

Obilježavanje i detekcija proteina Scw4 u soju SK1 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Morduš, Josip

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:660559>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Josip Morduš

6997/N

**Obilježavanje i detekcija proteina Scw4 u soju
SK1 kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija I

Mentor: doc.dr.sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti Znanstveno polje: Biotehnologija

Obilježavanje i detekcija proteina Scw4 u soju SK1 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Josip Morduš, 0058206172

Sažetak:

Za protein Scw4, koji se nalazi u staničnoj stijenci kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, još uvijek nije poznato sudjeluje li u mejozi i sporulaciji te koja je njegova uloga u tim procesima. Taj protein nekovalentno i kovalentno je vezan za staničnu stijenu, pretpostavlja se da ima glukanaazu aktivnost i stoga vjerojatno sudjeluje u organizaciji glukana. Stanična stijenka, ekstracelularna je organela koja se sastoji od β -1,3 i β -1,6-glukana, hitina i manoproteina. Ulaskom u mejozu i sporulaciju dolazi do brojnih morfoloških i genetičkih promjena stanične stijenske, primjerice smanjenja ili povećanja ekspresije određenih proteina. Cilj ovog rada je utvrditi prisutnost proteina Scw4 tijekom mejoze i sporulacije. Dodatkom hemaglutininske (HA) oznake na C terminalni kraj proteina Scw4 omogućeno je praćenje ekspresije specifičnim anti-HA antitijelima nakon izolacije proteina. Obilježavanje i detekcija proteina uspješno su provedene, a Scw4 je u SDS-ekstraktu prisutan u mejozi i sporulaciji. Ovaj rad doprinosi razumijevanju uloge Scw4 proteina u staničnoj stijenci kvasca.

Ključne riječi: *kvasac, stanična stijenka, Scw4, Saccharomyces cerevisiae*

Rad sadrži: 33 stranice, 9 slika, 6 tablica, 39 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc.dr.sc. Igor Stuparević

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

Datum obrane: 30. kolovoza 2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Biochemistry Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

**Tagging and detection of Scw4 protein in yeast
Saccharomyces cerevisiae strain SK1**

***Josip Morduš*, 0058206172**

Abstract:

It is still not known if Scw4 protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall plays role in meiosis and sporulation. That protein is non-covalently and covalently attached to cell wall, and it's assumed that it has glucanase activity and probably participates in glucan organization. Cell wall is the extracellular organelle which consists of β -1,3 and β -1,6-glucan, chitin and mannoproteins. Meiosis and sporulation results in many morphological and genetical changes of cell wall, for example, decrease or increase of certain protein expression. The goal of this work is to determine presence of Scw4 during meiosis and sporulation. After protein isolation, it is enabled to track Scw4 expression with specific anti-HA antibodies by adding hemagglutinin (HA) tag to C-terminal residue of Scw4. Tagging and detection are successfully conducted and in SDS-extract Scw4 is present in meiosis and sporulation. This science work contributes in understanding of the role of Scw4 in cell wall.

Keywords: *yeast, cell wall, Scw4, Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 33 pages, 9 figures, 6 tables, 39 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: assistant prof. Igor Stuparević, PhD

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

Defence date: August 30th 2017

Sadržaj

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. Životni ciklus kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.3. Sporulacija kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.4. Stanična stijenka kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.5. Proteini stanične stijenke	4
2.5.1 Nekovalentno povezani proteini stanične stijenke	5
2.5.2. Protein Scw4	6
2.5.3. Kovalentno povezani proteini stanične stijenke	7
2.6. Western blot metoda	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Kemikalije i enzimi	12
3.1.2. Otopine i puferi	13
3.1.3. Hranjive podloge	14
3.1.4. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	15
3.1.5. Soj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
3.1.6. Oligonukleotidi	15
3.1.7. Plazmid pYM16	15
3.2. METODE	17
3.2.1. Transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>Escherichia coli</i>	17
3.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije <i>Escherichia coli</i> („mini-prep“) .	17
3.2.3. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima – restrikcijska analiza	17
3.2.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	18
3.2.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	19
3.2.6. Transformacija kvasca LiAc metodom	19
3.2.7. Izolacija stanične stijenke kvasca	19
3.2.8. Izolacija proteina stanične stijenke	20
3.2.9. SDS-elektroforeza po Laemmli-u	20
3.2.10. Western blot metodom	21
3.2.11. Induciranje mejoze i sporulacije	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Rezultati	23
4.1.1. Umnažanje i provjera plazmida pYM16	23

4.1.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	23
4.1.3. SDS-elektroforeza i Western blot.....	24
4.1.4. Mejoza i sporulacija	25
4.2. Rasprava	26
5. ZAKLJUČAK	29
6. POPIS LITERATURE	30

1.UVOD

Jednostanični eukariotski organizam, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* najistraženiji je organizam u području biotehnologije te je zbog homologije biokemijskih procesa višim eukariotima nezamjenjiv modelni organizam u znanstvenom radu. Njegova nezamjenjivost očituje se kratkim generacijskim vremenom, jeftinim uzgojem te jednostavnim životnim ciklusom. Sekvenciranje genetičkog materijala kvasca dovelo je do usavršavanja metoda genetičkog inženjerstva te otvorilo put naglom razvoju biotehnologije. Stanična stijenka kvasca, ekstracelularna je struktura koja oblikuje stanice kvasca, omogućuje njihovu komunikaciju s okolišem te osigurava osmotsku i mehaničku stabilnost. Iako je odavno poznata znanstvenicima, stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* još uvijek je nedovoljno istražena. Stanična stijenka građena je od ugljikohidratnih komponenta β -1,3-glukana, β -1,6-glukana i hitina te proteina (Fleet, 1991). Jedan od tih proteina je i Scw4 koji je u staničnu stijenku vezan nekovalentno i kovalentno, ima glukanaazu aktivnost te vjerojatno sudjeluje u organizaciji glukana (Teparić, Stuparević i Mrša, 2007). Morfologija stanične stijenke praćena je brojnim genetičkim promjenama i mijenja se prelaskom kvasca iz jednog u drugi životni ciklus, primjerice prelaskom stanica iz mitoze u mejozu (Haber, 1998). Mejoza je spolna dioba koja rezultira stvaranjem haploidnih spora, dok je mitozna nesporna dioba. Sporulacija se u laboratorijskim uvjetima inducira prisutnošću nefermentabilnog izvora ugljika, odnosno nepovoljnim uvjetima jer na taj način stanica preživljava takve uvjete formiranjem spora u askusu (Freese, Chu i Freese, 1982). Budući da morfološke i genetičke promjene prilikom sporulacije uzrokuju promjenu ekspresije nekih proteina, u ovom radu pratila se ekspresija proteina Scw4 u mejozi i sporulaciji. Kako bi se te pretpostavke mogle dokazati potrebno je dodati HA oznaku na C terminalni kraj proteina Scw4 te ga na taj način označiti i omogućiti njegovo praćenje u mejozi i sporulaciji. Detekcija obilježenog proteina u kvascu koji se dijeli mejozom i rezultira sporama vrši se nakon izolacije proteina vrućim SDS-om koristeći specifična antitijela anti-HA. Za utvrđivanje načina vezanja proteina Scw4, proteini se iz stanične stijenke izoliraju osim SDS-om i korištenjem glukanaza te blagom alkalnom hidrolizom uz pomoć 30mM NaOH.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam koji pripada carstvu fungi omogućio je razumijevanje brojnih biokemijskih procesa viših eukariota. Od davnina je poznat ljudskom rodu preko proizvodnje kruha, piva i vina. Ono što ga čini nezamjenjivim modelnim organizmom u znanstvenim istraživanjima je jednostavnost uzgoja, kratko generacijsko vrijeme (oko 2h), dobro proučen životni ciklus, niska cijena uzgoja te jednostavna genetička manipulacija i korištenje metoda genetičkog inženjerstva. Sekvenciranje ukupnog genetičkog materijala kvasca *S. cerevisiae* otvorilo je put razvoju biotehnologije te usavršavanju metoda genetičkog inženjerstva koje daju ogroman doprinos znanosti (Sherman, 2002).

2.2. Životni ciklus kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanice kvasca koje rastu i razmnožavaju se mogu postojati u dva oblika: haploidni i diploidni (Herskowitz, 1988). Haploidne stanice iskazuju **a** ili α -tip parenja, dok su diploidne stanice **a/a** tip parenja (Grba, 2010). Kvasac *S. cerevisiae* eukariotski je organizam te temeljem toga, u odnosu na prokariotske organizme, ima genetički materijal pohranjen u jezgri u obliku više linearnih kromosoma, a replikacija genetičkog materijala i stanična dioba strogo su vremenski odijeljeni procesi. Seksualni ciklus povezuje diploidne i haploidne stanice, jer diploidna stanica može ući u mejozu i sporulirati. Kvasac u povoljnim uvjetima raste te dolazi do povećanja stanične mase, ta faza naziva se G1 faza i ona rezultira prelaskom u drugu fazu koja se naziva S faza (Blow i Tanaka, 2005). U navedenoj se fazi sintetizira DNK, repliciraju kromosomi te je vidljivo izbijanje pupa, a završetkom te faze stanica ulazi u fazu G2 u kojoj kvasac sadrži dvije sestrinske kromatide te ima potpuno razvijen pup, ali bez genetičkog materijala, koji u pup ulazi u mitozu. Nakon te faze stanica je spremna za diobu. Taj se proces naziva mitozom, odnosno M faza staničnog ciklusa i nastaju dvije stanice u G1 fazi. Obično se lako može prepoznati stanica kćer koja nastaje iz pupa od stanice majke jer je volumenom manja. Ukupno trajanje staničnog ciklusa jednako je generacijskom vremenu te u optimalnim uvjetima iznosi 100 minuta (Herskowitz, 1988). Mitoza je dioba u kojoj se broj kromosoma udvostruči prije nego li se dioba obavi, a nasljedni materijal se ravnomjerno raspoređuje u dvije nove stanice kvasca, dok se u mejozi, koja završava sporulacijom, reducira broj kromosoma i od dvostrukih nastaju jednostruki kromosomi u sporama (O'Connor, 2008).

