz podloge višestrukim ispiranjem i centrifugiranjem te naciyepljene u minimalnu hranjivu podlogu bez fosfata. Stanice su uzgajane prekononočno kako bi se postigli uvjeti indukcije promotora. Uzgojene stanice i pripadajuće hranjive podloge podvrgnute su mjerenju aktivnosti u odgovarajućim reakcijskim smjesama opisanim u poglavlju „Materijali i metode“. Kao supstrat za mjerenje enzimske aktivnosti korišten je antibiotik nitrocefín koji se u reakciji kataliziranoj β -laktamazom razgrađuje do cefalosporinske kiseline. Kako bi se pratio tijek reakcije moguće je mjeriti apsorbanciju nitrocefina pri 217 nm ili apsorbanciju cefalosporinske kiseline pri 482 nm. U ovom radu mjerena je apsorbancija nastalog produkta pri 482 nm. Prije početka mjerenja aktivnosti potrebno je predinkubirati uzorke i slijepu probu na termobloku i tek nakon što se postigne potrebna temperatura od 30 °C dodati supstrat. Reakcija se provodi 5 minuta nakon čega se prekida centrifugom pri 8000 o min⁻¹ u trajanju od 30 sekundi. Po prekidu reakcije odvajamo supernatant u kojem spektrofotometrijski mjerimo apsorbanciju produkta. Na slici 3. prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti Pir2bla i Ccw12bla u mutantu *4pir Δ scw4 Δ* uspoređeni s aktivnošću istih konstrukata izloženih na stanicama divljeg tipa. U navedenom mutantu

uklonjeni su svi Pir proteini čija je prisutnost u stijenci prethodno pokazana te protein Scw4. Protein Scw4 uz činjenicu da je vrlo zastupljen u stijenci kao nekovalentno vezan, u stijenci može postojati i u kovalentno vezanom obliku, s tim da je tip veze koju ostvaruje sa stijenkom nalik vezi koju ostvaruju Pir proteini te je iz tog razloga uklonjen iz stijenske. S obzirom da su uklonjeni Pir proteini te Pir nalik protein Scw4, očekivano je povećanje aktivnosti Pir2bla i Ccw12bla ukoliko smo uklanjanjem navedenih nativnih proteina uspjeli povećati kapacitet stijenske za vezanje željenih konstrukata. Dobiveni rezultati pokazuju povećanje aktivnosti. Aktivnost Pir2bla je povećana za 31 % dok je aktivnost Ccw12bla veća čak 85 % na površini stanica mutanta od one izmjerene na stanicama divljeg tipa. Na temelju rezultata možemo zaključiti da smo uklanjanjem svih Pir proteina i proteina Scw4 uspjeli povećati mogućnost vezanja obaju konstrukta što se vidi prema povećanoj aktivnosti detektiranoj u stijenci tog soja u usporedbi s divljim tipom. Pomalo je iznenađujuće da smo dobili veću aktivnost *CCW12bla* konstrukta s obzirom da je početna pretpostavka bila kako bismo uklanjanjem nativnih Pir proteina mogli osloboditi mjesto za vezanje *PIR2bla* konstrukta. Iako bilježimo pojačanu aktivnost i Pir2bla konstrukta, mnogo je značajniji efekt koji smo dobili za *CCW12bla* konstrukt.



