Dodavanje hemaglutininske sekvence iza gena NCW2 u genom kvasca Saccharomyces cerevisiae

Bernat, Miroslava

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:159:155264

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Nutricionizam

Miroslava Bernat

7026/N

Dodavanje hemaglutininske sekvence iza gena *NCW2* u genom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija

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

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Dodavanje hemaglutininske sekvence iza gena *NCW2* u genom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Miroslava Bernat, 0058206146

Sažetak:

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kompleksna je izvanstanična organela čije su glavne komponente ß-1,3 i ß-1,6-glukan te manoproteini pričvršćeni za glukansku mrežu. Struktura stanične stijenke mijenja se u različitim fazama životnog ciklusa kvasca kao što su mitoza, mejoza i sporulacija. Za protein Ncw2 pokazano je da sudjeluje u organizaciji ß-glukanske mreže u staničnoj stijenci kvasca, ali nije istražena prisutnost u mejotičkim i stanicama koje sporuliraju. Za identifikaciju i detekciju proteina razvijene su različite molekularno genetičke metode, a jedna od njih je dodavanje oznake na kraj proteina. Cilj rada bio je dodati oznaku na protein kako bi se detektirala njegova prisutnost tijekom mejoze i sporulacije. Konstruiran je soj kvasca kojemu je hemaglutininska sekvenca (HA) dodana iza gena *NCW2*, što omogućuje zajedničku translaciju proteina Ncw2 i dodane oznake. Takav konstrukt je detektiran koristeći antitijela za hemaglutininsku oznaku. Obilježavanje proteina ovim načinom bilo je uspješno, te je pokazana njegova stabilna ekspresija u mejotičkim i sporulirajućim stanicama.

Ključne riječi: *protein Ncw2, Saccharomyces cerevisiae, stanična stijenka*

Rad sadrži: 31 stranica, 8 slika, 3 tablica, 59 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

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

Datum obrane: 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

Adding hemagglutinin gene sequence behind *NCW2* into the genome of *Saccharomyces cerevisiae* yeast

Miroslava Bernat, 0058206146

Abstract:

Saccharomyces cerevisiae cell wall is complex extracellular organelle whose major components are ß-1,3 i ß-1,6-glucan and mannoproteins attached to glucan network. It is known that cell wall structure changes during different phases of yeast life cycle such as mitosis, meiosis and sporulation. It has been shown that Ncw2 protein takes part in ß-glucan network reorganization however his presence during meiosis and sporulation still has not been determined. The goal of this work was to tag Ncw2 which will enable us to detect his presence in meiotic and sporulating cells. The construct was made in which at genome level hemagglutinin sequence (HA) is downstream of ORF allowing a translational fusion of protein of interest to the HA tag. This technique enables us to track Ncw2 using specific antibodies. We have confirmed that this system provides efficient tagging and stable expression. Finally, we found that Ncw2 is present in mitotic, meiotic and sporulating cells.

Keywords: *cell wall, Ncw2 protein, yeast Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 31 pages, 8 figures, 3 tables, 59 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 S. cerevisiae 2

2.2. Životni ciklus kvasca 2

2.3. Stanična stijenka 3
2.3.1. Proteini stanične stijenke 5
2.3.2. Nekovaletno vezani proteini 6
2.3.3. Kovalentno vezani proteini 7
2.3.4. GPI proteini 8
2.3.5. Pir proteini 9

2.4. Ncw2 protein 9

2.5. 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 12
3.1.3. Plazmid pYM16 13
3.1.4. Soj bakterije 14
3.1.5. Soj kvasca 14
3.1.6. Hranjive podloge za uzgoj *E. coli* 14
3.1.7. Hranjive podloge za kvaščeve stanice 15

3.2. METODE 15
3.2.1. Transformacija E. coli 15
3.2.2. Izolacija plazmidne DNA 15
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA 15
3.2.4. Restrikcijska analiza plazmidne DNA 16
3.2.5. DNA elektroforeza 16
3.2.6. Konstrukcija početnica 16
3.2.7. Lančana reakcija polimerazom (PCR reakcija) 17
3.2.8. Transformacija kvasca 18
3.2.9. Izolacija proteina stijenke 18
3.2.10. SDS tretman stijenki 18
3.2.11. ß-1,3-glukanazni tretman stijenci 19
3.2.12. NaOH tretman stijenki 19
3.2.13. SDS-elektroforeza po Laemmli-u 19

3.2.14. Western blot 20
3.2.15. Indukcija mejoze 20

4. REZULTATI I RASPRAVA 20

4.1. Rezultati 20
4.1.1. Restrikcijska analiza 21
4.1.2. Provjera upješnosti PCR-a 22
4.1.3. Proteinska elekforeza i Western blot 22
4.1.4. Mejoza i sporulacija 23

4.2. Rasprava 25

5. ZAKLJUČAK 26

6. POPIS LITERATURE 27

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanični eukariotski organizam, a neki molekularni mehanizmi koji se odvijaju u kvascu slični su onima koji se dešavaju u viših eukariota. Odlikuje ga kratko generacijsko vrijeme te se s njime lako rukuje u laboratoriju, a poznat mu je i istražen čitav genom zbog čega je idealan modelni organizam za primjenu metoda genetičkog inženjerstva. Kvaščeve stanice sadrže staničnu stijenku koja je ekstracelularna organela i predstavlja prvi kontakt stanice kvasca s okolinom. Stanična stijenka daje stanici čvrstoću, oblik i doprinosi osmotskoj stabilnosti. Građena je od ß-1,3-glukana, ß-1,6-glukana, hitina te proteina koji su uklopljeni u glukansku mrežu (Fleet, 1991). Prilikom prelaska stanica kvasca iz jednog životnog ciklusa u drugi, primjerice iz mitoze u mejozu, dolazi do značajnih promjena u staničnoj stijenci. Mitoza je jedan od načina razmnožavanja kvaščevih stanica, to je nespolna dioba kojom nastaju pupovi iz kojih se razvijaju nove stanice kvasca. Uslijed nepovoljnih uvjeta u kojima se kvasac može zateći (npr. nedostatak nekih nutrijenata) on prelazi na drugi način razmnožavanja, mejozu. Mejoza je spolna dioba u kojoj kvasac sporulira odnosno proizvodi spore u askusu i u tom obliku preživljava nepovoljne uvjete. Tijekom prelaska stanica kvasca iz mitoze u mejozu mijenja se struktura stijenke i sastav glukanske mreže (Herskowitz, 1988). Zbog toga su neki proteini prisutni u stijenci i tijekom mitoze, mejoze i sporulacije, a neki nisu. Protein Ncw2 sudjeluje u organizaciji ß-1,6-glukana, dio je glukanske mreže koja izgrađuje staničnu stijenku (Elsztein i sur., 2016), a budući da se stijenka mijenja prelaskom stanice kvasca iz mitoze u mejozu postavlja se pitanje je li protein Ncw2 prisutan u stijenci te koja bi bila njegova uloga tijekom ovih procesa životnog ciklusa kvasca. Cilj ovoga rada bio je ispitati ekspresiju proteina u mejozi i sporulaciji. Provedeno je označavanje proteina umetanjem hemaglutininske sekvence iza gena koji kodira za taj protein. Umetanje hemaglutininske sekvence jedna je od metoda za označavanje kvaščevih gena (Janke i sur., 2004). Svrha označavanja bilo je lakše praćenje označenog proteina tijekom izolacija kao i provjera njegove prisutnosti tijekom mejoze i sporulacije. Proteini mogu biti vezani za staničnu stijenku nekovaletno i kovalentno. Nekovalentno vezani proteini izoliraju se vrućim SDS-om (Mrša i sur., 1997), a kovaletno vezani proteini se mogu izolirati različitim glukanazama te ekstrakcijom pomoću 30mM NaOH (Valentin i sur., 1984; Mrša i Tanner, 1999; Montijn i sur., 1994). Nije poznato je li protein Ncw2 vezan nekovalentno ili kovalentno pa se izolacijom označenog proteina iz stijenke na 3 načina, tretmanom s glukanazom, vrućim SDS-om i 30mM NaOH, ujedno ispitivao mogući tip vezanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac S. cerevisiae

Kvasac *S. cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam koji pripada carstvu fungi. Njegova svestrana uporaba duga je nekoliko tisuća godina i tijekom tog perioda se značajno mijenjala. Danas se koristi u industriji hrane i pića zbog mogućnosti fermentacije šećera u alkohol, farmaceutskoj industriji te u relativno mladoj inženjerskoj znanosti, biotehnologiji (Ostergaard i sur., 2000). Razlog primjenjivosti kvasca u biotehnologiji i genetičkom inženjerstvu očituje se u njegovoj osjetljivosti na genetske modifikacije primjenom tehnologije rekombinantne DNA. Dodatne prednosti su poznata genomska sekvenca kvasca, visoka efikasnost transformacije, kratko generacijsko vrijeme i niska cijena uzgoja. Danas, većinu toga što je poznato o strukturi, organizaciji i funkciji eukariotske stanice omogućeno je istraživanjem na kvascu *S. cerevisiae* koji predstavlja modelni organizam široko korišten za proučavanje starenja, regulacije ekspresije gena, prijenosa signala, staničnog ciklusa, metabolizma, apoptoze i mnogih drugih bioloških procesa koji se odvijaju u stanici (Karathia i sur., 2011). Provode se mnogobrojne usporedne studije sličnosti mehanizama staničnih procesa kvasca s drugim organizmima na temelju čega se validira u kojoj mjeri mehanizmi odvijanja procesa u drugim organizmima odgovaraju onima u kvascu. Prva izvješća o površinskom sadržaju stanica dobivena su istraživanjima na filamentoznim fag proteinima (Smith, 1985) te proteinima membrane *Escherichia coli* (Charbit i sur., 1986). Danas je kvasac *S. cerevisiae* gotovo potpuno zamijenio „neeukariotske" organizme kao što je *E. coli* u istraživanjima površinskih slojeva stanica, uključujući proteine membrane i stijenke. Mnogi stanični procesi kao što su proteoliza, procesiranje mRNA molekula, smatanje proteina, glikozilacija te disulfidna izomerizacija prikladnije su za istraživanje koristeći eukariotski organizam kao što je kvasac nego prokariotske organizme.