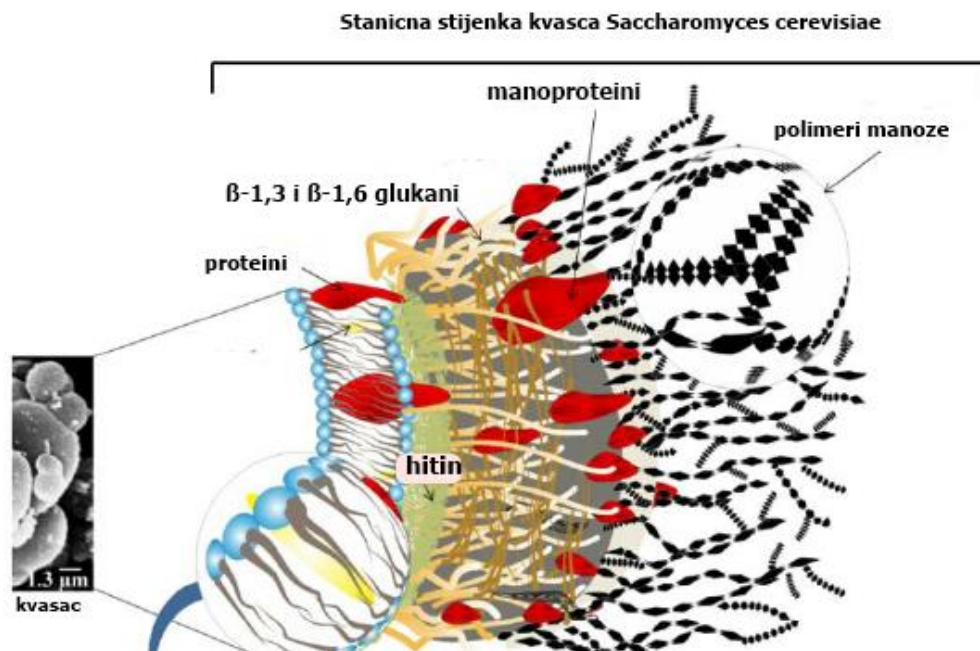
2.3. Sporulacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

U nepovoljnim uvjetima stanice kvasca iz G1 faze ulaze u G0 fazu koja se očituje smanjenom metaboličkom aktivnošću. Mejotička dioba sastoji se od dvije uzastopne diobe, mejoza 1 i mejoza 2 od kojih svaka ima četiri faze. Niz događaja mejoze 1 (redukcijska dioba) rezultiraju redukcijom broja kromosoma na polovicu, dok u mejozi 2 (ravnotežna dioba) dolazi do razdvajanja sestrinskih kromatida. Faze mejoze 1 su profaza I, metafaza I, anafaza I i telofaza I, a faze mejoze 2 su profaza II, metafaza II, anafaza II i telofaza II. Do sporulacije kvasca dolazi u nepovoljnim uvjetima, npr. prilikom nedostatka hranjivih tvari. U laboratoriju takve uvjete izazivamo uzgojem kvasca u prisutnosti nefermentabilnog izvora ugljika – acetata (Freese, Chu i Freese, 1982). Mejoza je proces u kojem nastaju spore i karakterističan je samo za diploidni oblik stanica koje imaju sposobnost da mejotičkom diobom iz jedne diploidne stanice nastaju četiri haploidne stanice-spore od kojih su dvije **a**, a dvije α -tipa parenja. Te spore nastale mejotičkom diobom nalaze se jedna kraj druge unutar ovojnice od polisaharida koje se naziva askus. Askospore su otpornije na nepovoljne uvjete u okolišu od vegetativnih stanica, a tek će u povoljnim uvjetima doći do razgradnje askusa, oslobađanja spora i njihova klijanja. Spore nakon germinacije mogu ući u haploidni stanični ciklus ili se mogu pariti s drugom haploidnom stanicom suprotnog tipa parenja i stvoriti diploidnu stanicu **a/a** tipa parenja. U procesu sporulacije stanica prolazi kroz brojne morfološke i genetičke promjene, neki od tih su procesiranje RNA molekula, segregacija kromosoma i organela, promjena vegetativnih mehanizama i promjene sekretornog puta (Neiman, 2011). Tijekom sporulacije dolazi do povećanja ekspresije oko 120 gena što ukazuje na složenost procesa, a efikasnost sporulacije varira među različitim sojevima, od 1-2% pa do gotovo 100% (Haber, 1998).

2.4. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* dvoslojna je ekstracelularna organela koja odvaja, ali i povezuje kvasac s okolišem te se očituje mehaničkom čvrstoćom i elastičnošću. Jedna od najbitnijih funkcija stijenke u kvasca je očuvanje osmotskog integriteta. Volumen stanice kvasca ovisi o osmolalnosti medija te se smanjuje u hipertoničnom, a povećava u hipotoničnom mediju (Morris i sur., 1986). Stijenka daje oblik stanicama ovisno o stadiju rasta i razvoja. 15-30% mase kvasca sastoji se od ugljikohidrata i proteina (Orlean, 1997). Glavne komponente stijenke su β -1,3-glukani, β -1,6-glukani, hitin i manoproteini kao što je vidljivo na slici 1. Unutrašnji sloj građen je od β -1,3-glukana (50%), β -1,6-glukana (5%) koji je manje zastupljen, ali važan kod

unakrsnog povezivanja komponenata stijenke te hitina (1-2%) (Fleet, 1991). Vanjski sloj stijenke koji je građen od manoproteina četkaste je građe. Polimer β -1,3-glukana sastoji se od 1500 jedinica glukoze koje su povezane β -1,3-glikozidnom vezom te 50 glukoznih jedinica koje se granaju vezujući se na C6 atom. Unakrsne veze β -1,3-glukan ostvaruje svojim nereducirajućim krajevima sa reducirajućim krajevima hitina u kovalentnoj β -1,4-glikozidnoj vezi te tako dodatno daje čvrstoću stijenci. β -1,6-glukan koji se nalazi na vanjskim dijelovima stijenke tvori veze s β -1,3-glukanom, hitinom te manoproteinima (Hartland i sur., 1994). Kemijsku strukturu hitina čine N-acetil glukozamin (GlcNAc) povezan β -1,4-glikozidnom vezom, a u stanici kvasca, sintetizira se enzimom Chs3p. Sinteza se odvija koristeći UDP-GlcNAc kao supstrat te je ekspresija tog enzima tijekom životnog ciklusa uglavnom nepromijenjena (Bulik i sur., 2003). Manoproteini su glikozilirani proteini vezani za staničnu stijenku te se sastoje od proteinskog i ugljikohidratnog dijela kojeg tvori manan. Veza između proteina i ugljikohidrata glikozidna je veza koja može biti N ili O oblika. N glikozilacija nastaje između ostatka aminokiseline asparagina, a O glikozilacija između ostataka serina ili treonina (Klis, Boorsma i De Groot, 2006).



Slika1. Model građe stijenke kvasca *S. cerevisiae* (Talavera i sur., 2013).

2.5. Proteini stanične stijenke

Identificirano je više od 30 manoproteina koji imaju funkciju u izgradnji i remodeliranju stijenke te interakcijama među stanicama u procesu aglutinacije i flokulacije. Proteini stanične stijenke uglavnom su manoproteini nekovalentno vezani za β -glukan, ali identificirano je i manji broj

kovalentno povezanih proteina na β -glukan stijenke. Integritet stijenke može se narušiti na nekoliko načina, neki od tih načina su tretiranje vrućim natrij dodecil sulfatom (SDS), natrijevom lužinom (NaOH) ili enzimom β -glukanazom te se na taj način mogu izolirati i željeni proteini ovisno jesu li vezani kovalentno ili nekovalentno na stijenke, to je shematski prikazano na slici 2 (Mrša i sur., 1997). Jedna od podjela proteina stijenke je prema načinu vezanja proteina za glukan, gdje se proteini dijele na kovalentno i nekovalentno vezane proteine. Druga podjela manoproteina je prema načinu izolacije. Prvu grupu čine proteini koji se izoliraju vrućim SDS-om (Scw-Soluble cell wall proteins) i koji su vezani nekovalentno na glukan stijenke. Drugu grupu čine proteini izolirani enzimskom razgradnjom β -glukanazom, koja razgrađuje veze između β -glukana te na taj način oslobađa kovalentno vezane proteine stanične stijenke. Toj skupini pripadaju kovalentno vezani proteini stanične stijenke (Ccw-covalently linked cell wall proteins) povezani preko glikozil-fosfatidilinozitolskog (GPI) sidra na β -1,6-glukan. U treću grupu pripadaju proteini koji se izoliraju tretmanom s 30 mM NaOH (Mrša i sur., 1997). Na taj način se izoliraju proteini koji su vezani direktno na β -1,3-glukan pomoću esterske veze između γ -karboksilne grupe glutaminske kiseline i hidroksilne grupe glukoze, a takvu porodicu proteina nazivamo Pir (Protein with internal repeats) (Ecker i sur., 2006).

2.5.1 Nekovalentno povezani proteini stanične stijenke

Manoproteini nekovalentno vezani na β -1,3-glukan čine veći udio svih proteina stanične stijenke, čak 80% i do sada ih je identificirano i opisano nešto više od deset. Ovi proteini izoliraju se tretmanom s vrućim SDS-om i β -merkaptetanom. SDS uz visoku temperaturu uzrokuje denaturaciju proteina, dok β -merkaptetan razara disulfidne mostove. Većina tih proteina zapravo su enzimi, ali njihova biološka funkcija još uvijek nije definirana (Teparić i Mrša, 2013). Ustanovljeno je da se postsintetski modificiraju, uglavnom O-glikozilacijom (Mrša i Tanner, 1999). Homologije s glukan hidrolazama i transglukozidazama upućuje na to da imaju glukozidaznu enzimsku aktivnost (tablica 1) te da imaju ulogu u sporulaciji, održavanju integriteta, remodeliranju stanične stijenke, pupanju te ostalim procesima koji uključuju promjene stanične stijenke. Bgl2p prvi je izolirani protein ove skupine čija je struktura poznata i potvrđena je njegova endoglukanazna ili transglukanazna aktivnost ovisno o koncentraciji supstrata. Isto tako se zna kako ga u stijenki ima u većem broju nego drugih nekovalentno vezanih proteina (Klebl i Tanner, 1989; Mrša, Klebl i Tanner, 1993). Delecija proteina Bgl2p ne utječe na morfologiju stanice, dok prevelika ekspresija proteina djeluje štetno na održivost stanice.

Tablica 1. Neki od Scw proteina i njihova enzimska aktivnost.