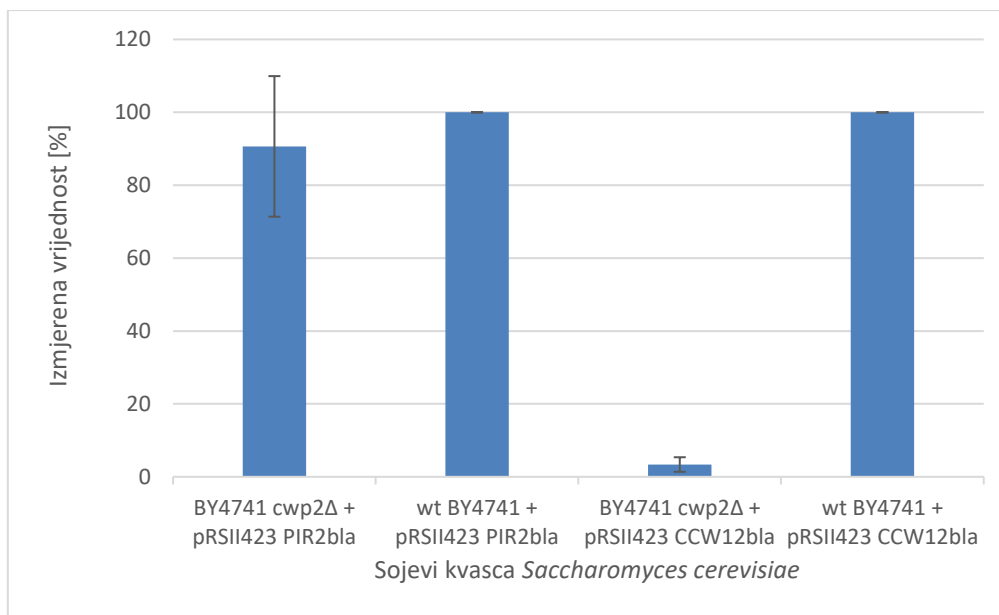
Slika 3. Grafički prikaz srednje vrijednosti aktivnosti transformiranih stanica u *4pirΔscw4Δ* mutantima i stanicama SEY6210 divljeg tipa. Aktivnost je mjerena i u pripadajućim hranjivim podlogama čije su vrijednosti prikazane na grafu na Slici 4. Također je zabilježena veća aktivnost, u slučaju Pir2bla 42 % te u slučaju Ccw12bla 26 % u podlogama u kojima su uzgajane stanice mutanta u odnosu na podloge u kojima su uzgajane stanice divljeg tipa. S obzirom da je zabilježena nešto značajnija aktivnost

Pir2bla proteina u podlogama stanica mutanata u odnosu na aktivnost istog proteina u podlogama stanica divljeg tipa, moguće je da dolazi do povećane sekrecije proteina u medij ili slabijeg vezanja uslijed čega dolazi do otpuštanja u medij



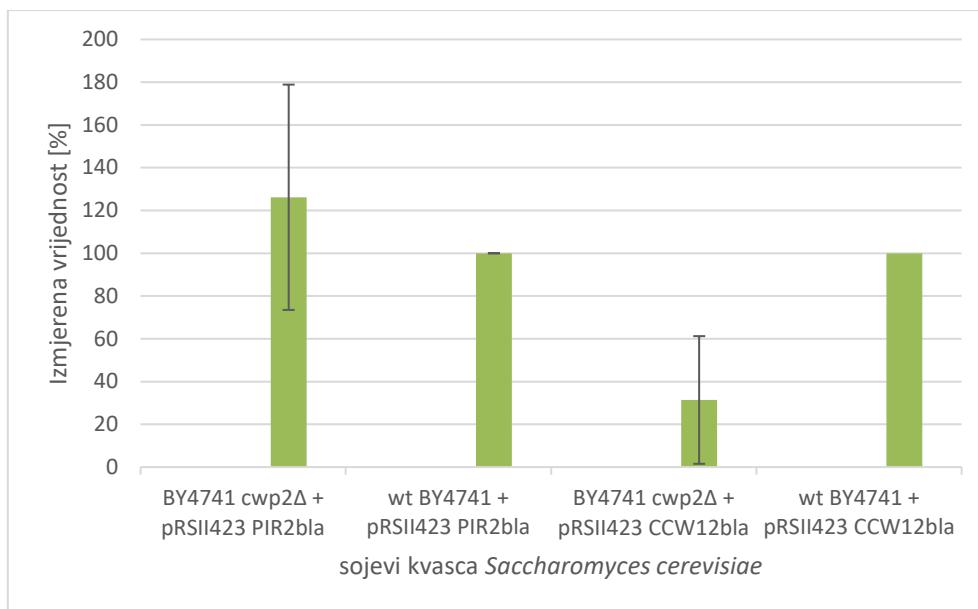
Slika 4. Grafički prikaz srednje vrijednosti aktivnosti pripadajućih hranjivih podloga transformiranih stanica u *4pirΔscw4Δ* mutantima i stanicama SEY6210 divljeg tipa