2.2. Životni ciklus kvasca

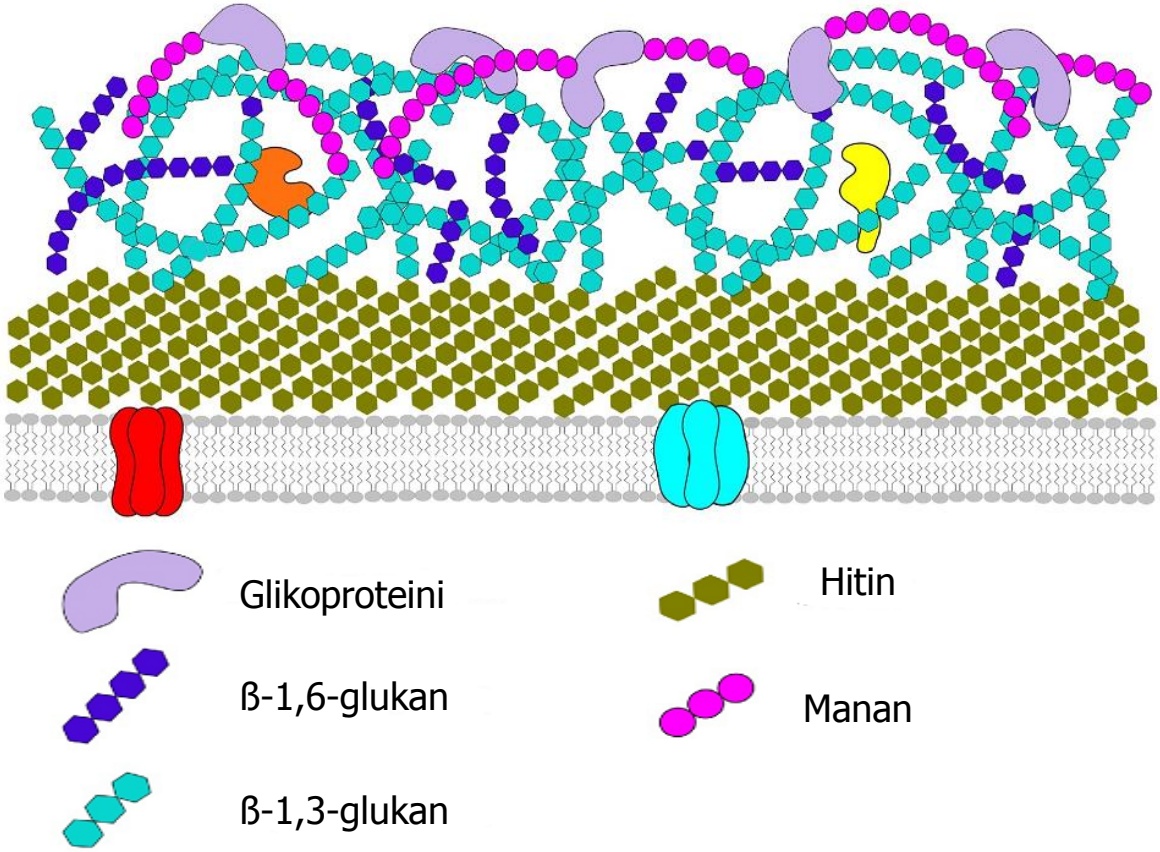
Životni ciklus kvasca čine dva različita procesa. Jedan je nespolno razmnožavanje, mitotička dioba kojom iz jedne stanice majke nastaju dvije identične stanice kćeri, koji se još naziva i pupanje jer su te stanice kćeri zapravo pupovi iz kojih se razvijaju nove stanice kvasca. Ovom tipu razmnožavanja podliježu haploidne i diploidne stanice u povoljnim uvjetima koji uključuju dovoljno kisika i nutrijenata te optimalnu temperaturu. Mehanizam je takav da se broj kromosoma haploidne stanice u S fazi ciklusa udvostruči i raspodijeli između dvije stanice kćeri (Pringle i Hartwell, 1981). Osim S faze stanični ciklus uključuje G1, G2 i M fazu. U G1 fazi kvaščeva stanica raste i povećava svoj volumen, u S fazi dolazi do replikacije DNA

molekule tj. udvostručavanja broja kromosoma, G2 faza uključuje daljnji rast i pripremu stanice za mitozu i citokinezu, a M faza (mitoza) kao posljednja u nizu rezultira dvjema zasebnim stanicama. Mitozu obilježava kariokineza i citokineza odnosno dioba jezgre i citoplazme (O'Connor, 2008). Stanice kvasca mogu biti a i alfa tipa parenja. Te su stanice haploidne i njihovim parenjem nastaje stanica a/alfa tipa parenja koja je diploidna stanica te tada može ući u proces spolnog razmnožavanja, mejozu (Herskowitz, 1988). Mejoza nastupa kada je kvasac okolišnim stimuliranjem odnosno uklanjanjem nekih faktora kao što su izvor ugljika ili dušika u stanju 'gladovanja'. Nedostatak nutrijenata rezultira proizvodnjom četiriju haploidnih spora koje su omotane u formu koja se naziva askus (Herskowitz, 1988). Na taj način kvasac preživljava nepovoljne uvjete, a kada ponovno nastupe povoljni, dolazi do razgradnje askusa te iz spora koje su haploidnog tipa ponovno nastaju novi kvasci mitozom i ciklus se ponavlja. Generacijsko vrijeme potrebno da se broj kvaščevih stanica udvostruči ovim načinom razmnožavanja iznosi oko 100 minuta (Herskowitz, 1988). Mejoza je ključan događaj spolnog života eukariota, a studije upućuju na slične mehanizme odvijanja mejoze u kvascu i višim eukariotima. Zbog te činjenice kao i drugih poznatih činjenica o kvascu kao što su kratko generacijsko vrijeme, jednostavnost repliciranja i izolacije mutanata te potpuno istražen genom, kvasac je idealan organizam za biološke studije primjenjujući tehnike genetičkog inženjerstva (Sherman, 1991).

2.3. Stanična stijenka

Stanična stijenka kvasca kompleksna je izvanstanična struktura i područje je interesa brojnih znanstvenika jer još mnogo toga o njoj nije razjašnjeno (Fleet, 1991; Klis, 1994; Stratford, 1994). Stijenka određuje morfološke karakteristike kvasca kao što su oblik i čvrstoća te doprinosi integritetu stanice tijekom staničnog rasta, dijeljenja i stresnih okolišnih uvjeta (Lesage i Bussey, 2006). Kvaščeve stanice mogu podnijeti visoke osmotske tlakove zahvaljujući čvrstoći stijenke (Teparić i Mrša, 1997). Sinteza, održavanje i pregradnja ove složene strukture zahtijevaju set različitih sintaza, hidrolaza i transglikozidaza čije usklađene aktivnosti osiguravaju potrebnu čvrstoću, ali u isto vrijeme fleksibilnost stanične stijenke. Stanična stijenka se u pravilu sastoji od oko 85% polisaharida i 15% proteina (Nguyen i sur. 1998), a njihova relativna količina može varirati ovisno o uvjetima i fazi rasta, soju kvasca i okolišnim uvjetima. 20% suhe mase kvasca *S. cereivisiae* čini stanična stijenka koja se sastoji od oko 50% ß-1,3-glukana, 5% ß-1,6-glukana, 35% manana i 1–2% hitina, a preostali dio suhe mase čine manoproteini (Fleet, 1991). Manoproteini su ugrađeni s vanjske, a glukan s unutarnje strane plazmatske membrane (Osumi 1998, 2012; Yamaguchi i sur., 2011). Navedene komponente stijenke slikovito su prikazane na slici 1. Najzastupljeniji polisaharid

stijenke je glukan koji služi kao sidrena skupina za proteine stanične stijenke i doprinosi osmotskoj stabilnosti. Glukanska mreža sastoji se od ß-1,3-glukan i ß-1,6-glukana. ß-1,3-glukan razgranati je polimer koji se sastoji od 1500 glukoznih jedinica s ß-1,6-međulančanim vezama na kojima se nalazi 50 glukoznih jedinica. Vezan je kovalentno na druge komponente stijenke. Svojim je nereducirajućim krajem vezan na reducirajući kraj hitina i slabom alkalnom vezom za O-glikozilirane manoproteine. Takav način vezanja smanjuje propusnost ß-1,3-glukana i učvršćuje stijenku u stresnim uvjetima (Popolo i sur. 1997; Osmond i sur. 1999). Amorfne strukture molekula ß-1,6-glukana nešto su manje zastupljene u stijenci od ß-1,3-glukana, djeluju kao ljepilo vezanjem na ß-1,3-glukan, hitin te manoproteine kovalentnim križnim vezama. ß-1,6-glukan se sastoji od 130 glukoznih ostataka s razgranatom okosnicom koja je ß-1,6 glikozidnom vezom bočnim ograncima povezana s glukoznim ostacima (Orlean i sur., 2012) što je katalizirano UDP ovisnim enzimom ß-1,6-glukan sintaze. Hitin je linearni polimer građen od oko 110 N-acetilglukozamina povezanih ß-1,4-glikozidnom vezom i njegova količina varira ovisno o uvjetima rasta. Formira mikrofibrile koje se stabiliziraju vodikovim vezama. Hitina u usporedbi s drugim polisaharidima u staničnoj stijenci ima najmanje, a koncentriran je u pupovima i septumu. Duljina linearnih lanaca hitina u stijenci i pupovima je procijenjena između 100 i 190 N-acetilglukozaminskih ostataka (Kang i sur., 1984). Reducirajući krajevi hitina vezani su za nereducirajuće krajeve ß-1,3-glukana i ß-1,6-glukana (Kollar i sur., 1995). Hitin je kristalne strukture i time pridonosi otpornosti istezanju stanične stijenke. Hitin tijekom pupanja učvršćuje vrat pupa i kreira primarnu pregradu između stanice majke i stanice kćeri (Roncero i Sanchez 2010; Bi i Park 2012). Manan je polimer koji se sastoji od jedinica manoze, a vezuje se za proteine u procesima O- i N glikozilacije stvarajući kemijski inertni vanjski štit koji osigurava poroznost stanične stijenke. Vezanje manana na proteine je postsintetska modifikacija koja određuje krajnju ulogu i lokalizaciju proteina.



Slika 1. Shematski prikaz građe stanične stijenke kvasca *S.cerevisiae* (Geoghegan i sur., 2017)

2.3.1. Proteini stanične stijenke

Većina proteina stanične stijenke nalazi se u formi manoproteina kojih je u stijenci identificirano 20ak, a većini je uloga još uvijek nepoznata (Mrša i sur., 1999). Većina ovih proteina sudjeluju u izgradnji, održavanju i reorganizaciji polisaharidne mreže, najviše glukana, doprinose hidrofobnosti stijenke te sudjeluju u procesima flokulacije i aglutinacije (Verstrepen i sur., 2003). Manoproteini podliježu O- i N glikozilaciji. N-glikozilacija uključuje vezanje oligosaharida N-glikozidnom vezom, između N-acetil glukozamina i asparaginskog ostatka proteina (Dean, 1999). Proces N-glikozilacije odvija se u endoplazmatskom retikulumu dok se O-glikozilacija odvija u Golgijevom tijelu (Dempski i Imperiali, 2002). O-glikozilirani proteini sadrže manozu vezanu α-manozil vezom na hidroksilirane bočne ogranke serinskih i treoninskih ostataka (Sentandreu i Northcote, 1968). Uloga O-manoziliranih proteina je jačanje strukture stijenke (Strahl-Bolsinger i sur., 1999). Glikozilacija kovalentno vezanih manoproteina doprinosi njihovoj ulozi u procesima zadržavanja vode, adheziji te virulenciji (De Groot i sur., 2005). Mutacije u procesima glikozilacije rezultiraju fenotipom koji

se odražava preosjetljivošću na stres i okolišne uvjete. Prema načinu kojim su proteini usidreni u stijenci postoje tri grupe proteina. Prva grupa obuhvaća proteine koji su za komponente stanične stijenke vezani nekovalentno. To su Scw (Solubile Cell Wall Protein) proteini i vezani su za ß-1,3-glukan. Druga grupa obuhvaća kovalentno vezane proteine preko ß-1,6-glukana na ß-1,3-glukan, a nazivaju se GPI proteini prema glikozil-fosfatidilinozitolnom sidru na C terminusu preko kojega se vežu za glukansku mrežu (Montijn i sur., 1994; Mrša i sur., 1997). Treću grupu čine proteini vezani esterskom vezom za ß-1,3-glukan i nazivaju se Pir proteinima koji su dobili naziv prema ponavljajućim regijama na N terminalnom kraju (Pir - Protein with internal repeats) (Mrša i sur., 1997; Toh-E i sur., 1993). Sekvencioniranjem N terminalnog kraja tih proteina pokazalo se da počinju sa homolognom sekvencom što je ukazivalo da bi mogli pripadati istoj porodici proteina.