Soluble cell wall protein	FUNKCIJA	VELIČINA (kDa)
Scw2	Hitinaza	116
Scw3	Homologan glukanazi	95
Scw4	Homologan glukanazi	66
Scw6	Egzoglukanaza	44
Scw9	Endoglukanaza/transglukanaza	29
Scw10	Homolog glukanaazama	66
Scw11	Homolog glukanaazama	78

2.5.2. Protein Scw4

Protein Scw4, kojemu je još uvijek nepoznata biološka funkcija, ranijim je istraživanjima svrstan u nekovalentno vezane proteine, ali se daljnjim istraživanjem tog proteina ipak potvrdilo da je vezan i kovalentno. To je dokazano eksperimentom koji uz izolaciju vrućim tretmanom SDS-om i β -merkaptetanolom, izolira Scw4 i tretmanom s 30mM NaOH kao što je slučaj kod Pir porodice proteina koji su vezani kovalentno (Teparić, Stuparević i Mrša, 2007). Pir proteini imaju poznate regije vezanja, ali za Scw4 još nije potvrđeno na koji je način povezan niti je poznata regija kojom se veže na strukturne komponente stijenke. Zbog velike homologije sa proteinom Bgl2 koji je ujedno i prvi identificirani nekovalentno povezani protein, pretpostavlja se kako Scw4 ima glukanaazu aktivnost iako to nije potvrđeno *in vitro*. Protein Scw4 sadrži 63% identičnih aminokiselina s proteinom Scw10, spadaju u istu obitelj proteina GH17 (glikozid hidrolaza obitelj 17) (Cappellaro, Mrša i Tanner, 1998). Identične su molekulske mase kao što je navedeno u tablici 1. Oba homologa sadrže ER-translokacijsku sekvencu i mjesto za procesiranje proteazom Kex2, stoga se pretpostavlja da im je biološka funkcija u izgradnji stanične stijenke zajednička te da je za normalnu funkciju stijenke potreban barem jedan od tih proteina (Cappellaro, Mrša i Tanner, 1998). Kod proteina Scw4 zamijećena je i specifična regija za procesiranje japsinskim proteazama, dok za protein Scw10 još uvijek nije poznato postoji li mogućnost za cijepanje japsinskim proteazama (Grbavac i sur., 2017). Kod mutanta *scw4* ili *scw10* nije zamijećena bitna fenotipska razlika. Međutim kod dvostrukog mutanta *scw4scw10* zabilježeno je

neuspješno parenje stanica kvasca, smanjen je integritet stanične stijenke i povećana osjetljivost na inhibitore sinteze hitina (Šestak i sur., 2004). Smatra se da način vezanja proteina Scw4 uvjetuje posttranslacijsko procesiranje te se tako procesirani oblici proteina Scw4 vežu nekovalentnim vezama, a neprocesiran oblik proteina Scw4 pretežito se veže kovalentno (Grbavac i sur., 2017). Za Scw10 još uvijek nema podataka o utjecaju procesiranja na način vezanja na stijenku.

2.5.3. Kovalentno povezani proteini stanične stijenke

GPI proteini

Glikozil-fosfatidilinozitolno sidro je po kemijskoj strukturi kompleks glikofosfolipida te nastaje kao posttranslacijska modifikacija dodana na C-terminalni kraj u endoplazmatskom retikulumu, a omogućuje translokaciju proteina na površinu stanice. Povezivanje GPI sidra na C-terminalnu grupu asparagina i glicina su reakcije transamidaze zabilježene u kvascu *S. cerevisiae* (Pittet i sur., 2006). Neki od tih proteina pripadaju GAS obitelji koji imaju glukan-remodelirajuću aktivnost. GPI sidro je kovalentno vezano za β -1,6-glukan te se temeljem toga ekstrahira enzimskom razgradnjom β -glukanazom (β -1,3-glukanaza, laminarinaza ili zimolijaza) te endo β -1,6-glukanazom ili hidroflornom kiselinom (HF). Još nije potvrđeno jesu li GPI proteini najprije vezani na β -1,6-glukan ili na β -1,3-glukan, a s kojeg se procesom transglikozilacije premještaju na β -1,6-glukan. Također nije potpuno razjašnjena njihova uloga osim sudjelovanja u aglutinaciji i flokulaciji (Klis i sur., 2002). Neki od najistraženijih GPI proteina, kao i njihova uloga, navedeni su u tablici 2. Pretpostavlja se da sudjeluju u procesima preraspodjele komponenata stijenke. Delecija gena koji kodiraju za pet najzastupljenijih GPI proteina rezultirala je umjerenim smanjenjem osmotske stabilnosti mutanata, ali nije utjecalo na rast mutanata (Teparić, Stuparević i Mrša, 2004).

Tablica 2. Neki od GPI proteina i njihova enzimska aktivnost.

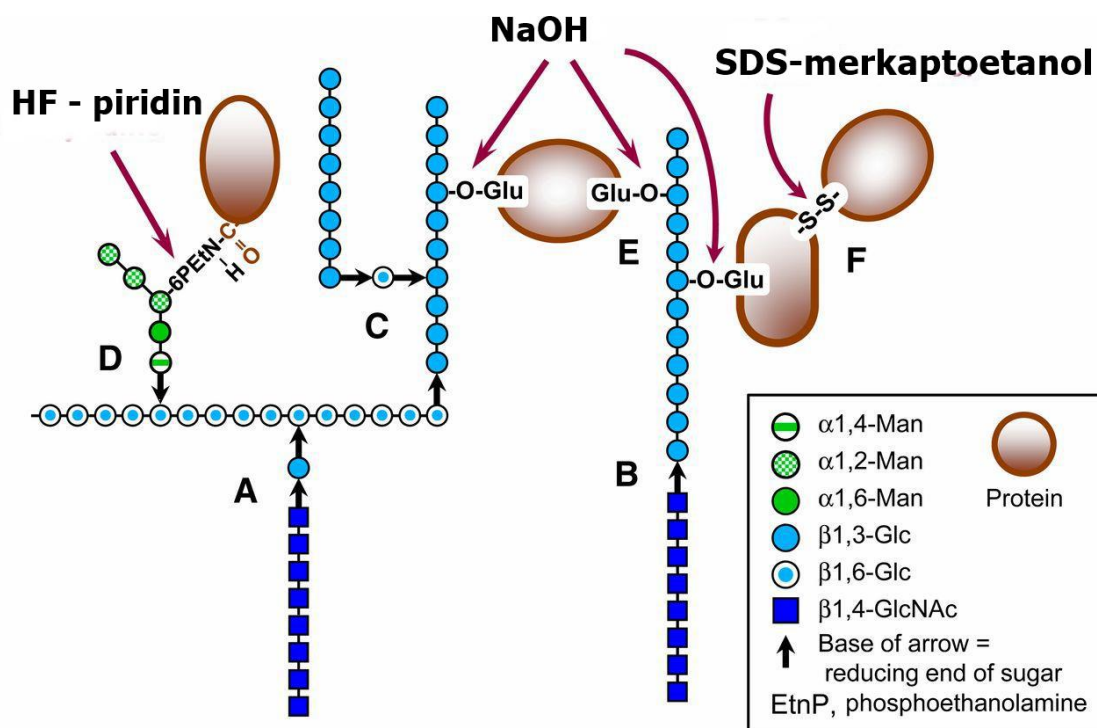
GPI protein	FUNKCIJA/REGULACIJA	VELIČINA (kDa)
Aga1	α -aglutinin	250
Aga1	"Core" dio α -aglutinina	73
Flo1	Flokulacija	>300
Cwp1	Nepoznata	55

PIR porodica proteina

Pir proteini uključuju četiri homologna oblika proteina, koji imaju karakterističnu ponavljajuću sekvencu od 11 aminokiselina kod N-terminusa te su po tome dobili i ime. Druga karakteristika je da sadrže aktivno mjesto za procesiranje, hidrolizu pomoću proteaze Kex2 u Golgijevom aparatu koja je nužna za formiranje zrelog oblika ovih proteina. Treća zajednička karakteristika je signalni peptid, koji je tipičan za sve sekretorne proteine stanične stijenke (Mrša i sur., 1997). Četiri su proteina identificirana iz Pir porodice (prikazani u Tablici 3) te je vidljiva razlika u broju ponavljajućih regija. Poznata su dva mjesta vezanja Pir proteina za stijenku, prvo mjesto predstavljaju ponavljajuće regije i to preko γ -karboksilne grupe drugog glutaminskog ostatka esterskom vezom sa β -1,3-glukozom. Iz tog razloga izolacija se vrši tretmanom s 30 mM NaOH (Mrša i sur., 1997). Delecijom ponavljajućih regija koncentracija proteina Pir4 povećala se u mediju te je ustanovljeno da je barem jedna ponavljajuća regija dovoljna za vezanje proteina na stijenku te je količina zadržanih proteina na stijenci veća sa porastom broja ponavljajućih regija. Drugo mjesto vezanja Pir proteina je pomoću karakterističnih cisteinskih ostataka na C-terminalnom (četiri cisteinska ostatka) kraju koji formiraju disulfidne mostove sa specifičnim komponentama stijenke. Pretpostavlja se da je barem jedno mjesto vezanja potrebno za ugrađivanje Pir proteina u stijenku (Castillo i sur., 2003). Potpunim uklanjanjem Pir proteina narušava se integritet stanične stijenke, dolazi do promjene oblika i povećanje volumena stanica mutanata te se uočava jači utjecaj inhibitora sinteze stijenke (Mrša i Tanner, 1999).

Tablica 3: Vrste Pir proteina (Mrša i sur., 1997).

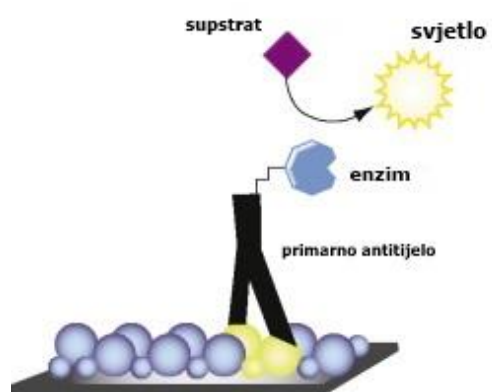
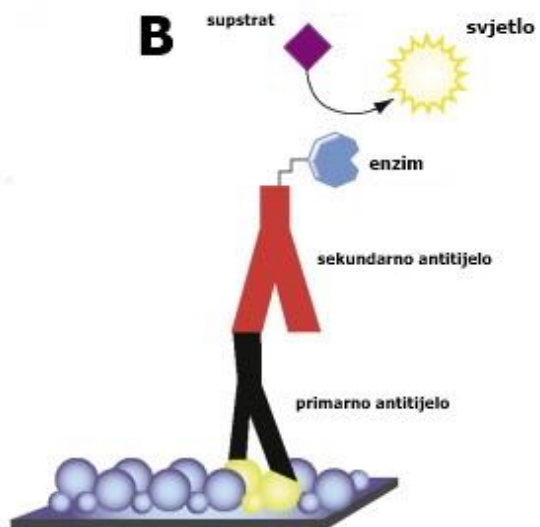
Pir protein	FUNKCIJA	Veličina (kDa)	Broj ponavljajućih regija
Pir1p	Nepoznata	250	8
Pir2p	Nepoznata	115	11
Pir3p	Nepoznata	57	8
Pir4p	Nepoznata	41	1



Slika2. Shematska slika komponenta stanične stijenke i načina izolacije proteina stanične stijenke (A) Reducirajući krajevi hitina vezani na bočni ogranak β -1,3-glukana na β -1,6-glukanu. (B) Reducirajući krajevi hitina vezani na nereducirajući kraj β -1,3-glukana. (C) Reducirajući kraj β -1,3-glukana vezanog na bočni ogranak β -1,6-glukana na β -1,3-glukanu. (D) Reducirajući kraj GPI glikoziliran (vjerojatno α 1,3-Man) na unutarnju molekulu β -1,6-glukanskog lanca. (E) Esterska veza između β -1,3-glukana i γ -karboksilne grupe glutamata PIR proteina. (F) Disulfidna veza između CWP (Orlean, 2012).