Sljedeći korak bilo je uklanjanje vrlo zastupljenog proteina iz druge skupine kovalentno vezanih proteina. Kao kandidat odabran je protein Cwp2, drugi najzastupljeniji GPI protein u staničnoj stijenci kvasca (Ghanegolmohammad i sur, 2021). Na slici 5. prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti Pir2bla i Ccw12bla u stanicama mutanata *cwp2Δ* u odnosu na stanice divljeg tipa.



Slika 5. Grafički prikaz srednje vrijednosti aktivnosti transformiranih stanica u *cwp2Δ* mutantima i stanicama BY4741 divljeg tipa

Dobiveni rezultati odstupaju od očekivanih. Aktivnost enzima Pir2bla eksprimirana u stanicama mutanta *cwp2Δ* manja je za 10 % od aktivnosti detektirane na stanicama divljeg tipa, dok je aktivnost u pripadajućoj hranjivoj podlozi veća za 26 % od aktivnosti u hranjivoj podlozi divljeg tipa (Slika 6.). Na temelju ovih rezultata možemo pretpostaviti da se heterologni protein ugradio u stijenku, no uslijed slabijeg vezanja vjerojatno dolazi do otpuštanja enzima u hranjivu podlogu. Također, uklanjanje Cwp2 proteina nije značajno utjecalo na mogućnost ugradnje Pir2bla proteina te se čini da njegovim uklanjanjem nije povećan kapacitet za vezanje Pir proteina. S druge strane rezultati aktivnosti Ccw12bla u *cwp2Δ* mutiranim stanicama zanemarivo su mali u odnosu na aktivnost istog proteina na stanicama divljeg tipa što upućuje na pretpostavku da se heterologni protein nije ni ugradio u staničnu stijenku ili se ugradila tek neznatna količina. U hranjivoj podlozi aktivnost Ccw12bla također je zanemariva u odnosu na aktivnost u podlogama divljeg tipa što također ukazuje na nedostatak heterolognog proteina (Slika 6.).



Slika 6. Grafički prikaz srednje vrijednosti aktivnosti pripadajućih hranjivih podloga transformiranih stanica u *cwp2Δ* mutantima i stanicama BY4741 divljeg tipa

Mogući razlog izostanka aktivnosti je problem u transportu proteina do stanične stijenke i njenoj ugradnji. Cwp2 jedan je od vrlo zastupljenih proteina stanične stijenke s ulogom u organizaciji stanične stijenke, ali i s potencijalnom ulogom u regulaciji transkripcije pojedinih gena (Li, J. i sur., 2020) stoga postoji mogućnost za sada nepoznatog efekta disrupcije *CWP2* gena na ekspresiju *CCW12bla* konstrukta. Kako bi bili sigurni je li heterologni protein prisutan potrebno je u nastavku istraživanja provesti imunoblot analizu proteinskih ekstrakata stanične stijenke analiziranih sojeva kvasca.

Kao najuspješniji pokazao se konstrukt *CCW12bla* eksprimiran u stanicama sa uklonjenim Pir i Scw4 proteinima koji pokazuje aktivnost od čak 185 % aktivnosti istog konstrukta eksprimiranog u stanicama divljeg tipa. S druge strane najlošije eksprimirani je *CCW12bla* konstrukt u stanicama sa deletiranim Cwp2 proteinima. Na osnovu prikupljenih podataka možemo zaključiti kako se u slučaju delecije kovalentno vezanih Pir proteina povećava efikasnost izlaganja heterolognih proteina na površinu stanične stijenke kvasca, no u slučaju delecije gena *CWP2* nailazimo na neočekivane rezultate pa je potrebno nastaviti istraživanje kako bi se sa sigurnošću mogli izvući zaključci.