2.3.2. Nekovaletno vezani proteini

Dva su načina izolacije nekovalentno vezanih proteina iz stanične stijenke. Jedan način je izolacija zagrijavanjem na temperaturi između 95-110°C tijekom 5-10 minuta u otopini SDS-a uz dodatak ß-merkaptoetanola (Mrša i sur., 1997.), a drugi podvrgavanje stanica tretmanu s 2 mM ditiotreitolom tijekom nekoliko sati. Na ove načine se izoliraju i proteini vezani disulfidnim vezama, što je potvrđeno analizom ekstrakata (Cappellaro i sur., 1998). Nekovalentno vezani proteini su u pravilu ravnomjerno raspoređeni u staničnoj stijenci i većinom O-glikozilirani (Cappellaro i sur., 1998) te čine 80% svih manoproteina. Jedan od proteina ove skupine kojemu je prvom razjašnjena primarna struktura jest Bgl2 (Klebl i Tanner, 1989) koji pokazuje endoglukanaznu i transglukanaznu aktivnost (Goldman i sur., 1995.) te homologiju s tri Scw proteina, Scw4p, Scw10p i Scw11p. Zbog toga se pretpostavlja da Scw proteini imaju ulogu u remodeliranju glukana, iako to još nije dokazano *in vitro* (Teparić i sur., 2010). Bgl2 katalizira reakciju vezanja nereducirajućeg kraja ß-1,3-glukana na reducirajući kraj ß-1,6-glukana. To pokazuje da bi mogao imati ulogu u uvođenju ß-1,6-veza koje uzrokuju grananja ß-1,3-glukana. Kod mutanata *bgl2* je uočena povećana sinteza hitina i preosjetljivost na tretman zimolijazom, Congo Red-om, Calcofluor White-om te smanjenja stopa preživljenja u odnosu na divlji tip (Lagorce i sur., 2003; Teparić i sur., 2004). Scw proteini su akumulirani u staničnoj stijenci i izvanstaničnom prostoru (Kalebina i sur., 2003). Scw4 i Scw10 prvi su detektirani od svih nekovalentno vezanih proteina izoliranih SDS-om (Cappellaro i sur., 1998). Ovi proteini mogu biti i kovaletno vezani za stijenku te se izolirati iz stijenke 30mM NaOH, postupkom koji je inače karakterističan za Pir proteine (Teparić, i sur., 2010; Yin i sur., 2005). Dijele 63% identičnih aminokiselina i sadrže mjesto za procesiranje proteazom Kex2, te su vjerojatni funkcionalni homolozi (R. Teparić i Mrša,

2013). Mutanti *scw4* i *scw10* nisu pokazivali značajne promjene u fenotipu (Cappellaro i sur., 1998; Sestak i sur., 2004). Kod dvostrukog mutanta (*scw4scw10*) uočena je smanjena stopa rasta, efikasnost parenja te sposobnost preživljenja (Cappellaro i sur., 1998; Renata Teparić i sur., 2004). Nadalje, u dvostrukom mutantu je došlo do povećanja koncentracije hitina i glukana te hiperosjetljivosti na spojeve Congo Red i Calcoflour White u odnosu na divlji tip (Cappellaro i sur., 1998; Sestak i sur., 2004). To je još jedna potvrda o sličnosti proteina Scw4 i Scw10 s glukanazama i transglukanazama (Šestak i sur., 2004). U tablici 1. su popisani nekovalentno vezani Scw proteini s pripadajućim funkcijama i njihovoj veličini u staničnoj stijenci.

Tablica 1. Neki od nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Scw-protein	**Funkcija**	**Veličina (kDa)**
Scw2p	Hitinaza	116
Scw3p	Homolog glukanazama	95
Scw4p	Homolog glukanazama	66
Scw6p	Egzoglukanaza	44
Scw8p	Nepoznata	41
Scw9p	Endoglukanaza	29
Scw10p	Homolog glukanazama	66
Scw11p	Homolog glukanazama	78

2.3.3. Kovalentno vezani proteini

Proteini koji zaostanu nakon tretmana vrućim SDS-om i ditiotreitolom u pravilu su kovalentno vezani. Mogu se izolirati liziranjem stanica primjenom različitih glukanaza kao što je zimolijaza ili laminarinaza (Valentin i sur., 1984; Montijn i sur., 1994). Na taj način se izoliraju GPI proteini vezani sidrom za ß-1,6-glukan koje je zaostalo uslijed prijenosa proteina iz plazmatske membrane u staničnu stijenku (Lu i sur., 1994; Kapteyn i sur., 1996; Kollar i sur., 1997). Druga grupa kovalentno vezanih proteina jesu Pir proteini koji se izoliraju iz stijenke uz pomoć 30mM NaOH (Mrša i Tanner, 1999), a to su: Ccw6, Cccw7, Ccw8 i Ccw5/Ccw11 (Ccw - Covalently bound cell wall proteins). Fiziološka uloga ovih proteina stanične stijenke još nije u potpunosti razjašnjena, no primjerice delecija gena koji kodiraju za Pir proteine čini stanicu osmotski nestabilnom, osjetljivom na toplinu (Toh-E i sur., 1993) i agense kao što su osmotin (Yun i sur., 1997) te Calcofluor White i Congo Red (Mrša i Tanner, 1999). S druge strane GPI proteini su manje više konzervirani u stanicama kvasca u usporedbi s drugim Pir i Scw proteinima pa se smatra da je njihova izloženost na površini stanice esencijalna te bi iz toga mogla proizlaziti i njihova uloga u procesima flokulacije i aglutinacije (Latgé, 2007).

2.3.4. GPI proteini

Na temelju brojnih studija 20-og stoljeća vezanje proteina preko glikozil-fosfatidilinozitolnog sidra utvrđeno je kao jedinstveni način vezanja proteina na plazmatsku membranu (Ovalle R i sur., 1998; De Sampaïo i sur., 1999; Ikezawa, 2001). Neki GPI proteini ostaju stalno vezani za plazmatsku membranu dok se većina njih podvrgava daljnjem procesiranju i kovalentnom vezanju na glukan stanične stijenke (Gonzalez i sur., 2009). Procjenjuje se da se u staničnoj stijenci nalazi oko 60 GPI proteina od kojih neki imaju ulogu u održavanju cjelovitosti strukture i oblika stijenke dok pospješuju staničnu adheziju (Lesage i Bussey, 2006). Jezgru sidra strukturalno čini kompleks glikofosfolipida. Sidro se sastoji se od etanolamin fosfata, trimanozida, glukozamina i inozitol fosfolipida, a posttranslacijski se veže za C terminalnu karboksilnu skupinu proteina (Ikezawa, 2002). U eukariotskim stanicama biosinteza prekursora sidra i vezanje sidra na C terminalnu karboksilnu skupinu odvijaju se u endoplazmatskom retikulumu uz komples GPI transamidaza (Ohishi i sur., 2001). Reakcija sinteze GPI proteina u endoplazmatskom retikulumu obuhvaća 12 koraka i simultano djelovanje 23 gena. Posljedica vezanja proteina putem sidra je mogućnost njihove izolacije nizom različitih endoglukanaza, kao što su laminarinaza ili zimolijaza (Gonzalez i sur., 2009). Dokazano je da delecija više GPI proteina (Ccw12p,Ccw13p, Ccw14p, Tip1p i Cwp1p) dovodi do smanjenja osmotske stabilnosti. Nekoliko GPI proteina ima enzimsku ulogu, djeluju kao fosfolipaze Plb1–Plb3 ili aspartil proteaze Yps1–Yps3 i Yps6, dok ostali posjeduju strukturnu ulogu (Yun i sur., 1997). GPI proteini imaju enzimsku ulogu u stvaranju i cijepanju glikozidnih veza tijekom životnog ciklusa stanice kvasca što utječe na procese formiranja pupova, diferencijacije stanica i parenja. Takva glukan remodelirajuća aktivnost je utvrđena za Gas1p koji pokazuje transglukozidaznu aktivnost. Gas1p protein važan je manoprotein koji sudjeluje u izgradnji i morfogenezi stanične stijenke (Conzelmann i sur., 1988; Nuoffer i sur., 1991). Osim njega za sve proteine GAS porodice kao i za Egt2p, Crh1p, Crh2 se pretpostavlja da imaju glukan remodelirajuću ulogu. Mnogi GPI proteini su izloženi na površini stanične stijenke i svojim domenama doprinose staničnoj adheziji stvaranjem biofilma. To su flokulini Flo1, Flo5, Flo9 i Flo11, seksualni aglutinini Sag1 i Aga1 te proteini semipauperin obitelji (Tir1-Tir4, Tip1, Dan1, Dan4) i svi oni imaju ulogu u flokulaciji (Verstrepen i sur., 2003). Širok raspon GPI-usidrenih proteina u staničnoj stijenci naznačuje da su funkcionalno raznoliki, ponašaju se kao hidrolitički enzimi, adhezijske molekule, regulatori komplementarnih proteina, receptori, itd.

2.3.5. Pir proteini

Pir proteini su druga grupa kovaletno vezanih proteina stanične stijeke. Način na koji su Pir proteini kovalentno vezani u staničnu stijenku obuhvaćajući dva mjesta vezanja razlikuje se od načina vezanja drugih usidrenih proteina. Jedno mjesto vezanja je ponavljajućom sekvencom na N terminusu stvarajući estersku vezu s ß-1,3-glukozom (Yang i sur., 2014). Drugo mjesto vezanja je disulfidnim mostovima preko cisteinskih ostataka na C terminusu. C terminus karakteriziraju četiri cisteinska ostatka na fiksnim pozicijama Cys-66aaCys-16aa-Cys-12aa-Cys-COOH (Abe 2003; Toh-E i sur., 1993). Pretpostavlja se da je barem jedno mjesto vezanja potrebno za ugrađivanje Pir proteina u stijenku (Castillo i sur., 2003). Pir proteine karakterizira sekvenca od 19 ponavljajućih aminokiselina s osam konzerviranih ostataka (S, Q, D, G, Q, Q, A, i T) na N terminusu po kojoj su dobili ime. Nakon izolacije proteina i usporedbe njihovih N-terminalnih sekvenci u bazi podataka kvaščevih proteina pokazalo se da se Pir obitelj sastoji od četiri proteina kodiranih pripadajućim genima: Pir1p/CCW6p, Pir2p/HSP150p/CCW7p, Pir3p/CCW8p, i Pir4p/CCW5p/ CCW11p/Cis3p (Mrša i sur., 1997; Yin i sur., 2005; van der Vaart i sur., 1995; Russo i sur., 1992; Castillo i sur., 2003; De Groot i sur., 2005; Toh-E i sur., 1993). Ti proteini dijele zajedničku homologiju i posjeduju signalni peptid, propeptid koji se procesira s proteazom Kex2 (Mrša i sur., 1999) u Golgijevom aparatu. Pir proteini sadrže hidroksilirane aminokiseline od kojih je većina O-glikozilirana (Mrša i sur., 1997). Uloga ovih proteina nije sasvim nepoznata, primjerice delecijom gena koji kodiraju za proteine Ccw5/Ccw11, Ccw6, Ccw7 i Ccw8 dolazi do promjena morfoloških karakteristika stijenke, nepravilnog rasta i oblika te povećane osjetljivosti na inhibitore koji utječu na sintezu stanične stijenke (Mrša i sur., 1997).

2.4. Ncw2 protein

U kvascu *S. cerevisiae* zabilježeno je više od 20 gena koji kodiraju za proteine stanične stijenke (CWPs tj. Cell Wall Proteins), a njihova koordinirana ekspresija predstavlja temeljni korak izgradnje funkcionalne stanične stijenke (Boorsma i sur., 2004; Lagorce i sur., 2003; Nobel i sur., 2000). Ukoliko dođe do narušavanja integriteta stijenke dolazi do pojačane ekspresije gena koji kodiraju za proteine stanične stijenke (CWP) što pokazuje da bi ti geni mogli imati regulatorni utjecaj na održavanje njenog integriteta (Boorsma i sur., 2004). Regulacija tih gena kontrolirana je PKC–SLT2 mehanizmom staničnog integriteta (CWI Cell Wall Integrity) (Boorsma i sur., 2004; Elsztein i sur., 2011; Nobel i sur., 2000). Utjecaj antifungalnog agensa poliheksametilen biguanida (PHMB) uzrokuje promjene u ekspresiji gena koji kodiraju za proteine stanične stijenke (Elsztein i sur., 2011). PHMB je kationski