2.6. Western blot metoda

Western blot ili imunoblot, je metoda koja se u laboratorijskom radu koristi za razdvajanje i detekciju proteina (Mahmood i sur., 2012). Temelje metode predstavili su Towbin i njegovi suradnici 1979, koji su po prvi put koristili selektivna antitijela za detekciju proteina (Towbin, Staehelin i Gordon, 1979). Visoka specifičnost povezivanja antitijela i proteina od interesa omogućuje identifikaciju tog proteina u masi svih ostalih proteina (Ghosh i sur., 2014). Rezultati imunoblot metode mogu se interpretirati kvalitativno ili semi-kvantitativno (Kurien i Scofield, 2006). U ovoj metodi proteini se najprije razdvajaju gel elektroforezom temeljem razlike u masi i obliku proteina. Sljedeći korak je transfer proteina iz gela na membranu koja je izrađena od nitroceluloze ili PVDF (poliviniliden fluorid, ili poliviniliden difluorid) koja ima visok afinitet vezanja proteina (Towbin, Staehelin i Gordon, 1979). Vrlo je važno blokirati membranu, odnosno popuniti sva moguća mjesta vezanja proteina na membranu kako bi se onemogućilo nespecifično vezanje antitijela na membranu (Westermeier i sur., 2005). Proteini na membrani detektiraju se dodatkom antitijela, a razlikuje se direktna i indirektna metoda detekcije koje su shematski prikazane na slici 3. Kod direktne metode detekcije, proteinima se dodaje fluorofor-konjugirano primarno antitijelo koje ima enzimsku aktivnost i supstrat da bi se detektirao protein od interesa. Indirektna metoda zahtijeva primarno i sekundarno antitijelo te supstrat (Alegria-Schaffer, Lodge i Vatter, 2009). Primarno antitijelo se specifično veže za protein, a zatim se ono samo detektira enzimom ili fluorofor-konjugiranim sekundarnim antitijelom te supstratom. Prednosti korištenja indirektna metode zbog koje je češće korištena su amplifikacija signala, manji troškovi i kraća optimizacija procesa. Jedna od najčešće korištenih konjugiranih molekula je biotin, a od enzima to su peroksidaza hrena ili alkalna fosfataza. Detekcija je moguća zbog produkcije kemiluminiscentnog svjetla kao nusprodukta enzimske reakcije odgovarajućeg supstrata i antitijela s konjugiranim enzimom (Buchwalow, Minin i Boecker, 2005). Svjetlo se detektira rendgenskim filmom, dok se sve više koriste naprednije metode gdje se detekcija svjetla vrši digitalnim instrumentima koji skraćuju utrošeno vrijeme.

A**B**

Slika3. Shematski prikaz direktne metode detekcije (A) i indirektne metode detekcije (B) (Alegria-Schaffer, Lodge i Vatter, 2009).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije i enzimi

- agar - LioChem (Conyers, SAD)
- natrijev dodecil sulfat (SDS), akrilamid, agaroz, ampicilin, etidijev bromid, polietilenglikol (PEG) 4000, β - merkaptoetanol, Triton X – 100 - Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- pepton, baktotripton, – Becton Dickinson and Company (BD) (Franklin Lakes ,SAD)
- *Tag* DNA polimeraza, sve restrikcijske endonukleaze – New England Biolabs, (Ipswich, SAD)
- pufer za lančanu reakciju polimerazom (PCR), deoksiribonukleotidi, standardi za DNA elektroforezu - Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Ponceau S (PEG 4000) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- anti-HA-peroksidaza antitijela, higromicin B –Roche Diagnostic GmbH (Penzberg, Njemačka)
- ECL – otopina za razvijanje imunoblota, albumin goveđeg seruma (BSA) – (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, SAD)
- glukoza – Gram–Mol (Zageb, Hrvatska)
- Sve ostale kemikalije krutog agregatnog stanja koje su korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od proizvođača Acros Ogranic, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD), dok su kiseline i alkohol nabavljeni od proizvođača Carlo Erba (Milano, Italija)

3.1.2. Otopine i puferi

- TE pufer (10 mmol L^{-1} Tris, 1 mmol L^{-1} EDTA) ($\text{pH} = 8,0 - 7,4$) : pripravlja se iz 10 mL sterilne otopine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Tris-Cl pufera ($\text{pH} = 8,0 - 7,4$), 10 mL sterilne otopine $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ EDTA i 80 mL sterilne deionizirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4°C .
- litijev acetat ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$): pripravlja se otapanjem 1,02 g litijevog acetata u deioniziranoj vodi, a konačni volumen otopine iznosi 50 mL. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4°C .
- PEG – 4000 ($0,6 \text{ g mL}^{-1}$): pripravlja se otapanjem 0,6 g polietilenglikola – 4000 u deioniziranoj vodi, a konačni volumen otopine iznosi 1 mL. Kako bi se otopina sterilizirala i polietilenglikol-4000 u potpunosti otopio, otopina se prokuha 10 min.
- 50 x koncentrirani pufer TAE (2 mol L^{-1} Tris; 1 mol L^{-1} octene kiseline; 50 mmol L^{-1} EDTA): potrebno je otopiti 242 g u 600 mL deionizirane vode, dodati 57,1 mL ledene octene kiseline i 100 mL $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ EDTA ($\text{pH} = 8,0$). Naposljetku se dodatkom deionizirane vode konačni volumen otopine podesi na 1 L.
- Otopina etidijevog bromida za vizualizaciju DNA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$): osnovna otopina etidijevog bromida (5 g L^{-1}) razrijedi se u omjeru 1:10 000. Otopine je potrebno čuvati u tamnoj boci pri 4°C .
- K-fosfatni pufer (50 mmol L^{-1}): 4,128 g K_2HPO_4 i 0,177 g KH_2PO_3 otope se u deioniziranoj vodi, a konačni volumen iznosi 250 mL.
- Leammlu pufer za elektroforezu ($0,03 \text{ g mL}^{-1}$; $3,8 \text{ g L}^{-1}$ EDTA; $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ SDS; $0,4 \text{ mL mL}^{-1}$ glicerol; $0,25 \text{ mL mL}^{-1}$ β -merkaptotanol; $0,05 \text{ g L}^{-1}$ brom-fenol plavo): Pufer se pripravlja otapanjem 0,75 g Tris u 6 mL deionizirane vode te se pH vrijednost otopine podesi na 6,8 koristeći se HCL-om. Potom se doda 0,095 g EDTA, 2,5 g SDS 10 mL glicerola, 6,25 mL β -merkaptotanela i 1,25 mg brom-fenol plavo. Volumen otopine se potom podesi na 25 mL deionizirane vode.
- 10 x koncentrirani pufer za elektroforetsko razdvajanje proteina (30 g L^{-1} Tris; 144 g L^{-1} glicin 10 g L^{-1} SDS) : Priprema se otapanjem 30 g TRIS, 144 g glicina i 10 g SDS u 1000 mL deionizirane vode.
- Na-karbonatni pufer (1 g L^{-1} NaHCO_3 ; $0,33 \text{ g L}^{-1}$ Na_2CO_3): priprema se otapanjem 1 g NaHCO_3 i 0,33 g Na_2CO_3 u 200 mL metanola i 800 mL deionizirane vode.

- Pufer za blokiranje membrane (6g L^{-1} Tris; $\text{NaCl } 8,8\text{g L}^{-1}$; $0,001\text{ mL mL}^{-1}$ Triton X-100) ($\text{pH}=7,5$): Priprema pufera započinje otapanjem 3g Tris i $4,4\text{g}$ NaCl u 400 mL deionizirane vode. Nakon što se pH vrijednost otopine podesi pomoću HCL-a na $7,5$ doda se $0,5\text{ mL}$ Triton X-100 te se potom dodatkom deionizirane vode volumen otopine podesi na 500 mL .
- Otopina ampicilina (100g L^{-1}): 10 g ampicilina otopi se u deioniziranoj vodi, a konačni volumen otopine iznosi 100 mL . Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na -20°C
- Ponceau S boja ($0,1\%$ Ponceau S u 5% -tnoj očetnoj kiselini).

3.1.3. Hranjive podloge

Hranjiva podloga za uzgoj bakterije *E. coli* je kruta ili tekuća LB (Lysogeny broth) podloga. Kruta LB podloga sadrži 10g/L bacto-triptona, 5g/L kvašćevog ekstrakta, 5g/L NaCl i 15g/L agara. Tekuća LB podloga priprema se na jednak način, ali bez dodatka agara. Selekcija uspješno transformiranih bakterija radi se najčešće dodatkom selekcijskog markera u podlogu. Kao selekcijski marker za rast uspješno transformiranih bakterija *E.coli* korišten je antibiotik ampicilin. Ampicilin se dodaje u podlogu tako da koncentracija ampicilina u podlozi bude $50\mu\text{g/mL}$ podloge.

Hranjiva podloga za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* je YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose). Podloga se priprema dodatkom peptona 20g/L , kvašćevog ekstrakta 10g/L , glukoze 20g/L te agara 15g/L ukoliko se radi o krutoj podlozi, a ako se radi o tekućoj onda se agar ne dodaje. Kao selekcijski marker za uspješno transformirane stanice kvasca *S. cerevisiae* korišten je higromicin B koncentracije $0,3\text{mg/mL}$.

Tekuće podloge za indukciju mejoze kvasca *S. cerevisiae* koje su korištene su YPA (Yeast Extract Peptone Acetate) i SPII. Podloga YPA se priprema dodavanjem 5g/L kvašćevog ekstrakta, 10g/L bacto peptona, 10g/L kalijevog-acetata, $1,7\text{g/L}$ YNB pologe i 5g/L amonijeva sulfata. Nakon sterilizacije podlozi se doda 100mL otopine $0,5\text{M}$ kalij-ftalata pH $5,5$. Podloga SPII se priprema dodavanjem 20g/L K-acetata.