5. ZAKLJUČCI

1. Uklanjanjem nativnih proteina stijenke kvasca iz skupine Pir proteina te proteina Scw4 moguće je povećati kapacitet stijenke za izlaganje konstrukta *PIR2bla* te *CCW12bla* na staničnoj površini
2. Uklanjanje Cwp2 proteina iz stanične stijenke kvasca ne dovodi do značajnog utjecaja na izlaganje konstrukta *PIR2bla* na staničnoj površini, dok se značajno smanjuje mogućnost izlaganja *CCW12bla* konstrukta

6. POPIS LITERATURE

- Abramova N, Sertil O, Mehta S, Lowry C (2001) Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* **183**, 2881-2887. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2881-2887.2001>
- Andrés I, Gallardo O, Parascandola P, Pastor FIJ, Zueco J (2005) Use of the cell wall protein Pir4 as a fusion partner for the expression of *Bacillus* sp. BP-7 xylanase A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **89**, 690–697. <https://doi.org/10.1002/bit.20375>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JB.180.19.5030-5037.1998>
- Castillo L, Martinez AI, Garcerá A, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: The repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan. *Yeast* **20**, 973–983. <https://doi.org/10.1002/yea.1016>
- Cherf GM, Cochran JR (2015) Applications of yeast surface display for protein engineering. *Methods Mol Biol* **1319**, 155–175. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2748-7_8
- de Groot PWJ, Yin QY, Weig M, Sosinska GJ, Klis FM, de Koster CG (2007) Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **24**, 267–278. <https://doi.org/10.1002/yea.1443>
- de Nobel H., van den Ende, H., Klis, F. M. (2000) Cell wall maintenance in fungi. *Trends Microbiol* **8**, 344–345. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01805-9](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01805-9)
- Dranginis A, Rauceo J, Coronado J, Lipke P (2007) A Biochemical Guide to Yeast Adhesins: Glycoproteins for Social and Antisocial Occasion. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 282-294. <https://doi.org/10.1128/membr.00037-06>
- Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, Mrša V, Tanner W (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* **281**, 11523–11529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600314200>

- Eisenhaber B, Eisenhaber F (1998) Sequence properties of GPI-anchored proteins near the ω -site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* **11**, 1155–1161. <https://doi.org/10.1093/protein/11.12.1155>
- Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **337**, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.025>
- Eisenhaber F, Eisenhaber B, Kubina W, Maurer-Stroh S, Neuberger G, Schneider G, i sur. (2003) Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: Big-II, NMT and PTS1. *Nucleic Acids Res* **31**, 3631–3634. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg537>
- Eun H-M (1996) Marker/Reporter Enzymes. U: Enzymology primer for Recombinant DNA Technology: General Principles, Elsevier, Amsterdam, str. 567–645.
- Fankhauser C, Homans SW, Thomas-Oates JE, McConville MJ, Desponds C, Conzelmann A, i sur. (1993) Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**, 26365–26374. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)74324-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)74324-5)
- Frieman MB, Cormack BP (2003) The ω -site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol Microbiol* **50**, 883–896. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03722.x>
- Frieman MB, Cormack BP (2004) Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (N Y)* **150**, 3105–3114. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27420-0>
- Ghanegolmohammadi F, Okada H, Liu Y, Itto-Nakama K, Ohnuki S, Savchenko A i sur. (2021) Defining Functions of Mannoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* by High-Dimensional Morphological Phenotyping. *Fungi* **769**. <https://doi.org/10.3390/jof7090769>
- Goossens K, Willaert R (2010) Fkiculation protein structure and cell-cell adhesion

mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **32**, 1571–1585
<https://doi.org/10.1007/s10529-010-0352-3>

Hamada K, Fukuchi S, Arisawa M, Baba M, Kitada K (1998a) Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 53–59. <https://doi.org/10.1007/s004380050706>

Hamada K, Terashima H, Arisawa M, Kitada K (1998b) Amino Acid Sequence Requirement for Efficient Incorporation of Glycosylphosphatidylinositol-associated Proteins into the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae**. *J Biol Chem* **273**, 26946–26953. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26946>