polimer koji oštećuje staničnu stijenku kvasca, a za čiji su popravak odgovorni mehanizmi slt2p-PKC/CWI (Elsztein i sur.,2011; Elsztein i sur., 2008). PHMB izravno utječe i na protein Ncw2 (Novel Cell Wall protein) koji je jedan od CWP proteina čiji je tip vezanja za staničnu stijenku nepoznat kao i njegova fiziološka uloga (Elsztein i sur., 2016). Pretpostavlja se da je za membranu vezan GPI sidrom (Terashima i sur., 2000). Postoje neizravni dokazi o uključenosti ovog proteina u biogenezu i održavanje cjelovitosti stanične stijenke (Lagorce i sur., 2003). Delecijom gena *NCW2* i izlaganjem mutanata spojevima Calcuflour White i Congo Red nije se promijenila stopa rasta stanica kvasca u odnosu na divlji tip kvasca, pokazujući da protein Ncw2 nije zaslužan za toleranciju na ove spojeve (Elsztein i sur., 2016). S druge strane, izlaganjem kvasaca spoju PHMB došlo je do sedmerosturkog povećanja ekspresije gena *NCW2* (Elsztein i sur., 2016.). Izlaganjem mutanata spoju PHMB izazvalo je 47% manju stopu rasta stanica kvasca u odnosu na divlji tip kvasca. Pojačana ekspresija uočena je izlaganjem mutanata zimolijazi, a smanjena izlaganjem etanolu, H_2O_2, ditioetriolu (Gasch i sur., 2000) i sumpornoj kiselina (De Lucerna i sur., 2012). Prekomjerna ekspresija proteina Ncw2 je zabilježena u stanicama s deletiranim CWI genima *GAS1, MNN9, FKS1, KNR4 i KRE6* (Terashima i sur., 2000). Ovo otkriće ističe da je protein uz mehanizam slt2p-PKC /CWI djelomično zaslužan za toleranciju stanica kvasca na PHMB, a možebitno i dio CWI regulona odnosno da protein ima ulogu u održavanju integriteta stanične stijenke (Elsztein i sur., 2016). Stanice mutanta *ncw2* su otpornije na tretman zimolijazom u usporedbi sa stanicama divljeg tipa. Zimolijaza je kompleksna mješavina enzima s ß-1,3-glukanaznom aktivnosti (Ovalle R i sur., 1998), a povećana otpornost na taj spoj ukazuje na promjene u strukturi glukanske mreže. Sličnu otpornost na tretman zimolijazom pokazuju i GPI proteini kojima su mutirani geni *GAS1, GAS3* i *TOS1*. *GAS1 i GAS3* kodiraju za ß-1,3-glukanoziltransferaze koje stvaraju ß-1,3-glukanske veze (Orlean i sur., 2012), a *TOS1* kodira za kovalentno vezan protein još nepoznate funkcije. Ovi dokazi vode hipotezi da slično mutantima *gas1* i *gas3*, mutant *ncw2* uzrokuje redukciju ß-1,3-glukanske mreže što rezultira većoj toleranciji mutanata na tretman zimolijazom (Lussier i sur., 1997; Elsztein i sur., 2016). Uz sve navedeno smatra se da protein Ncw2 sudjeluje u organizaciji ß-glukanske mreže, a esencijalan je u popravku i toleranciji na oštećenja nastala na stijenci izazvana utjecajem PHMB i njime povezanim spojevima (Elsztein i sur., 2016).

2.5. Western blot metoda

Western blot ili imunoblot široko je korištena analitička metoda u područjima kao što su molekularna biologija, imunogenetika, kemija, biokemija i dr., za otkrivanje i analizu specifičnih proteina u uzorku tkiva ili ekstrakata (Towbin i Staehlin, 1979). Western blot

metoda temeljena je na principu Southern blot metode, a razlika između dviju metoda je u molekulama koje se detektiraju i analiziraju (Burnette, 1981). Metodom Southern blot detektiraju se DNA molekule, a Western blotom proteini. Razvijena je 1979. godine od strane Harry Towbina u institutu Friedrich Miescher u Švicarskoj (Towbin i Staehlin, 1979). Zahvaljujući Western blotu, znanstvenici su u mogućnosti identificirati specifične proteine iz složene mješavine proteina ekstrahiranih iz stanica. Tri su glavna koraka tehnike: (1) razdvajanje proteina po veličini (2) prijenos na čvrstu podlogu (npr. nitroceluloznu membranu) (3) obilježavanje ciljnog proteina upotrebom odgovarajućeg primarnog i sekundarnog antitijela za vizualizaciju (Mahmood i Yang, 2012). Prvi korak koji uključuje razdvajanje proteina po veličini može se provesti gel elektroforezom. Na ovaj način mogu se razdvojiti denaturirani proteini uz SDS-PAGE elektroforezu (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) ili nativni proteini prema 3-D strukturi. SDS-PAGE elektroforeza vrsta je proteinske gel elektroforeze gdje se prethodno denaturirane proteine uranja u SDS pufer čime postaju negativno nabijeni te se u polakrilamidnom gelu razdvajaju na temelju mase (Renart i sur., 1979; Towbin i sur., 1979). Općenito se proteini gel elektroforezom mogu razdvojiti prema izoelektričnoj točki, naboju, molekularnoj masi ili kombinacijom ovih čimbenika, a način razdvajanja ovisi o prethodnom tretiranju uzorka i vrsti gela za elektroforezu (Kurien i Scofield, 2009). Sljedeći korak je prijenos razdvojenih proteina s gela na čvrstu podlogu, najčešće je ta podloga nitrocelulozna membrana, ali može biti i polivinildien difluorid membrana (PVDF). Transfer proteina s gela na membranu obavljao se kapilarnim prijenosom, ali danas je gotovo u potpunosti zamijenjen korištenjem električne struje (Harper i Speicher, 2005). Učinkovitost prijenosa proteina s gela na membranu može se provjeriti bojanjem membrane s bojama Coomassie Brilliant Blue ili Ponceau S (Corley, 2005). Na membranu se potom nanosi primarno antitijelo koje se veže s ciljanim proteinom. Nakon primarnog dodaje se sekundarno antitijelo koje može biti radioaktivno označeno ili konjugirano s fluoresceinom ili peroksidazom te tako reagirati sa specifičnim dijelom primarnog antitijela tvoreći produkt imunološke reakcije. Na taj se način specifično označeni protein može detektirati autoradiografijom, UV svjetlom ili reakcijskim produktom peroksidaze uz pomoć fotosenzibilnog filma ili kamere. Ovime je omogućena istovremena detekcija proteina i kvantifikacija njegove ekspresije (Mahmood i Yang, 2012; Towbin i Staehlin, 1979).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije i enzimi

- Agar: Liofilchem (Conyers, SAD)
- Aminokiseline, SDS, akrilamid, agaroza, ampicilin, etidijev bromid, polietilenglikol (PEG) 4000, ß-merkaptoetanol, Triton X-100 - Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Kvaščev ekstrakt: Biolife (Milano, Italija)
- Pepton, baktotripton - Becton Dickinson and Company (BD) (Franklin Lakes, SAD)
- *Tag* DNA polimeraza, sve restrikcijske endonukleaze – New England Biolabs (SAD)
- Pufer za lančanu reakciju polimerazom (PCR), deoksiribonukleotidi, standardi za DNA elektroforezu - Fermentas, Thermo Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- Standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- Amonijev persulfat, N, N' metilenbisakrilamid, Triton X-100 – Fluka (Buchs, Švedska)
- N, N, N´, N´-tetrametil etilendiamin (TEMED), Ponceau S (PEG 4000) - Serva (Heidelberg, Njemačka)
- Anti-HA-peroksidaza antitijela, higromicin B - Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Njemačka)
- ECL - otopine za razvijanje imunoblota, albumin goveđeg seruma (BSA) – (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, SAD)
- Glukoza – Gram Mol (Zagreb, Hrvatska)
- Sve ostale kemikalije krutog agregatnog stanja koje su korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od proizvođača Acros Organics, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD), dok su kiseline i alkoholi nabavljeni od proizvođača Carlo Erba (Milano, Italija).

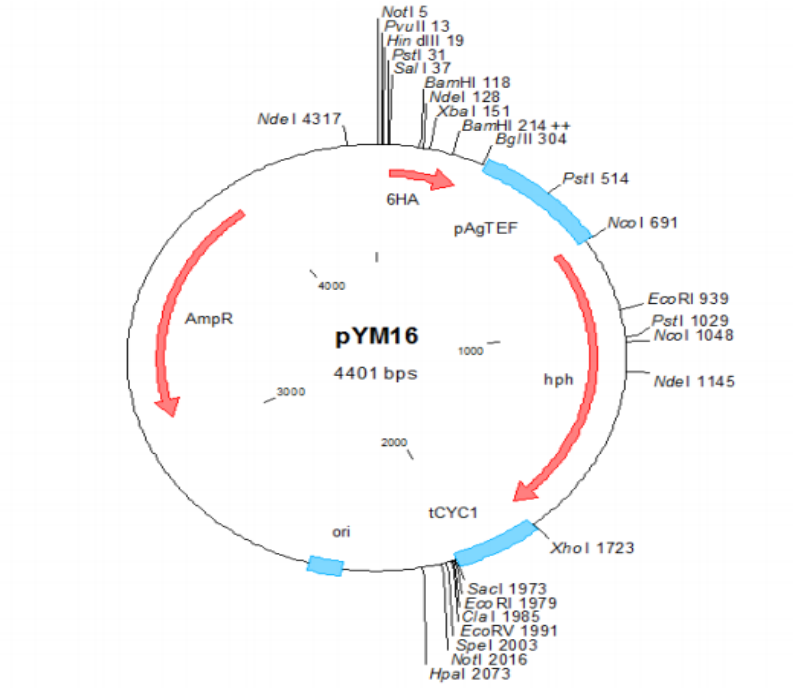
3.1.2. Otopine i puferi

- Litijev acetat (0,2 mol/L): pripravlja se otapanjem 1,02 g litijevog acetata u deioniziranoj vodi, a konačni volumen otopine iznosi 50 ml. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4°C.
- 50 x koncentrirani pufer TAE (2 mol/L Tris; 1 mol/L ocetene kiseline; 50 mmol/L EDTA): potrebno je otopiti 242 g u 600 ml deionizirane vode, dodati 57,1 ml ledene octene kiseline i 100 ml 0,5 mol/L EDTA (ph=8). Naposljetku se dodatkom deionizirane vode konačni volumen otopine podesi na 1L.

- Otopina etidijevog bromida za vizualizaciju DNA (0,5 mg/mL): osnovna otopina etidijevog bromida (5 g/L) razrijedi se u omjeru 1:10000. Otopine je potrebno čuvati u tamnoj boci pri 4 °C.
- K-fosfatni pufer (50 mmol/L): 4,128 g K_2HPO_4 i 0,177 g KH_2PO_4 otope se u deioniziranoj vodi, a konačni volumen iznosi 250 ml.
- Laemmli pufer (0,03 g/ml; 3,8 g/L EDTA; 9,1 g/ml SDS; 0,4 ml/ml glicerol; 0,25 ml/ml ß-merkaptoetanola i 1,25 mg brom-fenol plavo. Volumen otopine se potom podesi na 25 ml dodatkom deionizirane vode.
- 10x koncentrirani pufer za elektroforetsko razdvajanje proteina (30 g/L Tris; 144 g/L glicin; 10 g/L 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 $NaHCO_3$; 0,33 g/L g Na_2CO_3): priprema se otapanjem 1g $NaHCO_3$ i 0,33 g Na_2CO_3 u 200 ml etanola i 800 ml deionizirane vode.
- Pufer za blokiranje membrane (6 g/L Tris; NaCl 8,8 g/L; 0,001 ml/ml Triton X-100) (ph=7,5): Priprema pufera započinje otapanjem 3 g Tris i 4,4 NaCl u 400 ml deionizirane vode. Nakon što se pH vrijednost otopine pomoću HCl podesi na 7,5 doda se 0,5 ml Triton X-100, te se potom dodatkom deionizirane vode volumen podesi na 500 ml.
- Otopina ampicilina (100 g/L): 10 g ampicilina otopi se u deioniziranoj vodi, a konačni volumen otopine iznosi 100 ml. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 20 °C.
- Gel za proteinsku elektroforezu: 10% donji gel (Tris- HCl pufer 2,5 ml, akrilamid 2,5 ml, H_2O 2,5 ml, TEMED 5 µL, APS 38-45 µL); 4,5% gornji gel: (Tris-HCl pufer 2,13 ml, akrilamid 0,3 ml, TEMED 5 µL, APS 22,5 µL.

3.1.3. Plazmid pYM16

Plazmid pYM16 je cirkularna DNA molekula veličine 4401 parova baza. Sadržava hemaglutininsku (HA) oznaku, sekvencu koja se može umetnuti iza gena i na taj način obilježiti gen te regije za rezistenciju na antibiotike ampicilin i higromicin, slika 2. Regije koje omogućuju rezistenciju na antibiotik koriste se kao selekcijski markeri, a HA-oznaka služi za detekciju proteina anti-HA antitijelima Western blot metodom (Janke i sur., 2004).



Slika 2. Shematski prikaz sekvence plazmida pYM16. AmpR- regija za ampicilin, 6HA- hemaglutininska sekvenca, hph- regija za higromicin.