3.1.4. Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija koju smo koristili za transformaciju plazmidom pYM16 i umnažanje plazmida je *Escherichia coli*, DH5 α , genotipa F- Φ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk⁻, mk⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 reA1* (Life Technologies).

3.1.5. Soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Za sve eksperimentalne metode korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* soja SK1 *MATa/MATa ho::LYS2/ho::LYS2 ura3/ura3 lys2/lys2 leu2::hisG/leu2::hisG arg4-Nsp/arg4-Bgl his4x::LEU2-URA3/his4B::LEU2*

3.1.6. Oligonukleotidi

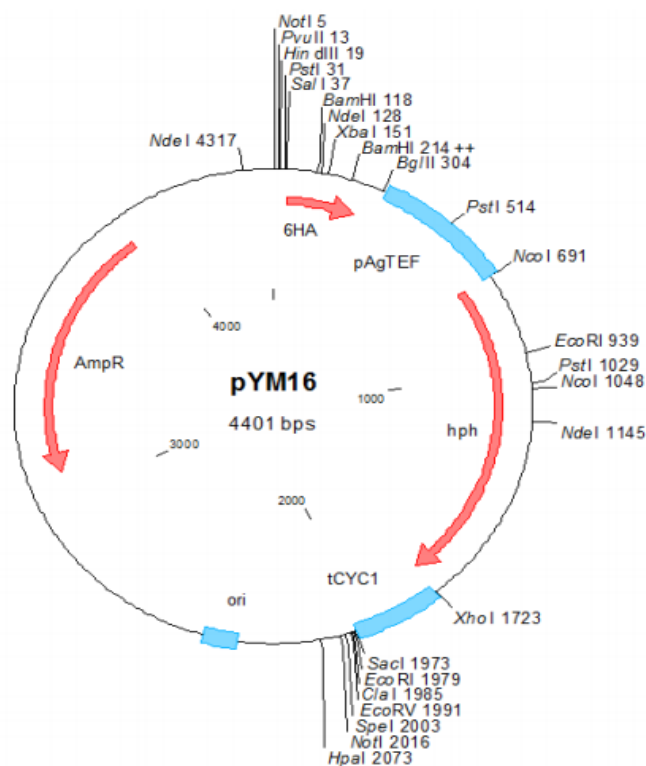
Početnice, odnosno oligonukleotidi korišteni su za dodavanje HA oznake na C terminalni kraj proteina Scw4 metodom PCR-a. Na razini genoma dodana je hemaglutininska sekvenca iza gena *SCW4* i dodavanje regije koja je odgovorna za rezistenciju na higromicin B koji služi kao selekcijski marker. Oligonukleotidi prikazani u tablici 4 su konstruirani kako je opisano u radu (Janke i sur., 2004).

3.1.7. Plazmid pYM16

Plazmid pYM16 je cirkularna dvolančana molekula DNA veličine 4401 parova baza. Plazmid sadrži regiju koja nosi rezistenciju na ampicilin, regiju sa rezistencijom na higromicin B te regiju za hemaglutininsku (HA) sekvencu kako je naznačeno na slici 4. Regije koje omogućuju rezistenciju na određeni antibiotik koriste se kao selekcijski markeri, a HA-oznaka služi za detekciju proteina anti-HA antitijelima imunoblot metodom. Ovaj plazmid je korišten za transformaciju bakterije *E.coli* te se PCR metodom umnožio dio tog plazmida kojim smo transformirali kvasac.

Tablica 4. Početnice korištene za umnažanje dijela plazmida pYM16 koji sadrži hemaglutininsku sekvencu te regiju odgovornu za rezistenciju na higromicin B.

Početnica- S2 Scw4HA	TAAATCAAGATTTTTTTTGTTTTTTTTACAATTGAGTAGACTTAAT CGATGAA <u>ATCGATGAATTCGAGCTCG</u> (50 baza prije stop kodona <i>SCW4</i> , ne uključujući stop kodon praćen sa ATCGATGAATTCGAGCTCG)
Početnica- S3 Scw4HA	GGTGCTTACGGTGTTGAAAAATACTGGGGTATTCTATCCAATGAAC <u>GTACGCTGCAGGTCGAC</u> (reverzan komplement 50 baza nakon stop kodona <i>SCW4</i> , uključujući stop kodon praćen sa CGTACGCTGCAGGTCGAC)



Slika 4. Regije plazmida pYM16. Crvenim strelicama su naznačene regije važne za ovaj rad, **AmpR**- regija za ampicilin, **6HA**- hemaglutininska sekvencu, **hph**- regija za higromicin B.

3.2. METODE

3.2.1. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli*

Protokol transformacije visoke efikasnosti (High Efficiency Transformation Protocol) postupak je kojim je provedena transformacija kompetentnih stanica *E. coli*. U 50µL otopine kompetentnih stanica dodaje 1µL plazmida koji odgovara oko 100pg-100ng molekule DNA. Smjesa se inkubira na ledu 30 minuta nakon čega slijedi temperaturni šok na 42 °C u trajanju od 30 sekundi. Nakon toga smjesa se stavlja u led na 5 minuta. Smjesi se dodaje hranjivi medij, SOC u volumenu od 950µL te se inkubira na sobnoj temperaturi 60 minuta. Nakon tog postupka, stanice se nacjepljuju na LB krutu podlogu s dodatkom otopine ampicilina. Na ploče se dodaje 50-100µL smjese nakon čega se stanice ravnomjerno rasporede po površini ploče te stave na inkubaciju na 37 °C 24 sata.

3.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije *Escherichia coli* („mini-prep“)

Postupak izolacije provodio se Monarch® Plasmid Miniprep Kit-om prema uputama proizvođača New England Biolabs, (Ipswich, SAD). Koncentracija izolirane plazmidne DNA izmjerena je spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na 260nm uporabom spektrofotometra. Uzorak plazmidne DNA prvotno se razrijedio 100 puta, na način da se 7µL plazmidne DNA dodalo u 700µL deionizirane vode.

Prema izrazu koncentracija se izračunava : $OD_{260} \times 50 \text{ ng/ul} \times \text{faktor razrjeđenja}$.

Vrijednost izmjerene aprosbancije, $OD_{260}=0,022$. Faktor razrjeđenja iznosi 100.

1 O.D. na 260nm za dvostruku DNA = 50 ng/ul dvostruke DNA.

$A_{260} : c(\text{ng/}\mu\text{L}) = 0,022 \times 50 \text{ ng/uL} \times 100 = 110 \text{ ng/uL}$

$c(\text{plazmidne DNA}) = 110 \text{ ng/uL}$

3.2.3. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima – restrikcijska analiza

Enzimi korišteni za restrikcijsku analizu plazmida pYM16 su restrikcijske endonukleaze BglI i HindIII (proizvođača New England Biolabs, (Ipswich, SAD).

3.2.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

U reakcijsku smjesu dodaju se redom komponente za PCR reakciju kao što je prikazano u tablici 5. Ukupan volumen smjese od 50 μL odnosi se na svaku zasebnu PCR epruvetu od 10 ukupnih. Protokol PCR reakcije prikazan je u tablici 6.

Tablica 5.

KOMPONENTE	Volumen/ μL
PCR pufer	5
10mM dNTPs (nukleotidi)	1
S2 Scw4 početnica	1
S3 Scw4 početnica	1
Tag polimeraza (DNA „tag“ polimeraza)	0,25
plazmidpYM16	0,5
H ₂ O	41,25
Ukupno	50

Tablica 6.

Koraci reakcije	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	95°C	1x 5min
Denaturacija	95°C	30x 30s
Sparivanje početnica	57°C	30x 30s
Sinteza DNA	68°C	30x 2min 30 s
Završna sinteza	72°C	1x 10min

Za taloženje produkata PCR-metode korišten je natrijev acetat (NaAc). Produktu PCR reakcije dodaje se 10% volumena NaAc i 2,5 volumena ohlađenog 100% etilnog alkohola. Smjesa se centrifugira 15 minuta brzinom 13 000 rpm-a na temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja talog se ispire 70% EtOH i suši. Nakon sušenja talog se otapa u 50 μL deionizirane sterilne vode.

3.2.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Gel koji se koristi za razdvajanje DNA molekula u električnoj struji je 0,8% agarozni gel. Gel se priprema otapanjem agaroze u TAE puferu kuhanjem, nakon što se sva agarozna otopila u TAE puferu, gel se hladi te se izliva u kalup gdje se i stvrdne. Elektroforeza se provodi u TAE puferu. DNA elektroforeza podešava se na način da jakost struje iznosi 0,19A te napon 85 V. UV svjetlo omogućuje vizualizaciju prethodno obojanog gela u etidij bromidu koji interkalira u DNA te su DNA molekule vidljive kao narančaste vrpce. Uspoređujući vrpce sa standardnom DNA određuje se veličina DNA molekula.

3.2.6. Transformacija kvasca LiAc metodom

Stanice kvasca odvajaju se od tekuće YPD podloge centrifugiranjem (2minute na 4000 rpm), talog se ispiri deioniziranom vodom i 0,1M litijevim acetatom (LiAc). Nakon ispiranja talogu sa stanicama kvasca dodaje se redom: 240 μ L 50% PEG-a, 36 μ L 1M LiAc, 8 μ L PCR produkta, 27 μ L H₂O, 5 μ L salmon sperm DNA, 33 μ L DMSO. Smjesu je potrebno vorteksirati 1 minutu, zatim inkubirati 30 minuta na 25 °C. Nakon toga slijedi temperaturni šok u trajanju od 20minuta na 42°C. Potom se uzorak ispiri u 200 μ L sterilne vode i stanice resuspendiraju u 5mL tekuće YPD podloge u Falcon epruveti te inkubiraju 3-4 sata u tresilici na 30°C. Potom se stanice odvoje od tekuće podloge centrifugiranjem 2 minute na 3000rpm-a, resuspendiraju u 1mL sterilne vode, 300 μ L takvog uzorka nanosi se na krutu YPD podlogu u koju je dodan higromicin B te se stanice ravnomjerno rasporede po površini podloge. Potrebno je zatim inkubirati stanice 3-4 dana na temperaturi od 30 °C da bi porasle kolonije transformiranih kvasaca.