Hossain SA, Rahman SR, Ahmed T, Mandal C (2020) An overview of yeast cell wall proteins and their contribution in yeast display system. *Asian J Med Biol Res* **5**, 246–257. <https://doi.org/10.3329/ajmbr.v5i4.45261>

Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, de La Cruz J, Llobell A, Douwes JE, i sur. (1996) Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked /3-1,3-/3-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**, 337–345

Kapteyn JC, Ram AFJ, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, van den Ende H, i sur. (1997) Altered Extent of Cross-Linking of 1,6-Glucosylated Mannoproteins to Chitin in *Saccharomyces cerevisiae* Mutants with Reduced Cell Wall 1,3-Glucan Content. *J Bacteriol* **179**, 3. <https://doi.org/10.1128/jb.179.20.6279-6284.1997>

Kapteyn JC, van Egmond P, Sievi E, Van H, Ende D, Makarow M, i sur. (1999) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol* **31**, 1835–1844. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01320.x>

Klis FM, Boorsma A, de Groot PWJ (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>

Klis FM, Brul S, de Groot PWJ (2010) Covalently linked wall proteins in ascomycetous fungi. *Yeast* **27**, 489–493. <https://doi.org/10.1002/yea.1747>

Kollá R, Reinhold BB, Petráková E, C Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, i sur. (1997) The Netherlands In a previous study. *J Biol Chem* **270**, 1162–17775. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17762>

- Kostova Z, Rancour DM, Menon A, Orlean P (2000) Photoaffinity labelling with P3-(4-azidoanilido)uridine 5'-triphosphate identifies Gpi3p as the UDP-GlcNAc-binding subunit of the enzyme that catalyses formation of GlcNAc-phosphatidylinositol, the first glycolipid intermediate in glycosylphosphatidylinositol synthesis. *Biochem J* 815–822
- Kowalski L. R. Z., Kondo, K., Inouye, M. (1995). Cold-shock induction of a family of TIP1-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 15,341–353
- Li J, Zhang M, Wan C, Den Haan R, Bai F, Zhao X (2020) Improved cellulase production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by disrupting the cell wall protein-encoding gene CWP2. *J Biosci Bioeng* **192**, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.08.012>
- Lipke PN, Kurjan J (1992) Sexual agglutination in budding yeasts: Structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins
- Livermore DM (1998) Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother* **41**, 25–41. https://doi.org/10.1093/jac/41.suppl_4.25
- Lozančić M (2021) Proteini staničnih stijenki različitih rodova kvasaca i njihov potencijal za izlaganje heterolognih proteina na staničnoj površini (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Marcel Van Der Vaart J, Heleen L, Caro P, Chapman JW, Klis FM, Verrips CT (1995) Identification of Three Mannoproteins in the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae* Downloaded from. *J Bacteriol* **177**, 3104–3110. <https://doi.org/10.1128/jb.177.11.3104-3110.1995>
- Marguet D., Guo, X. J., Lauquin, G. J.-M. (1988). Yeast gene SRP1 (serine-rich protein): Intragenic repeat structure and identification of a family of SRP1-related DNA sequences. *J Mol Biol* **202**, 455–470. doi:10.1016/0022-2836(88)90278-1
- 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* **10A**, 813–820. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199907)15:10A<813::AID-YEA421>3.0.CO;2-Y.
- Mrša V, Seidl T, Gentzsch 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. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19970930\)13:12<1145::AID-YEA163>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19970930)13:12<1145::AID-YEA163>3.0.CO;2-Y)

Narang SS, Malone CL, Deschenes RJ, Fassler JS (2008) Modulation of yeast Sln1 kinase activity by the Ccw12 cell wall protein. *J Biol Chem* **283**, 1962–1973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706877200>

Orlean P (2012) Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**, 775–818. doi: 10.1534/genetics.112.144485