3.1.4. Soj bakterije

Korišteni soj bakterije *E.coli* jest DH5α, genotipa F- Φ80d*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(rk - , mk +) *pho*A *sup*E44 λ- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 (Life Technologies).

3.1.5. Soj kvasca

Korišteni soj kvasca *S. cerevisiae* jest SK1 *MAT***a**/*MATα ho::LYS2*/*ho::LYS2 ura3*/*ura3 lys2*/*lys2 leu2::hisG*/*leu2::hisG arg4-Nsp*/*arg4-Bgl his4x::LEU2-URA3*/*his4B::LEU2.*

3.1.6. Hranjive podloge za uzgoj *E. coli*

Bakterija *E. coli* je prije transformacije uzgajana na krutoj i tekućoj LB podlozi. Kruta LB podloga se priprema dodatkom bacto-triptona 10 g/L, kvaščevog ekstrakta 5 g/L, NaCl 5 g/L i agara 15 g/L. Nakon toga se sterilizira. Tekuća LB podloga se priprema na isti način samo bez dodatka agara. Nakon sterilizacije u tekuću podlogu se dodaje ampicilin u koncentraciji od 100µg/ml podloge. SOC je hranjiva podloga za uzgoj bakterije, priprema se dodatkom 2 mg bacto-triptona, 500 mg kvaščevog ekstrakta, 60 mg NaCl-a, 20 mg KCl-a, 200mg $MgCl_2$, 250 mg $MgSO_4$ x $7H_20$, 360mg glukoze i dopunjuje se destiliranom vodom do volumena od 100 ml.

3.1.7. Hranjive podloge za kvaščeve stanice

Kruta hranjiva podloga korištena za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* jest YPD odnosno YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose). Sastav: pepton 20 g/L, kvaščev ekstrakt 10 g/L, glukoza 20 g/L, agar 15 g/L. Tekuća podloga se priprema na isti način bez dodatka agara. Prije stvardnjavanja krute YPD podloge za selekciju kvasaca s rezistencijom na antibiotik higromicin, dodaje se higromicin do konačne koncentracije od 300µg/ml. YPA je podloga za indukciju predmejoze u kvascu, a priprema se dodatkom kvaščevog ekstrakta 5 g/L, bacto peptona 10 g/L, kalijev-acetata 10 g/L, YNB 1,7 g/L i amonijeva sulfata 5 g/L. Nakon sterilizacije se dodaje još 100 ml 0,5 M kalij-ftalata (ph=5,5). SPII je podloga za indukciju mejoze u kvascu, priprema se dodatkom kalijeva acetata 20 g/L.

3.2. METODE

3.2.1. Transformacija E. coli

Transformacija *E. coli* provedena je prema protokolu transformacije visoke efikasnosti. U 50 µL *E. coli* dodaje se 1 µL plazmida koji sadržava 100pg-100ng DNA. Smjesa se stavlja na led 30 minuta, nakon čega slijedi temperaturni šok (30 sekundi na 42°C). Potom se otopina stavlja u led 5 minuta, dodaje se 950 µL SOC podloge i ostavi na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. Nakon toga se 100 µL otopine nacjepljuje na selektivnu LB krutu podlogu s antibiotikom ampicilinom i inkubira na 37°C u trajanju od 24h.

3.2.2. Izolacija plazmidne DNA

Umnožavanje transformiranih stanica *E. coli* provedeno je u tekućoj LB podlozi sa 100 µg/ml ampicilina. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *E. coli* provodila se upotrebom seta Monarch® Plasmid Miniprep Kit prema uputama proizvođača.

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA

Apsorbancija uzorka s pročišćenom plazmidnom DNA se mjerila na valnoj duljini od 260 nm u UV-VIS području, uz pomoć spektrofotometra. U 7 µL pročišćene DNA plazmida dodaje se 700 µl sterilizirane deionizirane vode te se mjeri apsorbancija. Iz formule se tada izračuna točna koncentracija DNA prema izrazu:

OD_{260} x 50 ng/ul x faktor razrjeđenja
Vrijednost izmjerene apsorbancije OD_{260}=0,014.
1 O.D. na 260nm za dvostruku DNA = 50 ng/ul dvostruke DNA

Dobivena vrijednost koncentracije DNA uz faktor razrjeđenja 100 je:
A_{260} : γ=0,014 x 50 ng/uL x 100=70 ng/uL= 70 ng/µL

3.2.4. Restrikcijska analiza plazmidne DNA

U reakcijsku smjesu za provedbu restrikcije dodaje se 0,5 µl HindIII, 2 µl DNA (plazmid pYM16), 1 µl pufera sa BSA, 6,5 µL H_2O. Druga reakcijska smjesa sadrži 0,5 µl BglI, 2 µl DNA, 1 µl pufer 3 sa BSA i 6,5 µL H_2O. Zatim slijedi inkubacija uzoraka 2h, na temperaturi od 37°C.

3.2.5. DNA elektroforeza

U ovom radu korištena je horizontalna elektroforeza u električnom polju. Odvajanje DNA u gelu uključuje injektiranje DNA u jažice, stavljanje gela u Tris-EDTA pufer i puštanje struje. Struja se prilikom odvijanja DNA elektroforeze podešava na 0,19 A, a napon na 85 V. Osim uzorka DNA u jažice se stavlja boja bromfenol plavo te standardi. Uzorci putuju u gelu potopljenom u TAE puferu, a boja olakšava praćenje fronti i naznačuje kraj putovanja kada fronte doputuju do kraja gela. Nakon razdvajanja fragmenti DNA se vizualiziraju pomoću UV svjetla nakon bojenja etidij bromidom koji ima svojstvo da interkralira u DNA. Fragmenti DNA pod UV lampom vidljivi su kao narančaste crtice u gelu te se usporedbom sa standardom određuje njihova veličina.

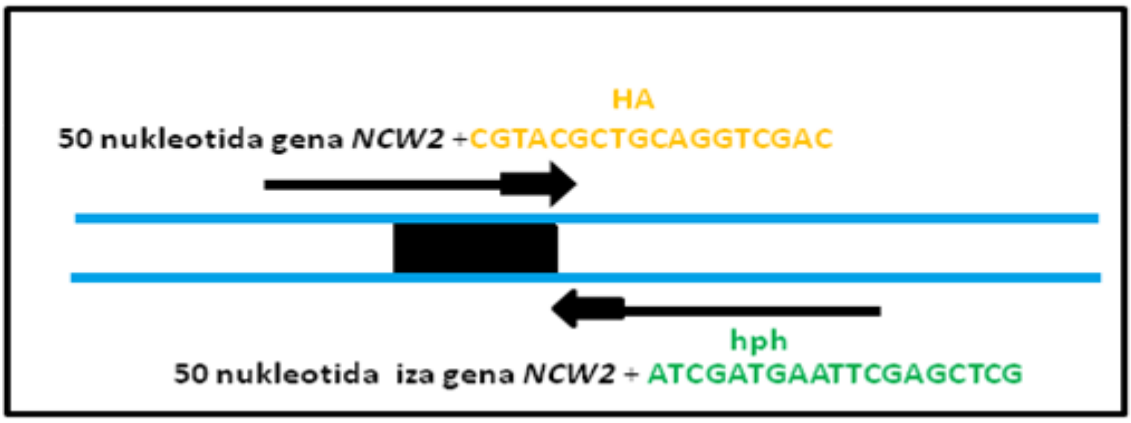
3.2.6. Konstrukcija početnica

Početnice za lančanu reakciju polimerazom kratki su oligonukleotidi koji se konstruiraju kako bi bili komplementarni početnom i krajnjem slijedu nukleotida koji se želi umnožiti. U ovome radu konstruirane su dvije početnice prema uputama u radu Janke i sur., 2004 (tablici 2. i slika 3.).

Tablica 2. Početnice korištene za umnažanje specifičnog dijela sekvence plazmida pYM16 koristeći PCR

Početnica 1) S2 Ncw2-HA	AATGCAGAACTATGTGGTGGTATACAGAACTGATTATACATTCTA ATCGATGAATTCGAGCTCG**<u>ATCGATGAATTCGAGCTCG</u>** (50 baza prije stop kodona, ne uključujući stop kodon praćen sa ATCGATGAATTCGAGCTCG)
Početnica 2)	ATAGCTTATGGTGCGGGTGCATTCGCCGTTGGTGCCCTTTTGTT ACGTA**<u>CGCTGCAGGTCGAC</u>**

S3 Ncw2-HA	(reverzan komplement 50 baza nakon stop kodona, uključujući stop kodon praćen sa CGTACGCTGCAGGTCGAC)



Slika 3. Konstrukcija početnica

3.2.7. Lančana reakcija polimerazom (PCR reakcija)

Lančana reakcija polimerazom, eng. Polymerase Chain Reaction (PCR) je metoda koja služi za *in vitro* amplifikaciju i odvija se u uređaju koji se naziva termo blok ili PCR mašina. Sastav reakcijske otopine za svaku od 10 epruveta koje ulaze u termoblok naveden je u tablici 3.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za PCR metodu

Otopine	Volumen u 50 µL reakcijske smjese
PCR pufer	5
10mM dNTPs (nukleotidi)	1
Enzim forward Ncw2	1
Enzim reverse Ncw2	1
Tag pol (DNA „tag"polimeraza)	0,25
Uzorak DNA	0,5
H_2O	41,25
Ukupno	50

Početno dolazi do denaturacije DNA molekule u trajanju od 5 min pri temperaturi 94-95°C. Daljnji koraci reakcije su a) denaturacija lanaca u trajanju od 30 sekundi pri 94-95°C čime se dobivaju jednolančani kalupi b) Komplementarno sparivanje početnica (50-65°C) u trajanju

od 30 sekundi na prethodno denaturirane lance c) Sinteza komplementarnog lanca DNA na temperaturi između 70-72°C na kojoj polimeraza ima maksimalnu aktivnost, u vremenu ovisnom o duljini fragmenta, 1kb/1min. Koraci a, b i c ponavljaju se 30 puta nakon čega se provodi još konačna sinteza u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 70°C. Metodom lančane reakcije polimerazom umnaža se slijed nukleotida u plazmidu koji odgovara higromicinskom markeru i hemaglutininskoj oznaci, tzv. produkt PCR reakcije. Taloženje produkta PCR-a provodi se natrijevim acetatom. Određenom volumenu otopine DNA tzv. PCR produktu dodaje se 1/10 volumena NaAc i 2,5 volumena hladnog 100% EtOH. Sadržaj se centrifugira 15 minuta na 13000 rpm na temperaturi od 4°C. Supernatant se odlije, a talog DNA se ispire sa 70% EtOH i otapa u 50 µL sterilne vode.

3.2.8. Transformacija kvasca

Nakon centrifugiranja kvasca i ispiranja taloga LiAc-om na talog se dodaje: 240 µL 50% PEG-a, 36 µL 1M LiAc, 8 µL PCR produkta, 27 µL H_2O, 5 µL salmon sperm DNA, 33 µL DMSO. Smjesa se vorteksira 1 minutu te inkubira 30 min na 25°C. Slijedi temperaturni šok na 42°C, 20 minuta te ispiranje taloga u 200µL sterilne vode. Nakon centrifugiranja talog se resuspendira u 5 ml tekuće YPD podloge i takav se uzorak prebaci u falkon epruvetu te inkubira 3-4 sata u tresilici na temperaturi od 30°C. Nakon centrifugiranja (2 minute na 3000 rpm) talog se resuspendira u 1 ml sterilne vode. 300 µL takvog uzorka se nanese na hranjivu krutu YPD podlogu s higromicinom u koncentraciji od 300 µg/ml. Inkubacija je trajala 3 dana na temperaturi od 30°C.

3.2.9. Izolacija proteina stijenke

Nakon uzgoja stanice kvasca se odvoje od podloge centrifugiranjem 5 min na 3000 rpm, ispiru 2x destiliranom vodom i resuspendiraju u 500 µL 50 mM K-fosfatnom puferu pH 8. Stanice se razbijaju dodakom staklenih kuglica (·1/2 volumena suspenzije stanica) u trajanju od 180 sekundi korištenjem BeadBug™ uređaja, a postupak razbijanja ponavlja se 3 puta. Nakon toga se odvajaju staklene kuglice, a stijenke i stanični ekstrakt centrifugiraju 1 min, na 8000 rpm. Na kraju se talog stijenki ispire 4 puta s 500 µL 50 mM K-fosfatnim puferom pri pH 8.

3.2.10. SDS tretman stijenki

Talogu stijenki nakon izolacije dodaje se volumen od 500 µL Laemmli pufera (50mM TRIS-HCl pufer pH 6.8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 0,001% bromfenol plavo i 5% betamerkaptoetanol). Uzorak se u epruveti kuha 10 minuta u vrijućoj vodenoj kupelji. Centrifugiranjem se odvaja

supernatant koji se pohranjuje kao prvi uzorak SDS-om izoliranih proteina. Ponavljaju se prethodna tri koraka te se talog stijenki ispire 4 puta s 50 mM K-fosfatnim puferom, pH 8. Talog sadržava proteine koji se nisu izolirali tretmanom SDS-om.

3.2.11. ß-1,3-glukanazni tretman stijenci

Talog izoliranih proteina nakon tretmana SDS-om ispire se u 1000 µL 50 mM TRIS HCl pufera pH 7,4 i potom resuspendira u istom puferu (75 OD u 100 µl pufera). Dodaje se 2 µL glukanaze, a inkubacija se provodi 2 sata na 37°C u tresilici. Uzorak se nakon toga centrifugira, ispire u sterilnoj vodi te se supernatant u kojemu su proteini izolirani glukanazom sprema na -20°C.

3.2.12. NaOH tretman stijenki

Uzorak izoliranih proteina nakon tretmana SDS-om se ispire sterilnom vodom. Resuspendira se u 50 µL 30 mM NaOH. Inkubacija se odvija preko noći na 4·C. Sljedeći dan uzorak se centrifugira i odvaja se supernatant koji se neutralizira s 1 M HCl. Supernatant se pohranjuje kao proteini izolirani nakon NaOH tretmana.

3.2.13. SDS-elektroforeza po Laemmli-u

Proteinskom elektroforezom nakon izolacije staničnih stijenki provjeravamo sadržaj proteina u ekstraktima. Provodi se SDS-elektrofroeza po Laemmli-u. Uzorci se pripremaju dodavanjem Laemmli pufera sastava 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 10% glicerol, 0,001% bromfenol plavo i 5% β-merkaptoetanol u svaki pojedini ekstrakt. U jažice gela za proteinsku elektroforezu injektiraju se sljedeći volumeni:

1) Ekstrakt SDS 2 µL + 10 µL Laemmli pufera
2) Ekstrakt ß-glukanaze 15 µL + 5 µL Laemmli
3) NaOH ekstrakt 50 µL + 10 µL Laemmli pufera

(ukoliko je potrebno za neutralizaciju se dodaje 1 µL Tris-HCl pufera)

Proteinska elektroforeza se provodi u uređaju za proteinsku elektroforezu (Sigma Aldrich), upotrebljeni gel za izolaciju proteina je poliakrilamidni, a sastoji se od dva sloja. Jedan sloj predstavlja gornji 4,5% gel za sabijanje, a donji 10% gel je gel za razdvajanje. Svrha gela za sabijanje je koncentrirati sve proteine prije ulaska u gel za razdvajanje u jednu liniju kako bi se proteini pravilno razdvojili. Gelovi s uzorcima uranjaju se u pufer za elektroforezu (25 mM TRIS-glicin pufer pH 6,8, 0,1% SDS) u kadici za elektroforezu. Na takav sustav priključuje se izvor napajanja uz uvjete reakcije: napon od 180 V i struja 400 mA. Vrijeme razdvajanja proteina je oko 75 minuta.

3.2.14. Western blot

Nakon završene elektroforeze proteini se iz poliakrilamidnog gela prenose na nitroceluloznu membranu. Prijenos je proveden u karbonatnom puferu uz stalnu jakost struje od 400 mA i napon 180 V u uređaju za transfer tijekom 120 minuta. Nakon završenog transfera nitrocelulozna membrana je obojana bojom Ponceau S (0,1% Ponceau S u 5%-tnoj ocetnoj kiselini) kako bi standardni postali vidljivi. Obojeni standardi označuju se grafitnom olovkom, a boja ispire destiliranom vodom. Nitrocelulozna membrana se ostavlja preko noći na +4 °C u puferu za blokiranje (50 mM TRIS-HCl pufer pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) uz dodatak 1% obranog mlijeka u prahu radi zasićenja membrane proteinima. Potom se membrana inkubira 6h na sobnoj temperaturi uz dodatak antitijela (anti-HA). Zatim se membrana ispire 3 puta s 5 ml pufera za blokiranje svakih 15 minuta, a nakon toga se dodaju supstrati za antitijelo koji s njime reagiraju dajući svjetlosni signal koji se otiskuje na fotosenzibilan film. Vrijeme ekspozicije je 24h.

3.2.15. Indukcija mejoze

YPD podloga sadržava sve nutrijente potrebne stanicama kvasca za normalan rast. Na toj podlozi se broj kvaščevih stanica povećava mitozom. 2,5 ml uzorka transformiranih kvasaca s YPD podloge se prenosi u 37,5 ml nove YPD podloge. Drugih 2,5 ml transformiranih stanica kvasca iz YPD podloge se prenosi u 37,5 ml YPA podloge koja priprema stanice kvasca za mejozu. Nakon toga se uzima 40 ml YPD podloge s poraslim kvascima, mjeri se OD_{260}, centrifugira, ispire s vodom i sprema za izolaciju proteina stanične stijenke. Rezultat je YPD uzorak poraslih kvasaca. 30 ml poraslih kvasaca u YPA podlozi prenosi se u 250 ml nove YPA podloge. Uzorku s YPA podloge se mjeri OD_{260} koji mora iznositi između 4 i 6. Odvoji se 40 ml uzroka s YPA podloge u falkon epruvetu, centrifugira, ispire vodom i sprema za izolaciju proteina. Rezultat je YPA uzorak poraslih kvasaca. 240 ml transformiranih kvasaca s YPA podloge se centrifugira i ispire vodom te resuspendira u 240 ml SPII podloge u kojoj dolazi do mejoze i sporulacije. Uzorak se podijeli u 5 epruveta te se svaka dva sata uzima jedan uzorak, centrifugira, ispire u vodi i nakon toga sprema na temperaturu od -80 °C.

4. REZULTATI I RASPRAVA

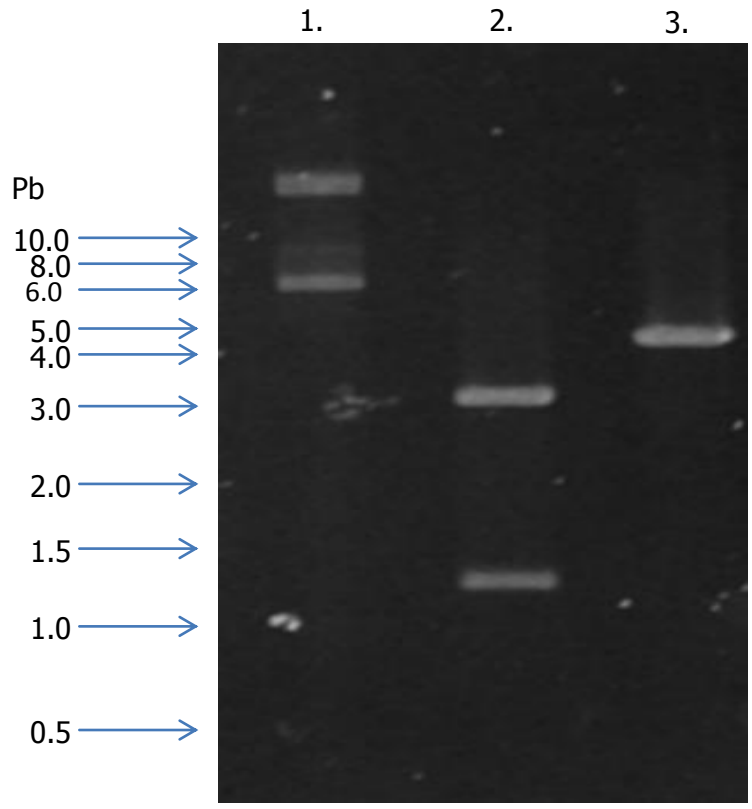
4.1. Rezultati

Cilj ovoga rada bio je obilježavanje gena *NCW2* hemaglutininskom sekvencom i umetanje takvog konstrukta u genom kvasca *S. cerevisiae*. Hemaglutininska sekvenca i sekvenca koja nosi rezistenciju na higromicin amplificirane su iz plazmida pYM16 PCR-om te se dobivenim

produktom PCR-a transformirao kvasac u svrhu dobivanja proteina iza kojega se nalazi sekvenca HA. Uspješnost obilježavanja proteina provjeravala se dodatkom specifičnih (anti-HA) antitijela koja su reagirala s oznakom (HA) dajući kao produkt imunološke reakcije svjetlosni signal koji se otisnuo na film. Tako obilježenom proteinu ispitivala se razina ekspresije tijekom mejoze i sporulacije. Restrikcijska analiza, DNA elektroforeza, lančana reakcija polimerazom te izolacija proteina stanične stijenke zajedno s proteinskom elektroforezom i Western blotom metode su koje su prethodile formiranju zaključaka o proteinu Ncw2 u skladu s ciljem rada.

4.1.1. Restrikcijska analiza

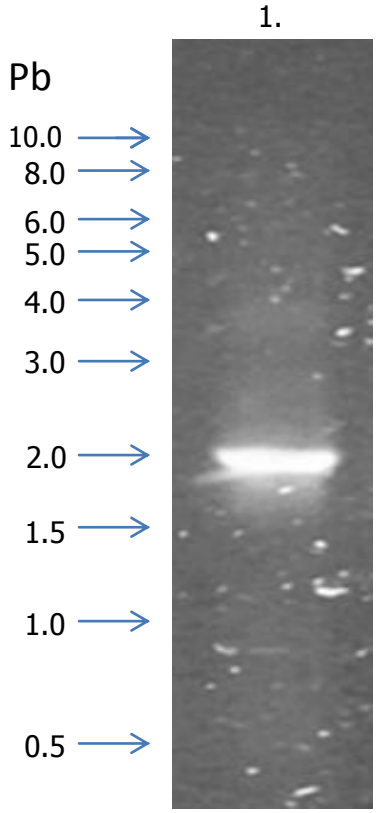
Restrikcijskom analizom s dva enzima, BglI i HindIII provjeravalo se je li proučavani plazmid pYM16. BglI je restrikcijska endonukleaza koja cijepa plazmid na dva mjesta dajući dva fragmenta. HindIII cijepa plazmid pYM16 na jednome mjestu, dajući linearizirani fragment. Na 0,8% agaroznom gelu nakon DNA elektroforeze vidljive su dvije vrpce veličine 1000 i 3000 parova baza (pb) kod uzorka koji je porezan restrikcijskom endonukleazom BglI te jedna kod onog pocijepanog s HindIII veličine 4000 pb (slika 3.). Time se potvrdilo da je plazmid koji se koristi u daljnjem radu pYM16.



Slika 4. Provjera uspješnosti cijepanja vektora pYM16 s restrikcijskim enzimima HindIII i BglI. 1. kružni plazmid pYM16; 2. plazmid pocijepan s BglI; 3. plazmid pocijepan s HindIII.

4.1.2. Provjera upješnosti PCR-a

Sekvenca plazmida pYM16 koja sadrži hemaglutininsku oznaku i rezistenciju na antibiotik higromicin umnožena je lančanom reakcijom polimerazom (PCR) uz pomoć dviju početnica (Janke i sur., 2004). Uspješnost PCR reakcije se provjeravala DNA elektroforezom. Na 0,8% agaroznom gelu je nakon provedene elektroforeze vidljiva vrpca veličine oko 2000 parova baza, što odgovara veličini izoliranog fragmenta iz plazmida (slika 4.). To je potvrda uspješne PCR reakcije.

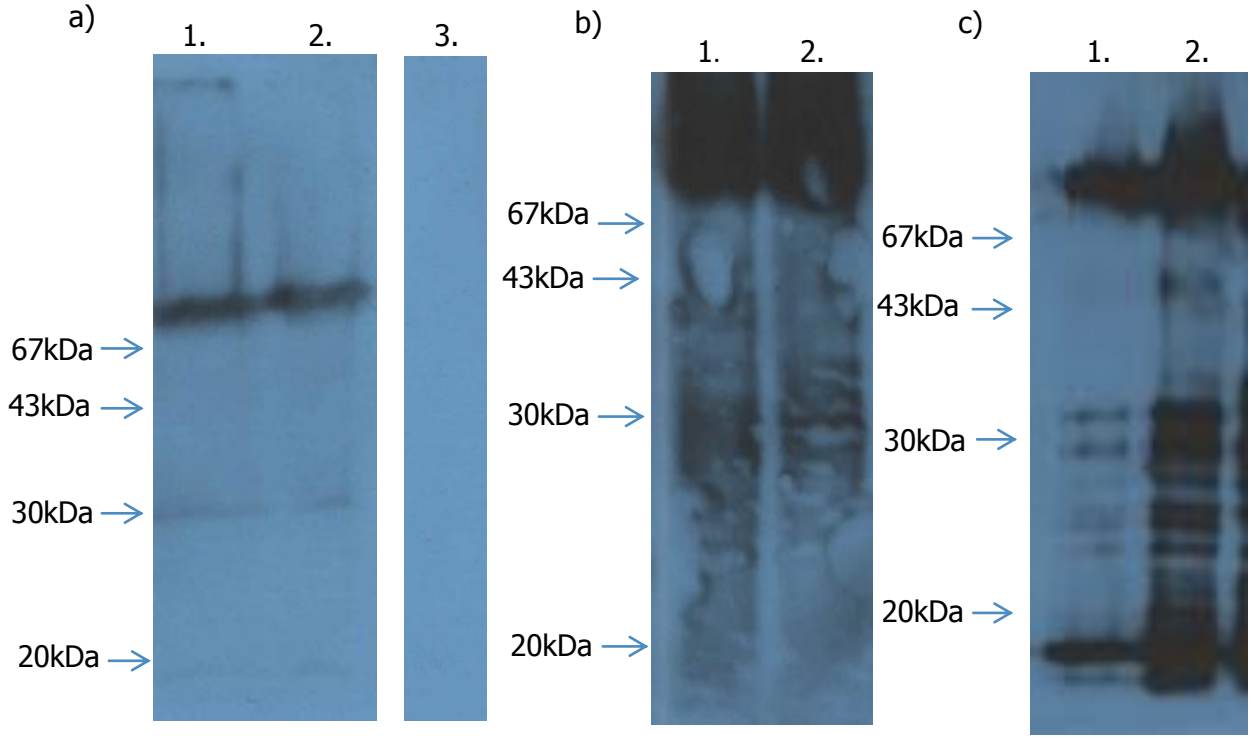


Slika 5. Provjera uspješnosti PCR-a DNA elektroforezom 1. fragment Ncw2-HA

4.1.3. Proteinska elekforeza i Western blot

Konstrukt s HA sekvencom ubačen je u genom kvasca transformacijom. Nakon transformacije se očekuje da se na C terminusu proteina nalazi hemaglutininska oznaka. Detekcija proteina koji ima vezanu HA oznaku je moguće jer specifična antitijela reagiraju s oznakom dajući kao produkt imunološke reakcije kemiluminiscirajuću svjetlost kojom je omogućena vizualizacija proteina. Rezultati prikazani na slici 5. potvrđuju uspješnost vezanja

oznake za protein u staničnoj stijenci transformiranog kvasca. U uzorku u kojemu protein nije bio označen hemaglutininskom sekvencom nije se pojavila karakteristična vrpca jer antitijela (anti-HA) nisu imala s čime reagirati (slika 5. a). U sva tri ekstrakta vidljiv je signal (slika 5. a, b, c), a ekstrakti glukanaze i NaOH (slika 5. b i c) rezultirali su dodatnim vrpcama koje su posljedica nespecifičnog vezanja antitijela uslijed prevelike količine uzorka. Pojava vrpci uz to što pokazuje uspješnost označavanja sugerira i tip vezanja proteina za staničnu stijenku. Budući da se ne zna je li protein za stijenku vezan kovalentno ili nekovalentno (Elsztein i sur., 2008) na temelju ovoga rezultata može se pretpostaviti da je protein za stijenku vezan i kovalentno i nekovalentno jer su u sva tri ekstrakta vidljive vrpce.

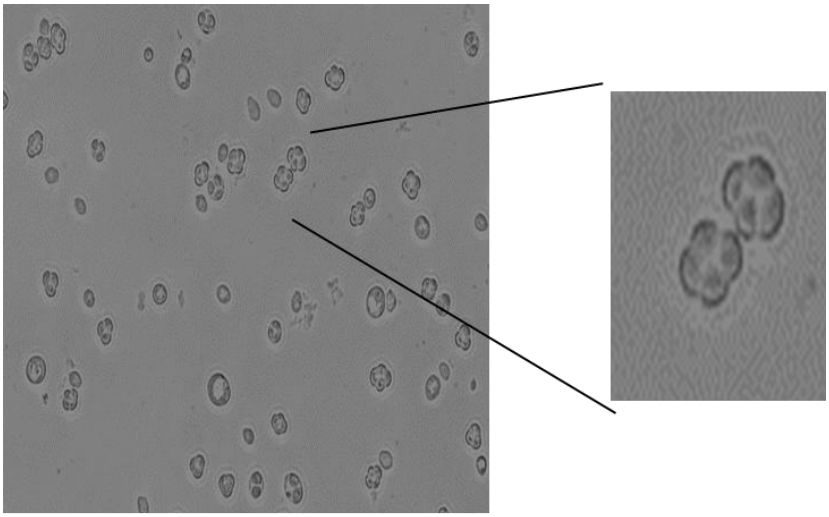


Slika 6. a) SDS ekstrakt b) ß-glukanazni ekstrakt c) NaOH ekstrakt. Western blot analiza proteina Ncw2-HA nakon izolacije s vrućim SDS-om. 1. Ncw2-HA 1. kolonija; 2. Ncw2-HA 2. kolonija; 3. kontrola.

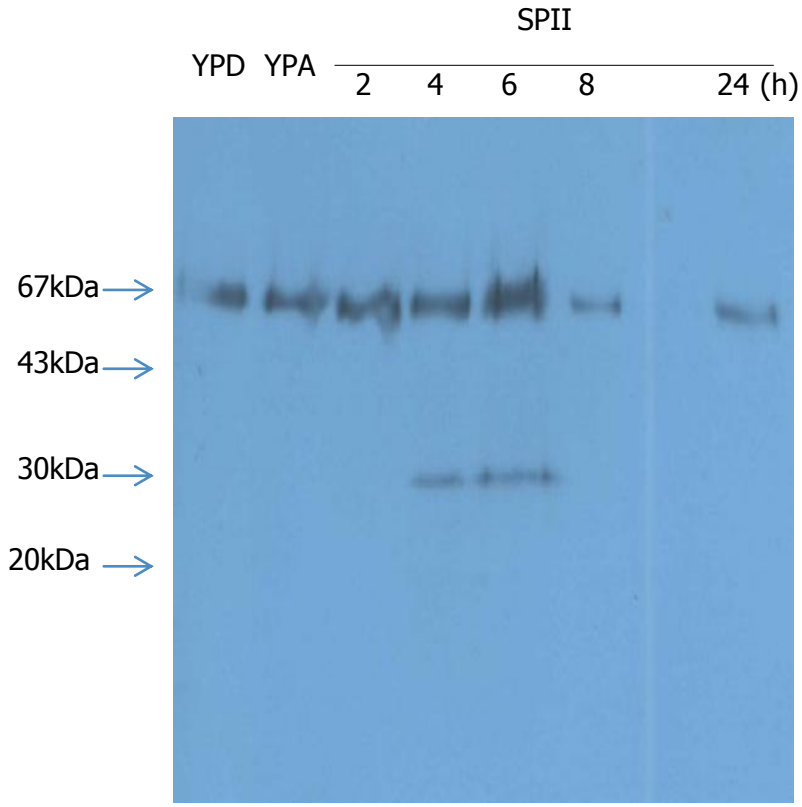
4.1.4. Mejoza i sporulacija

Stanicama transformiranih kvasaca inducirana je mejoza i sporulacija. Stanice su praćene tijekom 2, 4, 6, 8 i 24h. Mikroskopiranjem uzorka nakon 24 sata uočene su spore što se može vidjeti na slici 6. To je bio dokaz da su procesi mejoze i sporulacije uspješno provedeni. Stanice u svim uzorcima su razbijene, proteini su izolirani tretmanom sa SDS-om, potom razdvojeni proteinskom elektroforezom te detektirani Western blotom. Na slici 7. na fotosenzibilnom filmu uočene su vrpce veličine približno 67kDa u uzorcima nakon 2, 4, 6, 8

sati i 24 sata. Iz rezultata je vidljivo kako je protein Ncw2 eksprimiran tijekom procesa predmejotičke diobe, mejoze i sporulacije (Slika 7). Vrpca na filmu je vidljiva i u uzorku na YPD podlozi što potvrđuje već poznatu činjenicu da je protein prisutan tijekom mitoze.



Slika 7. Spore kvasca nakon 24h na SPII podlozi. Dokaz uspješno provedenog procesa sporulacije.



Slika 8. Western blot analiza Ncw2-HA proteina. SDS ekstrakt. Provjera prisutnosti Ncw2-HA proteina tijekom mitoze, mejoze i sporulacije. Uzorak YPD sadrži stanice kvasca u mitozi;

uzorak YPA sadrži stanice kvasca u predmejotičkoj diobi; uzorak SPII sadrži stanice kvasca u mejozi i sporulaciji (2, 4, 6, 8 i 24h).

4.2. Rasprava

Kvasac *S. cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam koji je od davnina u ljudskoj upotrebi zbog sposobnosti fermentacije pri proizvodnji piva, pekarskih proizvoda i alkoholnih pića općenito. Danas pobuđuje interes brojnih znanstvenika zbog poznate genomske sekvence i sličnosti s višestaničnim organizmima. Jednostavna manipulacija i jeftin uzgoj čine kvasac poželjnim organizmom za razna znanstvena istraživanja. Stanice kvasca sadrže staničnu stijenku koja je građena najvećim dijelom od polisaharida (85%) i proteina (15%) (Nguyen-Queyrens i sur., 1998). Stijenka određuje morfološke karakteristike kvasca kao što su oblik i čvrstoća te doprinosi integritetu tijekom staničnog rasta, dijeljenja i stresnih okolišnih uvjeta (Lesage i Bussey, 2006). Od polisaharida najzastupljeniji je ß-1,3-glukan (50%), slijede ga ß-1,6-glukan (5%), manan (35%) i hitin (1-2%) (Fleet, 1991). Stanična stijenka sadrži 20 do sada proučenih manoproteina (Mrša i Tanner, 1999) koji podliježu O- i N-glikozilaciji (Dean, 1999). Glikozilacija manoproteina doprinosi njihovoj ulozi u procesima zadržavanja vode, adheziji te virulenciji (De Groot i sur., 2005). Funkcija većine do sada identificiranih proteina nije poznata, ali je poznato da se proteini stijenke vežu kovalentnim i nekovalentnim interakcijama za glukansku mrežu. Kovalentno vezani protein Ncw2 je tek nedavno otkriven u staničnoj stijenci kvasca zbog čega još mnogo toga o njemu i njegovoj ulozi u stijenci nije razjašnjeno. Mitoza, mejoza i sporulacija procesi su životnog ciklusa kvasca. Mitoza je standardni način rasta odnosno razmnožavanja kvasca, a mejoza proces koji nastupa kada se stanice kvasca nađu u nepovoljnim uvjetima i završava sporulacijom odnosno tvorbom spora u askusu. Tijekom prelaska stanica kvasca iz jednog životnog ciklusa u drugi dolazi do promjena u strukturi glukanske mreže i neki proteini su prisutni tijekom oba procesa, a neki nisu. Eksperimentalni dio ovoga rada je uključivao umetanje hemaglutininske oznake (HA) iza gena koji kodira za protein Ncw2 kako bi vidjeli je li protein eksprimiran tijekom mejoze i sporulacije. Umetanje hemaglutininske oznake, umnožene PCR-om, iza gena od interesa je brza metoda za obilježavanje proteina *in vivo* u kvascu *S. cerevisiae* (Janke i sur., 2004). Rezultati ovoga rada potvrđuju da je označavanje proteina Ncw2 provedeno uspješno što je potvrđeno detekcijom koristeći metodu Western blot i specifična antitijela.

Označeni protein izoliran je iz stanične stijenke kvasca na tri načina, tretmanom s vrućim SDS-om, ß-glukanazom te 30mM NaOH. Korištenjem antitijela anti-HA detektiran je protein

Ncw2 u sva tri ekstrakta. U ektraktu 30mM NaOH pojavile su se dodatne vrpce zbog nespecifičnog vezanja antitijela, a u ekstraktu glukanaze uočavamo zatamnjenu pozadinu koja je posljedica nanošenja previše uzorka. Rezultati rada ukazuju na to da bi protein Ncw2 mogao biti vezan za stijenku i nekovaletnim i kovaletnim vezama. Takvo saznanje nije proturječno pretpostavkama Therashima i sur., 2000. o vezanju proteina Ncw2 za stijenku kovaletno preko GPI sidra, no sugerira još jednu mogućnost vezanja za stijenku.

Uslijedilo je ispitivanje prisutnosti proteina Ncw2 u stijenci tijekom mejoze i sporulacije. Zbog toga su u stanicama transformiranog kvasca inducirani ovi procesi upotrebom podloga YPA i SPII. Provedena je izolacija proteina stanične stijenke tretmanom sa SDS-om. Analizom uzoraka proteinskom elektroforezom i Western blotom utvrdilo se da je označeni protein Ncw2 prisutan u svim uzorcima. Zaključak koji iz toga proizlazi jest da je protein prisutan tijekom mitoze, mejoze i sporulacije. To je bitna činjenica jer se time otvara prostor pretpostavkama o njegovoj potencijalnoj ulozi u procesu mejoze i općenito reorganizacije ß-glukana i glukanske mreže što su naglasili Lussier i sur., 1997 i Elsztein i sur., 2016. U njihovom radu jedan od eksperimenata se sastojao od izlaganja mutanata *ncw2* zimolijazi. Mutanti su u odnosu na divlji tip bili otporniji na tretman zimolijazom. Razlog te otpornosti pripisali su redukciji ß-1,3-glukanske mreže. S obzirom na to da je protein očuvan tijekom mejoze i sporulacije mogao bi imati ulogu u sintezi i organizaciji glukanske mreže tijekom različitih procesa životnog ciklusa kvasca.

5. ZAKLJUČAK

1) Provedeno je uspješno označavanje gena *NCW2* oznakom HA u genomu kvasca *S. cerevisiae.*

2) Protein Ncw2 eksprimiran je tijekom mejoze i sporulacije u kvascu *S. cerevisiae*.

3) Protein Ncw2 može biti nekovalentno i kovalentno vezan u staničnu stijenku kvasca.

6. POPIS LITERATURE

Blow, J. J. i Tanaka, T. U. (2005) 'The chromosome cycle: coordinating replication and segregation', *EMBO reports*, **6**(11), str. 1028–1034.

Burnette, W. N. (1981) '"Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A', *Analytical Biochemistry*, **112**(2), str. 195–203.

Cappellaro, C., Mrsa, V., Tanner, W. (1998) 'New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating', *Journal of Bacteriology*, **180**(19), str. 5030–5037.

Castillo, L. *i sur.* (2003) 'Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: The repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β-1,3-glucan', *Yeast*, **20**(11), str. 973–983.

Corley, R. B. (2005) *A guide to methods in the biomedical sciences*, *A Guide to Methods in the Biomedical Sciences*.

Dean, N. (1999) 'Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, str. 309–322.

Dempski, R. E., Imperiali, B. (2002) 'Oligosaccharyl transferase: Gatekeeper to the secretory pathway', *Current Opinion in Chemical Biology*, str. 844–850.

Elsztein, C., de Lucena, R. M., de Morais, M. A. (2011) 'The resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the biocide polyhexamethylene biguanide: involvement of cell wall integrity pathway and emerging role for YAP1', *BMC Molecular Biology*, **12**(1), str. 38.

Elsztein, C., De Menezes, J. A. S., De Morais, M. A. (2008) 'Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**(9), str. 967–973.

Geoghegan, I., Steinberg, G., Gurr., S. (2017) 'The Role of the Fungal Cell Wall int he infection of Plants', Trends in Microbiology, str. 56-59.

Gonzalez, M., Lipke, P. N., Ovalle, R. (2009) 'Chapter 15 GPI Proteins in biogenesis and structure of yeast cell walls', *Enzymes*, str. 321–356.

De Groot, P. W. J., Ram, A. F., Klis, F. M. (2005) 'Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls', *Fungal Genetics and Biology*, str. 657–675.

Harper, S., Speicher, D. W. (2005) 'Electroblotting From Polyacrylamide Gels', in *Handbook of Food Analytical Chemistry*, str. 185–198.

Herskowitz, I. (1988) 'Life cycle of the budding yeast *Saccaharomyces cerevisiae*.', Microbiologiacal reviews, **52**, str. 536-553.

Ikezawa, H. (2002) 'Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins.', *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(April), str. 409–417.

Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M. (2004) 'A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes', *Yeast*, **21**(11), str. 947–962.

Joshi, M., Deshpande, J. D. (2011) 'Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application', *International Journal of Biomedical Research*, **2**(1), str. 81–97.

Kalebina, T. S., Farkaš, V., Laurinavichuite, D.K., Gorlovoy, P.M., Fominov, G.V., Bartek, P., Kulaev, I.S. (2003) 'Deletion of BGL2 results in an increased chitin level in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **84**(3), str. 179–184..

Kalebina, T. S., Plotnikova, T.A., Gorkovski, A.A., Selyakh, I.O., Galzitskaya, O.V., Bezsonov, E.E., Gellissen, G., Kulaev, I.S. (2008) 'Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p', *Prion*, **2**(2), str. 91–96.

Kang, M. S., Elango, M., Mattia, E., Au-Young, J., Robbins, P.W., Cabib, E. (1984) 'Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product', *Journal of Biological Chemistry*, **259**(23), str. 14966–14972.

Klebl, F., Tanner, W. (1989) 'Molecular cloning of a cell wall exo-??-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Bacteriology*, **171**(11), str. 6259–6264.

Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W., Cabob, E. (1995) 'Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and β(1→3)-glucan', *Journal of Biological Chemistry*, **270**(3), str. 1170–1178.

Kurien, B. T., Scofield, R. H. (2009) 'Nonelectrophoretic bidirectional transfer of a single SDS-PAGE gel with multiple antigens to obtain 12 immunoblots.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **536**, str. 55–65..

Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arrovo, J., Hoheisel, J.D., Francois, J. (2003) 'Genome-wide Analysis of the Response to Cell Wall Mutations in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, **278**(22), str. 20345–20357.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Chin-Yuan, H., Yong, H.K. (2012) 'Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments.', *Journal of visualized experiments : JoVE*, **62**, str. 1–5.

Lenormand, T., Engelstadter, J., Johnston, S.E., Winjker, E., Haag, C.R. (2016) 'Evolutionary mysteries in meiosis', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **371**(1706), str. 20160001.

Lesage, G., Bussey, H. (2006) 'Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**(2), str. 317–43.

De Lucena, R. M.,Elsztein, C., Simoes, D.A., De Morais, M.A. (2012) 'Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid', *Journal of Applied Microbiology*, **113**(3), str. 629–640.

Mahmood, T., Yang, P. C. (2012) 'Western blot: Technique, theory, and trouble shooting', *North American Journal of Medical Sciences*, **4**(9), str. 429–434..

Montijn, R. C., Van Risum, J., Van Schagen, F.A., Klis, F.M. (1994) 'Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain', *Journal of Biological Chemistry*, 269(30), str. 19338–19342.

Mrša, V., Ecker, M., Strahl-Bolsinger, S., Nimtz, M., Lehle, L., Tanner., W. (1999) 'Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Bacteriology*, **181**(10), str. 3076–3086.

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**(12), str. 1145–1154.

Mrša, V., Tanner, W. (1999) 'Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall.', *Yeast (Chichester, England)*, **15**(10A), str. 813–820.

Nguyen-Queyrens, A.*, Ferhi, A., Loustan, D., Guehl, M.J. (*1998) 'Within-ring delta C-13 spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of Pinus pinaster', *Canadian Journal of Forest Research*, **28**, str. 766–773.

O'Connor, C. (2008) *Mitosis and Cell Division*, *Nature education,* str. 34-42.

Ohishi, K., Inoue, N., Kinoshita, T. (2001) 'PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8', *EMBO Journal*, **20**(15), str. 4088–4098.

Orlean, P. (2012) 'Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall.', *Genetics*, **192**(3), str. 775–818.

Ovalle R., Lim, S.T., Holder, B., Jue, C.K., Moore, C.W., Lipke, P.N. (1998) 'A spheroplast rate assay for determination of cell wall integrity in yeast', *Yeast (Chichester, England)*, **14**, str. 1159–1166.

Pringle, J. R., Hartwell, L. H. (1981) 'The *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle', *Cold Spring Harbor Monograph Archive; Volume* **11***(1981): The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*.

Renart, J., Reiser, J., Stark, G. R. (1979) 'Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**(7), str. 3116–3120.

De Sampaio, G., Bourdineaud, J. P., Lauquin, G. J. M. (1999) 'A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: Cell wall targeting', *Molecular Microbiology*, **34**(2), str. 247–256.

Sentandreu, R., Northcote, D. H. (1968) 'The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall.', *The Biochemical journal*, **109**(3), str. 419–32.

Sestak, S., Hagen, I., Tanner, W., Strahl., S. (2004) 'Scw10p, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiology*, **150**(10), str. 3197–3208.

Sherman, F. (1991) 'Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology', *Methods in Enzymology*, **194**, str. 3–21.

Sherman, F. (2002) 'ScienceDirect.com - Methods in Enzymology - Getting started with yeast', *Methods in enzymology*.

Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M.,Tanner, W. (1999) 'Protein O-mannosylation', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, str. 297–307.

Teparić, R., Mrša, V. (1997) 'Purification of yeast periplasmic proteins using protein adsorption to glucan', *Food Technology and Biotechnology*, **35**(1), str. 29–32.

Teparić, R., Mrša, V. (2013) 'Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls', *Current Genetics*, **59**(4), str. 171–185.

Teparić, R., Stuparević, I., Mrsa, V. (2004) 'Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants.', *Microbiology*, **150**, str. 3145–50.

Teparić, R., Stuparević, I., Mrša, V. (2010) 'Incorporation of homologous and heterologous proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall', *Food Technology and Biotechnology*, **48**(3), str. 317–328.

Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K., Kitada, K. (2000) 'Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Molecular & general genetics : MGG*, **264**, str. 64–74.

Toh-E, A., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., Oguchi, T., Matsui, J. (1993) 'Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock', *Yeast*, **9**(5), str. 481–494.

Towbin, H., Staehlin, T. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody', *Anal. Biochem*, **112**, str. 195–203.

Valentin-Hansen, P., Hammer-Jespersen, K., Boetius, F., Svendsen, F., Svendsen, I. (1984) 'Structure and function of the intercistronic regulatory deoC-deoA element of Escherichia coli K-12.', *The EMBO journal*, **3**(1), str. 179–83.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F.R. (2003) 'Yeast flocculation: what brewers should know', *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**(3), str. 197–205.

Vishwakarma, R., Ruhela, D. (2009) *Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchoring of Proteins*, *The Enzymes*.

Yang, N., Yu, Z., Jia, D., Xie, Z., Zhang, K., Xia, Z., Lei, L.,Qiao, M. (2014) 'The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display', *Applied microbiology and biotechnology*.

Yin, Q. Y., de Groot, P.W., Dekker, H.L., de Yong, L., Klis, F.M., de Koster, C.G. (2005) 'Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages', *Journal of Biological Chemistry*, **280**(21), str. 20894–20901.

Yun, D. J., Zhao, Y., Pardo, J.M., Narasimhan, M.L., Damsz, B., Hyeseung, L., Abad, L.R., Urzo, M.P., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1997) 'Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**(13), str. 7082–7.

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.

Miroslava Bernat

Miroslava Bernat