3.2.7. Izolacija stanične stijenke kvasca

Stanice kvasca potrebno je uzgojiti na vrijednost oko 4 OD₆₀₀ jedinice u YPD podlozi i odvojiti od tekuće podloge centrifugiranjem 5minuta na 3000 rpm-a. Nakon odvajanja stanica koje se nalaze u talogu, potrebno ih je ispiri dva puta deioniziranom vodom na način da se stanice resuspendiraju u deioniziranoj vodi te centrifugiraju. Nakon ispiranja stanice je potrebno resuspendirati u 50mM K-fosfatnom puferu pH 8 (na 100 OD₆₀₀ jedinica stanica kvasca dodaje se 100 μ L pufera) i dodati staklene kuglice za razbijanje (oko 75-100% volumena suspenzije kvasca). Postupak razbijanja provodi se na uređaju BeadBug™ brzinom 4000 rpm-a tijekom 180

sekundi. Uzorak se potom centrifugira na 8000 rpm-a u trajanju 1 minute kako bi se staklene kuglice odvojile od ostalog sadržaja. Stanične stijenke se centrifugiranjem odvoje od ostalog staničnog sadržaja i ispiru četiri puta K-fosfatnim puferom pH 8.

3.2.8. Izolacija proteina stanične stijenke

Najprije se talog stijenki resuspendira u 500 μ L Leammli pufera i potom kuha 10 minuta u vrijućoj vodenoj kupelji. Nakon kuhanja potrebno je stijenke odvojiti od SDS ekstrakta, supernatant u kojem su proteini u SDS-u, naziva se ekstrakt SDS-1. Postupak se ponavlja nakon čega se stijenke ispiru četiri puta u K-fosfatnom puferu pH 8. Iz stijenki se zatim izoliraju kovalentno vezani proteini stanične stijenke. Kovalentno vezani proteini izoliraju se na dva načina, prvi je tretman stijenki 30mM NaOH, a drugi je tretman enzimom β -glukanaza. Prvi tretman uključuje ispiranje stijenki deioniziranom vodom i dodatak 30Mm NaOH (na oko 70 OD₆₀₀ jedinica doda se 100 μ L NaOH) te inkubacija sadržaja preko noći na 4°C. Nakon centrifugiranja proteini se nalaze u supernatantu i potrebno je neutralizirati otopinu proteina dodatkom klorovodične kiseline. Za izolaciju proteina enzimom β -glukanazom najprije se stijenke ispiru u 50mM TRIS-HCl puferu pH 7,4 te se resuspendiraju (na oko 75 OD₆₀₀ jedinica doda 100 μ L pufera). Uzorku se dodaje enzim glukanaza (4,5 IU/ μ L) te se uzorak inkubira na 37 °C u tresilici u trajanju od 2 sata. Nakon centrifugiranja proteini se nalaze u supernatantu koji se naziva ekstrakt β -glukanaze.

3.2.9. SDS-elektroforeza po Laemmli-u

Proteini izolirani iz stanične stijenke kvasca razdvajaju se postupkom SDS-elektroforeze po Laemmli-u. Uzorci se pripremaju dodavanjem 10 μ L Leammli pufera u 2 μ L SDS ekstrakta, dodavanje 5 μ L Leammli pufera u 15 μ L ekstrakta β -glukanaze te dodavanje 10 μ L Leammli pufera u 50 μ L NaOH ekstrakta. Nakon pripreme, uzorci se dodaju u jažice poliakrilamidnog gela. Dodano je 3 μ L proteinskog standarda, 12 μ L pripremljenog uzorka SDS-ekstrakta, 25 μ L pripremljenog NaOH ekstrakta i 10 μ L pripremljenog ekstrakta β -glukanaze. Poliakrilamidni gel sastoji se od dva gela, gornjeg gela za sabijanje i donjeg gela za razdvajanje. Donji 10% gel za razdvajanje priprema se dodatkom 2.4 mL 1,5 M TRIS-HCl puferu pH 8,8, 2.5mL akrilamida, 2.5mL vode, 5 μ L TEMED-a i 38 μ L APS-a. Gornji 4,5% gel za sabijanje se priprema dodatkom 2.5 mL 0,5 M TRIS-HCl puferu pH 6,8, 0.3 mL akrilamida, 5 μ L TEMED-a, 22.5 μ L APS-a. Gel je potopljen u pufer za elektroforezu sastava 25 mM TRIS-glicin pufer pH 6,8 i 0,1% SDS te je korišten uređaj za elektroforezu Sigma, (Aldrich). Napon iznosi 180V, a jakost struje je 400mA.

3.2.10. Western blot metodom

Nakon razdvajanja proteina u poliakrilamidnom gelu postupkom SDS-elektroforeze po Leammli-u proteini se prenose na nitroceluloznu membranu. Natrij-karbonatni pufer za transfer omogućuje prelazak proteina iz gela na membranu pomoću struje jakosti 400mA tijekom 90 minuta, a uređaj koji se koristi je Hoefer Pharmacia Biotech Inc. Nakon uspješnog transfera proteina na nitroceluloznu membranu proteini se bojaju crvenom bojom Ponceau S. Proteinski standardi se označavaju olovkom te se boja ispire deioniziranom vodom. Membrana se zatim inkubira na sobnoj temperaturi 45minuta u otopini dobivenoj otapanjem 0,2 g obranog mlijeka u prahu u puferu za blokiranje volumena 20mL (1% obrano mlijeko u prahu) da bi se zasitila sva mjesta na membrani i da ne bi došlo do neselektivnog vezanja antitijela na membranu. Nakon toga dodaje se 5μL antitijela na membranu u 10mL pufera za blokiranje. Inkubacija na tresilici i sobnoj temperaturi traje 6h. Nakon inkubacije membrana se ispire 3 puta s 10mL pufera za blokiranje svakih 10 minuta. Na membranu se zatim dodaje reagens za kemiluminiscenciju, otopina A volumena 400μL i otopina B volumena 400μL. Membrana se zatim stavlja u kazetu ispod rendgenskog filma (RTG) i ostavlja preko noći. RTG-film nakon ekspozicije tijekom noći razvija se ispiranjem RTG-filma u otopini razvijачa te nakon toga u otopini fiksira. Nakon toga na RTG filmu vidljive su karakteristične vrpce detektiranih proteina, dok se standardi označavaju ručno, flomasterom na RTG filmu, na mjestu gdje se nalaze na nitroceluloznoj membrani.

3.2.11. Induciranje mejoze i sporulacije

Prvoga dana potrebno je s krute YPD podloge precijepiti transformirane stanice kvasca u tekuću YPD podlogu volumena 5mL. Drugoga dana ujutro kada su stanice kvasca porasle u tekućoj YPD podlozi, pola volumena stanica tj. 2,5 mL dodaje se u 37,5 mL sterilne YPD podloge, dok se drugih 2,5mL dodaje u 37,5 mL sterilne tekuće podloge YPA. Poslijepodne istog dana porasli kvasci u YPD podlozi centrifugiraju se, mjeri im se OD₂₆₀, prethodno se ispiru deioniziranom vodom i zamrzavaju u smjesi leda i etilnog alkohola. Uzorak predstavlja stanice kvasca koji su porasle na YPD podlozi. Također neposredno nakon toga se 30 mL stanica kvasca u YPA podlozi prenosi u 250 mL sterilne YPA podloge. Trećeg dana mjeri se najprije OD₂₆₀ vrijednost koja u ovom dijelu eksperimenta mora iznositi od 4 do 6. Zatim se odvaja 40mL kvasaca u YPA podlozi, centrifugira, ispire vodom te se zamrzava na gore opisan način. Uzorak predstavlja stanice kvasca koje su porasle na YPA podlozi. Ostalih 240 mL YPA podloge sa kvascima

centrifugira se, ispire vodom te resuspendira u 240 mL SPII podloge. Resuspendirane stanice u 240 mL SPII podloge podjeli se u 6 tikvica, u svakoj tikvici po 40mL podloge s kvascima. Na SPII podlozi kvasac ulazi u mejozu i sporulira. Uzorci se uzimaju svaka 2 sata od trenutka stavljanja kvasaca u SPII podlogu zatim se centrifugiraju, ispiru deioniziranom vodom te se stanice resuspendiraju u vodi i na jednak način zamrzavaju. Prvi uzorak je 2 sata nakon prebacivanja te redom 4 sata, 6 sati, 8 sati i 10 sati, a zadnji uzorak je 24 sata nakon prebacivanja na SPII podlogu. Svi pohranjeni uzorci zamrznuti su na -20°C te su iz njih izolirani proteini stanične stijenke na gore opisan način.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

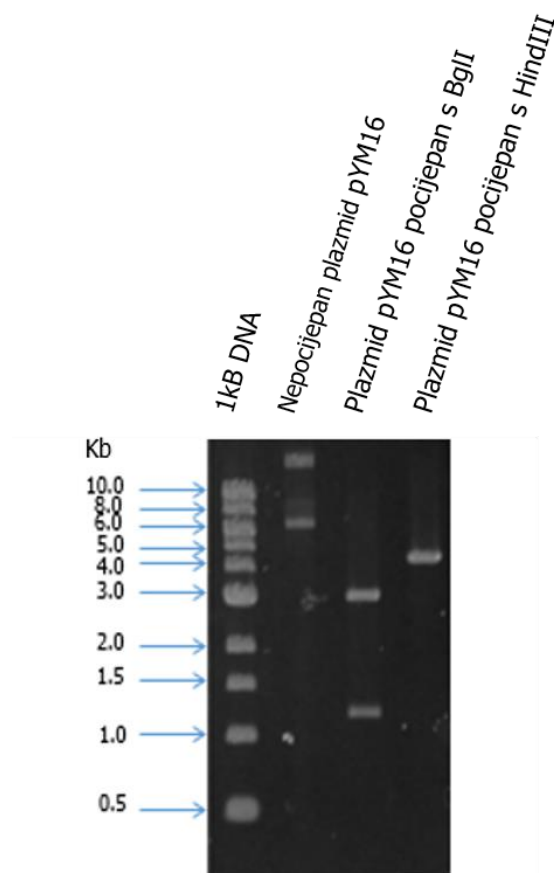
Cilj ovog završnog rada je uspješno obilježavanje proteina Scw4 u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* dodavanjem HA-oznake na C terminalni kraj proteina te specifično detektiranje navedenog proteina anti-HA antitijelima. Nakon uspješnog obilježavanja proteina u stijenci kvasca *S. cerevisiae*, inducirana je mejoza i sporulacija prebacivanjem kvasca na podlogu s nefermentabilnim izvorom ugljika te je analizirana ekspresija proteina Scw4 u procesu mejoze i sporulacije.

4.1.1. Umnažanje i provjera plazmida pYM16

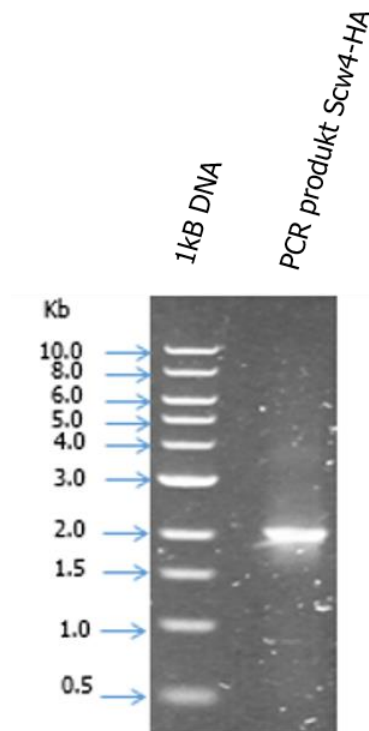
Nakon izolacije plazmida pYM16 iz bakterije *E.coli* korištenjem kita (Monarch® Plasmid Miniprep Kit) metodom koja je opisana u materijalima i metodama poglavlje 3.2.2., provjerena je prisutnost izoliranog plazmida pYM16 restrikcijskom analizom korištenjem restrikcijskih endonukleaza HindIII i BglI. HindIII je endonukleaza koja plazmid pYM16 cijepa na jednom specifičnom mjestu te se kao rezultat cijepanja dobiva linearizirani fragment veličine 4401 bp. BglI cijepa plazmid pYM16 na dva specifična mjesta dajući dva fragmenta, prvi je veličine 3150bp, a drugi 1251bp. Restrikcijska analiza potvrdila je da se radi o plazmidu pYM16 kao što se vidi na slici 5.

4.1.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančanom reakcijom polimerazom umnožen je dio plazmida pYM16 koji sadrži sekvencu zaslužnu za rezistenciju na antibiotik higromicin B te hemaglutininsku sekvencu. Korištenje početnica (tablica 4) rezultiralo je PCR produktom koji će nakon transformacije kvasca dati transformante kojem je HA-oznakom označen protein Scw4 na C terminalnom kraju te posjeduje rezistenciju na antibiotik higromicin koji služi kao selekcijski marker. PCR produkt veličine je oko 2000 pb kao što je vidljivo na slici 6 koja potvrđuje uspješno provedenu lančanu reakciju polimerazom.



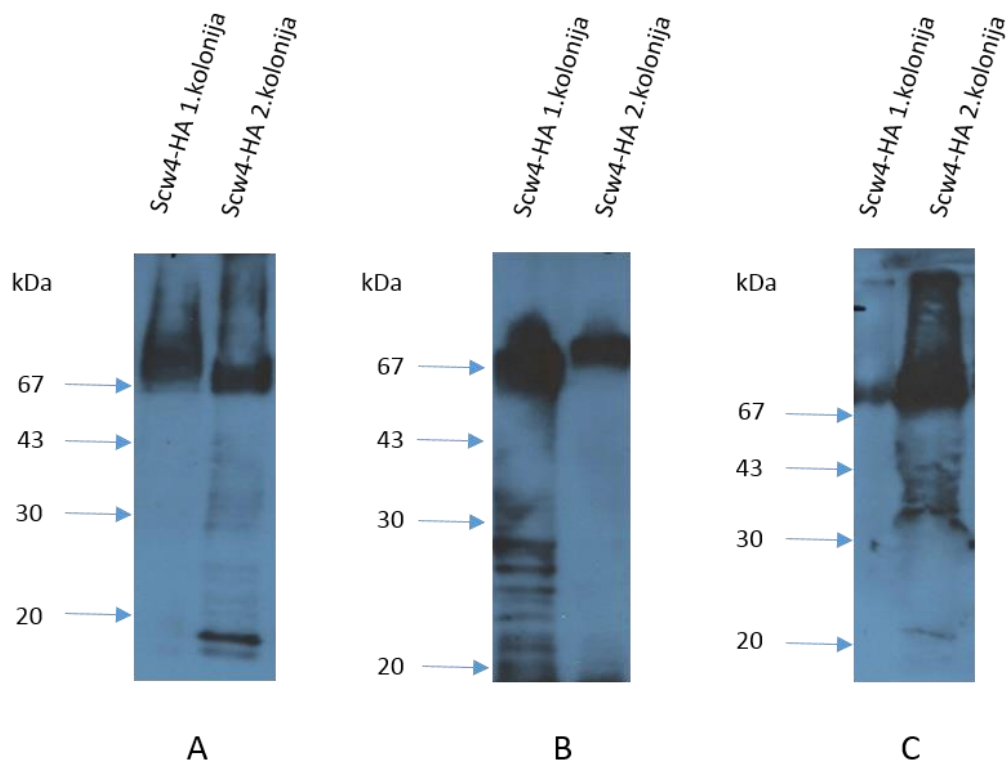
Slika 5. Restriksijska analiza plazmida pYM16.



Slika 6. Elektroforeza PCR produkta u agaroznom gelu.

4.1.3. SDS-elektroforeza i Western blot

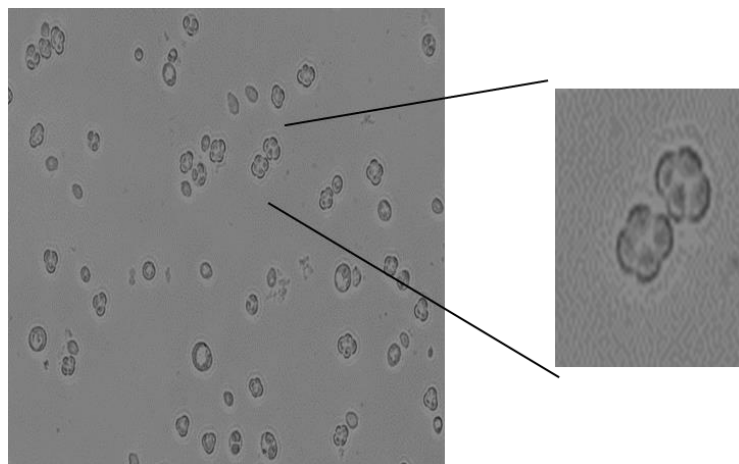
Kvasci su uzgojeni u tekućoj YPD podlozi do gustoće stanica oko 4 OD₆₀₀ jedinica te im je izolirana stanična stijenka i proteini stanične stijenke kao što je opisano u materijalima i metodama u poglavljima 3.2.7. i 3.2.8. Proteini su uspješno razdvojeni na poliakrilamidnom gelu, prebačeni na nitroceluloznu membranu te je potvrđeno da je HA- oznaka uspješno dodana na C terminalni kraj proteina Scw4 jer je detektiran korištenjem specifičnih anti-HA antitijela (slika 7 A, B i C). Ispitivanje dvije različite kolonije transformiranog kvasca rezultiralo je detekcijom proteina Scw4 u SDS, NaOH i glukanažnom ekstraktu (slika 7 A, B i C) što potvrđuje poznate činjenice kako se protein Scw4 veže u staničnu stijenku i nekovalentno i kovalentno (Teparić, Stuparević i Mrša, 2007).



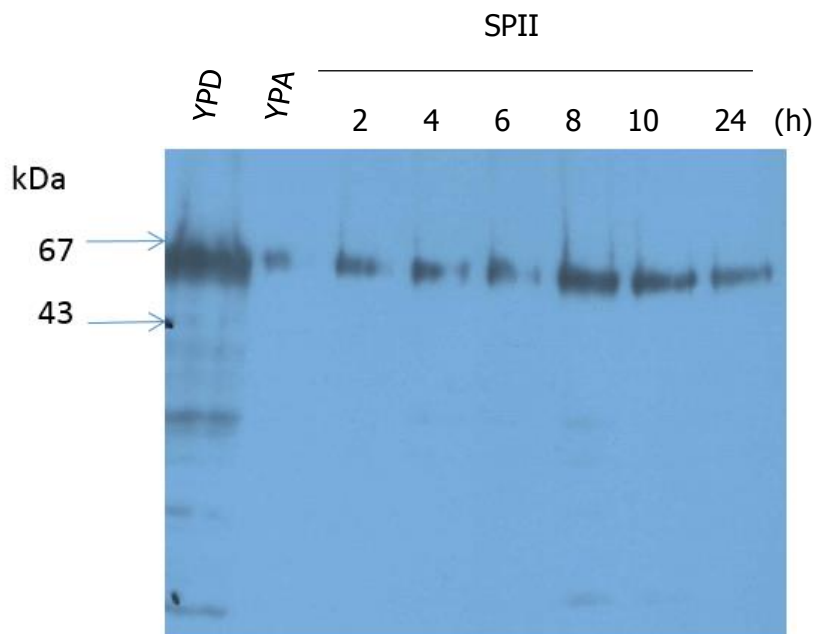
Slika 7. Scw4-HA **A)** SDS-ekstrakt, **B)** NaOH-ekstrakt, **C)** β -glukanazni ekstrakt.

4.1.4.Mejoza i sporulacija

24 sata od premještanja kvasca na SPII podlogu mikroskopiranjem je dokazana prisutnost spora te uspješnost indukcije sporulacije što pokazuju rezultati na slici 8. Uzorcima kvasaca je izolirana stanična stijenka i proteini stanične stijenke tretmanom vrućim SDS-om te su razdvojeni SDS-elektroforezom i detektirani Western blotom kao što je opisano u materijalima i metodama u poglavljima 3.2.7. i 3.2.8. Rezultati pokazuju prisutnost proteina Scw4 u mejozi i sporulaciji (slika 9) te u kvascu koji se razmnožava mitozom uzgojenim na YPD podlozi.



Slika 8. Vidljive spore 24 sata nakon premještanja na SPII podlogu.



Slika 9. Ekspresija proteina Scw4 na YPD, YPA te SPII podlogama. SDS-ekstrakt.

4.2. Rasprava

Široka primjena kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u tradicionalnim biotehnologijama (proizvodnja pekarskih proizvoda, piva, vina i drugih alkoholnih pića) učinila je kvasac vrlo zanimljivim, jeftinim i dostupnim mikroorganizmom i za temeljna znanstvena istraživanja (Grba, 2010). Sličnost kvašćevih biokemijskih procesa sa procesima viših eukariota i poznavanje ukupnog genoma kvasca olakšavaju istraživački rad brojnim znanstvenicima. Kratko generacijsko vrijeme, jednostavnost uzgoja, dobro proučen životni ciklus te jednostavnost genetičke manipulacije prednosti su kvasca nad ostalim modelnim organizmima. Razmnožavanje stanica kvasca odvija se pupanjem, procesom mitoze te nastaju stanica kćer i stanica majka koje ponavljaju proces pupanja (Herskowitz, 1988). Taj dio životnog ciklusa poznat je kao nespolni rast. Kada uvjeti postanu nepovoljni za nespolni rast, kvasac mejozom koja završava sporulacijom proizvodi spore u askusu koje omogućuju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (Neiman, 2011). Taj dio životnog ciklusa poznat je kao spolni rast. Promjena životnog ciklusa, primjerice prelazak iz nespolnog u spolni rast, uzrokuje brojne promjene koje se manifestiraju i na staničnu stijenku. Stijenka podilazi brojnim morfološkim i genetičkim promjenama, a neke od posljedica su smanjenje ili povećanje ekspresije određenih proteina (Haber, 1998). Upravo takve promjene u ekspresiji proteina stanične stijenke jedan su od glavnih interesa ovog rada. Stanična stijenka ekstracelularna je organela koja odvaja, ali i povezuje kvasac s okolišem, daje oblik i osigurava mehaničku i osmotsku stabilnost. Komponente stanične stijenke su ugljikohidrati i proteini, na kojih se odnosi 15-30% ukupne mase stanice kvasca (Orlean, 1997). Ugljikohidratne komponente čine β -1,3-glukani, β -1,6-glukani, hitin, dok proteinsku komponentu čine manoproteini (Fleet, 1991). Identificirano je više od 30 manoproteina koji su kovalentno ili nekovalentno povezani za staničnu stijenku, dok veći udio ukupnih manoproteina čine oni nekovalentno povezani. Funkcija većine manoproteina još uvijek nije poznata, stoga manoproteini i stanična stijenka predstavljaju veliko područje interesa u radu znanstvenika. Prema načinu izolacije određuje se način vezanja manoproteina za staničnu stijenku, stoga se tretmanom vrućim SDS-om izoliraju nekovalentno vezani proteini dok se kovalentno vezani proteini izoliraju tretmanima 30Mm NaOH ili β -glukanazom. Kako bi se protein Scw4 mogao detektirati, jedna od mogućnosti je obilježavanje proteina HA- oznakom, tj. dodavanjem hemaglutininske oznake na kraj gena *SCW4* kao što je opisano u poglavlju 3.2.6 Materijali i metode i radu Janke i suradnika iz 2004. Metoda detekcije označenog proteina u smjesi svih ostalih izoliranih proteina provodila se imunoblot metodom koristeći komercijalna anti-HA

antitijela nakon razdvajanja proteina SDS-elektroforezom (Towbin, Staehelin i Gordon, 1979), a rezultati detekcije prikazani u poglavlju 4.1.3 Rezultati i rasprava na slici 7. Protein Scw4 još uvijek je nepoznate biološke funkcije, a vezan je na stijenku nekovalentno i kovalentno (Teparić, Stuparević i Mrša, 2007). Rezultati ovog rada potvrđuju nekovalentno i kovalentno vezanje proteina Scw4 kao što je vidljivo na slici 7 u poglavlju 4.1.3 Rezultati i rasprava te isto tako potvrđuju od ranije objavljene rezultate istraživanja Teparić i suradnika iz 2007. Kod mutanata *scw4* nije zamijećena bitna fenotipska razlika, što otežava definiranje njegove biološke funkcije, međutim pretpostavlja se da protein Scw4 ima glukanaazu aktivnost kao i njegov homolog, protein Bgl2 (Šestak i sur., 2004). Kovalentno i nekovalentno vezanje ovisi o posttranslacijskom procesiranju proteina Scw4, procesiran Scw4 veže se kovalentno, dok se neprocesiran veže nekovalentno (Grbavac i sur., 2017). Rezultat prikazan u poglavlju 4.1.3 Rezultati i rasprava na slici 9 ukazuje na prisutnost neprocesiranog oblika proteina Scw4 u sporulaciji. Prema ovom rezultatu kao i ranije objavljenoj činjenici o kovalentnom i nekovalentnom vezanju proteina Scw4 u stijenku važno je napomenuti kako je u budućim istraživanjima nužno navoditi radi li se o procesiranom ili neprocesiranom obliku proteina Scw4. Mjesto kovalentnog vezanja još uvijek nije potvrđeno, ali se zna da ne dolazi do vezanja kao u slučaju Pir i GPI proteina (Mrša i Tanner, 1999), stoga je identifikacija regije proteina Scw4 koja se kovalentno veže područje intenzivnog istraživačkog rada. Drugo pitanje koje se ispitalo u ovom završnom radu je što se događa sa proteinom Scw4 prelaskom stanica kvasca iz mitoze u mejozu, tj. je li eksprimiran u mejozi i sporulaciji? Rezultati ovog završnog rada prikazani u poglavlju 4.1.3 Rezultati i rasprava na slici 9 potvrđuju prisutnost proteina Scw4 u mejozi i sporulaciji. Iz navedenih rezultata na slici 9 ne može se protumačiti dolazi li do smanjenja ili povećanja ekspresije proteina Scw4. Stoga bi buduća istraživanja ekspresije proteina Scw4 u sporulaciji morala uključiti pozitivnu kontrolu tj. protein koji je jednako eksprimiran u svim stadijima mejoze i sporulacije. Osim podataka u ovom radu ne postoje drugi podaci koji odgovaraju na pitanje o prisutnosti proteina Scw4 u mejozi i sporulaciji, ali postoje podaci o konstantnoj ekspresiji gena *SCW4* tijekom svih faza staničnog ciklusa, dok je ekspresija gena *SCW10* maksimalna u G1 fazi (Spellman i sur., 1998). Važnost ekspresije proteina Scw10 (homologa proteina Scw4) je u tome što je jedan od ta dva proteina dovoljan za normalno funkcioniranje stanica kvasca. Međutim kod mutanta *scw4scw10* zabilježeno je neuspješno parenje stanica kvasca, smanjen integritet stanične stijenke i povećana osjetljivost na inhibitore sinteze hitina (Šestak i sur., 2004). Iz tih razloga bi se u nastavku istraživanja mogla obratiti pažnja na prisutnost proteina Scw10 u mejozi i sporulaciji jer postoji mogućnost njihove zajedničke uloge u staničnoj stijenci kvasca *S. cerevisiae* tijekom tog životnog stadija.

5. ZAKLJUČAK

Protein Scw4 u staničnoj stijenci kvasca *S. cerevisiae* uspješno je obilježen dodatkom HA-oznake na C terminalnom kraju.

Scw4, koji je za stijenkku vezan nekovalentno i kovalentno, uspješno je detektiran u svim fazama životnog ciklusa kvasca (mitozi, mejozi i sporulaciji).

6. POPIS LITERATURE

Alegria-Schaffer, A., Lodge, A. and Vattem, K. (2009) Chapter 33 Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection. *Methods Enzymol* **463**: 99–573.

Blow, J. J. and Tanaka, T. U. (2005) The chromosome cycle: coordinating replication and segregation. *EMBO reports* **6**: 1028–1034.

Buchwalow, I. B., Minin, E. A. and Boecker, W. (2005) A multicolor fluorescence immunostaining technique for simultaneous antigen targeting. *Acta Histochemica* **107**: 143–148.

Bulik, D. A., Olczak, M., Lucero, H. A., Osmond, C., Robbins, P. W., Specht, C. A. and Osmond, B. C. (2003) Chitin Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Supplementation of Growth Medium with Glucosamine and Cell Wall Stress Chitin Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Supplementation of Growth Medium with Glucosamine and Cell Wall. *Society* **2**: 886–900.

Cappellaro, C., Mrša, V. and Tanner, W. (1998) New Potential Cell Wall Glucanases and Their Involvement in Mating. *Journal of Bacteriology* **180**: 5030–5037.

Castillo, L., Martinez, A. I., Garcerá, A., Elorza, M. V., Valentín, E. and 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.

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

Fleet, G.H., (1991) Cell wall. U: The Yeasts, Rose, A.H., Harrison, J.S., ur., Academic Press, str. 199-277.

Freese, E. B., Chu, M. I. and Freese, E. (1982) Initiation of Yeast sporulation by partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *Journal of Bacteriology* **149**: 840–851.

- Ghosh R., Gilda J.E., Gomes A.V. (2014) The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev. Proteom* **11**: 549–560
- Grba, S. (2010) Genetika kvasca i primjena genetičkih istraživanja u oplemenjivanju industrijskih sojeva kvasca. U: Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji., Svetec. I. K, Zgaga, Z., ur., Plejada, str. 39-69.
- Grbavac, A., Čanak, I., Stuparević, I., Teparić, R. and Mrša, V. (2017) Proteolytic processing of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein Scw4 regulates its activity and influences its covalent binding to glucan. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1864**: 507-515.
- Haber, J. E. (1998) Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet* **32**: 561-559.
- Hartland RP, Vermuelen CA, Klis FM, Sietsma JH, Wessels JG (1994) The linkage of (1-3)-b-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1591–1599.
- Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* **52**: 536–553.
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. and Knop, M. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947–962.
- Klebl, F. and Tanner, W. (1989) Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* **171**: 6259–6264.
- Klis, F. M., Boorsma, A. and De Groot, P. W. J. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185–202.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. and Stanley, B. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 56-239.
- Kurien, B. T. and Scofield, R. H. (2006) Western blotting. *Methods* **38**: 93-283.

Mahmood T, Yang P-C. (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **4**: 29-434.

Westermeier, R., et al. (2005) Blotting. In: Eletrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations, 4th ed., Wiley-VCH. str. 67–80.

Morris, G. J., Winters, L., Coulson, G. E. and Clarke, K. J. (1986) Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **132**: 2023–2034.

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

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

Mrša, V. and 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 (Chichester, England)* **15**: 813–820.

Neiman, A. M. (2011) Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **189**: 737–765.

O'Connor, C. (2008) Mitosis and Cell Division. *Nature education* **1**: 188

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

Orlean P. (1997) Biogenesis of yeast wall and surface components. U: Molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, Pringle J., Broach J., Jones E., ur., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 3. Cell cycle and cell biology, str. 229–362.

Pittet, M., Uldry, D., Aebi, M. and Conzelmann, A. (2006) The N-glycosylation defect of cwh8Δ yeast cells causes a distinct defect in sphingolipid biosynthesis. *Glycobiology* **16**: 155–164.

Šestak, S., Hagen, I., Tanner, W. and Strahl, S. (2004) Scw10p, a cell-wall

glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **150**: 3197–3208.

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

Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**: 3-41.

Talavera, N., Navarro, M., Boada-sucre, A. A. and Gonzalez, I. (2013) Green synthesis of nanosized vanadium pentoxide using *Saccharomyces cerevisiae* as biotemplate. *Recent Res. Devel. Mat. Sci* **10**: 89–102.

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

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

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

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350–4354.

Izjava o izvornosti

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

Josip Kordić

ime i prezime studenta