Orlean P, Menon AK (2007) GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: How we learned to stop worrying and love glycosphospholipids. *J Lipid Res* **48**, 993–1011. doi: 10.1194/jlr.R700002-JLR200

Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J (2010) Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*: Changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis* **23**(4), 320–326. doi: 10.1097/qco.0b013e3283398dc1

Park M (2020) Surface display technology for biosensor applications: A review. *J Sens* **20**. <https://doi.org/10.3390/s20102775>

Pepper L, Cho Y, Boder E, Shusta E (2008) A Decade of Yeast Surface Display Technology: Where Are We Now? *Comb. Chem* **11**, 127–134 <https://doi.org/10.2174/138620708783744516>

Ragni E, Sipiczki M, Strahl S (2007) Characterization of Ccw 12p, a major key player in cell wall stability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**, 309–319. <https://doi.org/10.1002/yea.1465>

Ruiz-Herrera, J. (1991) Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly. CRC press, Boca Raton.

Roy A., Lu, C. F., Marykwas, D. L., Lipke, P. N., Kurjan, J. (1991) The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein α -agglutinin. *Mol. Cell Biol.* **11**, 4196–4206. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.8.4196-4206.1991>

Russo P, Simonen M, Uimari A, Teesalu T, Makarow M (1993) Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast HSP150 gene encoding a secretory glycoprotein. *Mol Gen Genet* **239**, 273–280. <https://doi.org/10.1007/BF00281628>

- Sertil O, Cohen, B. D., Davies, K. J. A., Lowry, C. V (1997) The DAN1 gene of *S. cerevisiae* is regulated in parallel with the hypoxic genes, but by a different mechanism. *Gene* **192**, 199–205. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00028-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00028-0)
- Sobering AK, Watanabe R, Romeo MJ, Yan BC, Specht CA, Orlean P, i sur. (2004) Yeast Ras Regulates the Complex that Catalyzes the First Step in GPI-anchor Biosynthesis at the ER. *Cell* **117**, 638–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.003>
- Stokke, BT, Elcsaeter, A, Hara, C, Kitamura S, Take03 K (1993) Physicochemical Properties of (1 + 6)-Branched (1 + 3)-@-~-Glucans. 1. Physical Dimensions Estimated from Hydrodynamic and Electron Microscopic Data. *Biopolymers* **33**, 561–573. <https://doi.org/10.1002/bip.360330118>
- Tanaka T, Yamada R, Ogino C, Kondo A (2012) Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**, 577–591.
- Teparić R, Mrša V (2013) Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. *Curr Genet* **59**, 171–185. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0403-0>
- Teparić R, Stuparević I, Mrša V (2004) Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology (N Y)* **150**, 3145–3150. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27296-0>
- Udenfriend S, Kodukula K (1995) How glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* 563–589. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.003023>
- Vidugiriene J, Menon AK (1993) Early Lipid Intermediates in Glycosyl-phosphatidylinositol Anchor Assembly Are Synthesized in the ER and Located in the Cytoplasmic Leaflet of the ER Membrane Bilayer. *J Cell Biol* **121**, 987–996. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.5.987>
- Vishwakarma RA, Menon AK (2005) Flip-flop of glycosylphosphatidylinositols (GPI's) across the ER. *Chemical Communications* 453–455. <https://doi.org/10.1039/b413196g>
- Watanabe R, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Kinoshita T (1999) Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem J* **339**, 185–

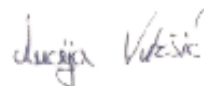
192. <https://doi.org/10.1042/bj3390185>

Williams DL, McNamee RB, Jones EL, Pretus HA, Ensley HE, William Browder I, i sur. (1991) A method for the solubilization of a (1 + 3)-p-D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Res* **91**, 203–213. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0008-6215\(91\)89052-H](https://doi.org/doi.org/10.1016/0008-6215(91)89052-H)

Yun D-J, Zhao Y, Pardo JM, Narasimhan ML, Damsz B, Lee H, i sur. (1997) Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 7082–7087. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.7082>

Izjava o izvornosti

Ja Lucija Vukšić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis