

Konstrukcija i ekspresija mutiranih inačica gena SCW4 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Damjanović, Anja

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:119213>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Anja Damjanović

7253/BT

KONSTRUKCIJA I EKSPRESIJA MUTIRANIH INAČICA
GENA *SCW4* KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija II

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Renata Teparić

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Konstrukcija i ekspresija mutiranih inačica gena SCW4 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Anja Damjanović, 58208850

Sažetak: Protein Scw4 veže se kovalentno i nekovalentno na staničnu stjenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, no nije poznato na koji se način kovalentno veže. U potrazi za regijom potencijalno odgovornom za vezanje napravljena je delecijaska analiza gena *SCW4*. Mutacije u konstruktima uvedene su PCR metodom megapočetnice koristeći plazmid pBG1805 *SCW4* kao DNA kalup. U ovom radu napravljena su i ispitana dva delecijaska konstrukta, $\Delta 202SCW4$ i $\Delta 231SCW4$, u kojima su deletirani dijelovi gena koji kodiraju za dio sekvence proteina od signalne sekvence do 202.-og, odnosno 231.-og aminokiselinskog ostatka. Konstrukti su ligirani u kvaščev plazmidni vektor YEp351 te su dobivenim plazmidima transformirane stanice kvasca. Kvasci su uzgajani u selektivnoj podlozi za uzgoj u uvjetima indukcije *GAL1* promotora s obzirom da na to da *GAL1* promotor na plazmidu YEp351 kontrolira ekspresiju mutiranih inačica *SCW4* gena. Nakon uzgoja provedena je izolacija proteina stanične stijenke, proteini su razdvojeni u gelu SDS-elektroforezom po Laemmli-u te je pomoću Western blot metode potvrđena ekspresija i nekovalentno vezanje mutiranog Scw4 proteina na staničnu stjenku kvasca.

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

Rad sadrži: 31 stranica, 12 slika, 6 tablica, 15 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Renata Teparić

Pomoć pri izradi: Mateja Lozančić, mag. ing.

Datum obrane: 10.09.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Construction and expression of mutated variants of the
***Saccharomyces cerevisiae* yeast *SCW4* gene**
Anja Damjanović, 58208850

Abstract: The Scw4 protein can be bound covalently or non-covalently to *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall, but how the covalent linkage occurs is unknown. Searching for a region potentially responsible for the covalent binding, different constructs of the *SCW4* gene were made. Mutations in gene were introduced by PCR megaprimers method using the pBG1805 *SCW4* plasmid as template DNA. In this reaserch two constructs were made and tested: $\Delta 202SCW4$ and $\Delta 231SCW4$. The constructs were made by the deletion of gene parts encoding 202 aminoacids ($\Delta 202SCW4$) or 231 aminoacids ($\Delta 231SCW4$), respectively, starting from the Scw4 signal sequence. Constructs were ligated into a yeast plasmid vector, YEp351 and introduced into the yeast cells. The transformed yeast cells were cultivated in a selective growth medium in conditions in which *GAL1* promoter is induced, since the *GAL1* promoter on YEp351 plasmid controls the expression of mutated variants of the *SCW4* gene. After the cultivation, proteins were isolated from the yeast cell wall and then separated using the Laemmli gel SDS-electrophoresis. Expression and non-covalent binding of the mutated Scw4 proteins to yeast cell wall was confirmed by Western blot method.

Keywords: Cell wall, PCR, *Saccharomyces cerevisiae*, Scw4

Thesis contains: 31 pages, 12 figures, 6 tables, 15 references

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: Ph. D. Renata Teparić, Associate Professor

Technical support and assistance: Mateja Lozančić, mag. ing.

Defence date: 10.09.2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. Građa stanične stijenke kvasca	2
2.2.1. Polisaharidi stanične stijenke	3
2.2.2. Proteini stanične stijenke.....	3
2.3. Protein Scw4.....	4
2.3.1. PCR i metoda megapočetnice	5
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Materijali	7
3.1.1. Kemikalije.....	7
3.1.2. Plazmidi.....	8
3.1.2.1. pBG1805 <i>SCW4</i>	8
3.1.2.2. pGEM-T	9
3.1.2.3. YEp351.....	10
3.1.3. Laboratorijski sojevi korištenih mikroorganizama	11
3.1.4. Hranjive podloge	11
3.2. Metode	13
3.2.1. PCR metoda megapočetnice	13
3.2.2. DNA gel elektroforeza	16
3.2.3. Izolacija DNA iz agaroznog gela	16
3.2.4. TA-ligacija PCR konstrukata u plazmid pGEM-T	16
3.2.5. Transformacija kompetentnih stanica <i>E. coli</i>	17
3.2.6. Izolacija plazmida iz bakterijskih stanica <i>E. coli</i>	17
3.2.7. Ligacija fragmenata DNA i plazmida YEp351	17
3.2.8. Restriksijska analiza PCR produkata	18
3.2.9. Transformacija kvasca	18
3.2.10. Uzgoj kvasca sa indukcijom <i>GAL</i> promotora	19
3.2.11. Izolacija stanične stijenke kvasca	19
3.2.12. SDS tretman stijenki	20
3.2.13. SDS PAGE elektroforeza	20
3.2.14. Western blot	20

4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Rezultati	22
4.1.1. Uvođenje mutacija u gen <i>SCW4</i> pomoću PCR-a metodom megapočetnice	22
4.1.2. TA-ligacija konstrukata u plazmid pGEM-T i restrikcijska analiza	24
4.1.3. Ligacija mutiranih <i>SCW4</i> gena u plazmid YEp351.....	25
4.1.4. Provjera uspješnosti ekspresije mutiranih oblika Scw4 proteina u SDS - ekstraktu proteina stanične stijenke pomoću Western blot metode	26
4.2. Rasprava	27
5. ZAKLJUČCI	29
6. POPIS LITERATURE	30

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* najistraženiji je industrijski mikroorganizam s obzirom na to da je genom kvasca prvi sekvencirani eukariotski genom (Goffeau i sur., 1996.). Zahvaljujući tome, *Saccharomyces cerevisiae* koristi se kao modelni organizam za istraživanje eukariotskih stanica, ali i u raznim industrijskim procesima, od onih tradicionalnih kao što su fermentacije hrane i pića pa sve do ekspresije humanih gena u kvascu kao domaćinu i korištenje kvasca za dobivanje finih kemikalija za farmaceutske i terapijske svrhe. Unatoč tome što je genom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* poznat, stanična stijenka kvasca najmanje je istražena stanična struktura ovog mikroorganizma. Stanična stijenka je ekstracelularni organel koji stanici kvasca daje oblik, pruža osmotsku stabilnost i zaštitu od mehaničkih utjecaja. Kompleksnu strukturu stanične stijenke čine lanci polimera β -1,3-glukana koji čine osnovnu mrežu na koji se nadovezuju polimeri β -1,6-glukana i hitina. Vanjski dio stijenke čine najvećim dijelom manoproteini koji mogu biti kovalentno ili nekovalentno vezani za polimere glukana. Nevalentno vezani proteini iz stanične stijenke se mogu izolirati tretmanom vrućim SDS-om u prisustvu β -merkaptetanola dok se proteini kovalentno vezani za β -1,3-glukan mogu iz stijenke izolirati tretmanom s β -glukanazom ili blagom lužinom.

Protein Scw4 prvotno je izoliran kuhanjem stijenki u SDS-u, no kasnije se pokazalo kako se Scw4 može izolirati i tretmanom stijenki sa 30 mM NaOH (Teparić i sur., 2007.), što je inače karakterističan način za izolaciju proteina Pir skupine (Mrša i sur., 1997.). Za proteine Pir skupine karakteristična je ponavljajuća sekvenca aminokiselina koji uključuje glutaminske ostatke posebice važne za ostvarivanje kovalentne veze s β -1,3-glukanom stijenke (Ecker i sur., 2006.). S obzirom na to da protein Scw4 ne posjeduje takav karakterističan ponavljajući slijed aminokiselina, ne zna se koji dio proteina je odgovoran za njegovo kovalentno vezanje na stijenk. U tu svrhu, metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) provedena je delecijaska analiza gena *SCW4* kako bi se pronašla regija proteina koja bi mogla sudjelovati u kovalentnim vezanju Scw4 u stijenk. Cilj ovog rada bila je priprema dvaju konstrukata gena *SCW4*, Δ 202*SCW4* i Δ 231*SCW4*, u kojima su deletirani dijelovi koji kodiraju za dio sekvence proteina od signalne sekvence do 202.-og, odnosno 231.-og aminokiselinskog ostatka. Pripremljeni konstrukti su ligirani u kvašćev vektor i ekspimirani u stanicma kvasca. Western blot metodom potvrđena je ekspresija i vezanje mutiranog Scw4 proteina na staničnu stijenk kvasca.

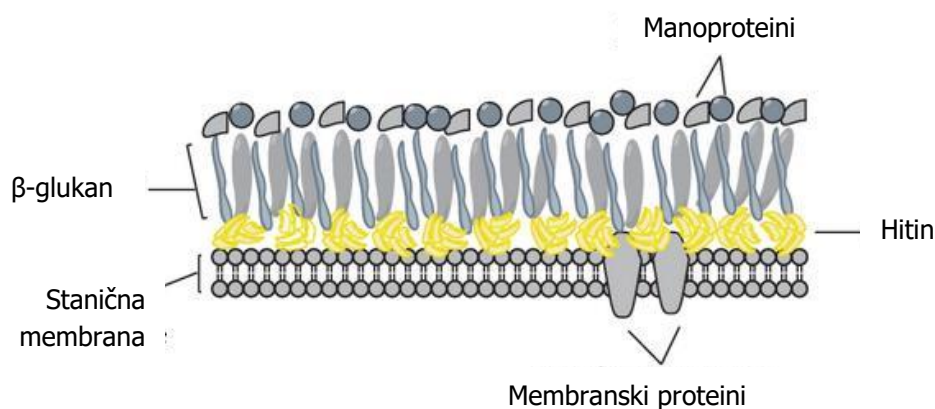
2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariot koji pripada carstvu *Fungi*. Karakterizira ga kratko generacijsko vrijeme. Razmnožavati se može spolno, mejozom ili nespolno, pupanjem. Optimalna temperatura za njegov rast kreće se u rasponu od 28° do 30°C te mu pogoduje kiseli pH. Genom kvasca *S. cerevisiae* u potpunosti je sekvenciran (Goffeau i sur., 1996.) i jednostavno se genetički modificira. Stoga je kvasac pogodan modelni organizam za eksperimentalna istraživanja staničnih procesa u eukariotskim stanicama.

2.2. Građa stanične stijenke kvasca

Stanična stijenka ekstracelularna je organela koji definira oblik stanice mikroorganizma. Stanična stijenka kvasca iznimno je čvrsta struktura koja kvascu omogućava osmotsku i mehaničku stabilnost. Unatoč tome, stijenka kvasca izrazito je dinamična i fleksibilna struktura podložna promjenama u obliku, kemijskom sastavu i fizičkim svojstvima tijekom staničnog rasta, parenja ili sporulacije. Stijenka kvasca sastavljena je većinom od polisaharida (85%) i proteina (15%) no udio pojedine komponente može varirati ovisno o uvjetima rasta, vrsti kvasca i fazi rasta (Teparić i Mrša, 2013.). Polisaharidi grade unutarnji sloj stijenke dok manoproteini formiraju vanjski sloj omogućujući time komunikaciju stanice s okolinom (slika 1).



Slika 1. Strukturni prikaz građe stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

(<http://sites.uci.edu/tresederresources/2015/06/14/fungal-trait-%CE%B213-glucan/>, posjećeno 30.06.2018.)

2.2.1. Polisaharidi stanične stijenke

U polisaharide koji grade stijenku kvasca ubrajaju se polimeri glukoze β -1,3-glukan (50%) i β -1,6-glukan (5%), manan (35%) i hitin (1-2%) kao polimer N-acetilglukozamina (Mrša i sur., 1997). Strukturu β -1,3-glukana čini oko 1500 povezanih glukoznih jedinica čineći tako razgranatu mrežu β -1,3-glukana na čije se nereducirajuće krajeve povezuju β -1,6-glukan i hitin sa svojim reducirajućim krajevima (Kollar i sur., 1995). β -1,6-glukan sastavljen je od oko 140 monomera glukoze i znatno je razgranatiji. Hitin je linearni polimer građen od oko 110 jedinica N-acetilglukozamina i njegova zastupljenost u staničnoj stijenci znatno ovisi o uvjetima rasta. S povećanjem osmotskog tlaka dolazi do porasta udjela hitina čak i do 20% od ukupnih polisaharida u stijenci (Kapteyn i sur., 1997). Osim toga hitin ima dvije važne uloge: povećava čvrstoću stijenke u uvjetima stresa i gradi primarni septum prilikom pupanja između stanice majke i stanice kćeri. Manan čini ugljikohidratni dio manoproteina koji se nalaze u vanjskom sloju stanične stijenke. Za proteine se veže tijekom procesa glikozilacije proteina. O njemu ovisi i stupanj poroznosti stanične stijenke zbog vanjskog, kemijskog inertnog štita kojeg gradi.

2.2.2. Proteini stanične stijenke

Proteini stanične stijenke kvasca mogu se pojedinačno svrstati u određene skupine proteina sličnih po karakterističnim dijelovima aminokiselinske sekvence i/ili po funkcijama koje obnašaju. Između tih skupina izražene su razlike između proteina koje se očituju u njihovoj strukturi i načinu vezanja za glukanski sloj stanične stijenke.

Skupina proteina nazvana Ccw proteini (coalently linked cell wall) za β -1,3-glukan vežu se kovalentnom kemijskom vezom ili preko ostataka GPI sidra ili kao proteini Pir skupine. Skupina od četiri Pir proteina (proteins with internal repeats) karakteristična je po ponavljajućem slijedu aminokiselina koji uključuje glutaminske ostatke ključne za ostvarivanje kovalentnog povezivanja sa jedinicama β -1,3-glukana (Ecker i sur., 2006.). Uloga Pir proteina nije sasvim razjašnjena no zna se da nisu esencijalni za stanicu. Ukoliko se inaktiviraju geni koji kodiraju za sva četiri Pir proteina dolazi do osmotske nestabilnosti i povećane osjetljivosti stijenke na inhibitore sinteze stijenke kao i promjene u samoj morfologiji stanice (Mrša i Tanner, 1999.). Pir proteini se iz stijenke mogu ekstrahirati tretiranjem s blagom lužinom, najčešće 30 mM NaOH ili tretmanom s glukanzama.

Druga grupa kovalentno vezanih proteina stijenke se za β -1,3-glukan veže preko ostatka tzv. glikozilfosfatidil-inozitolnog (GPI) sidra i β -1,6-glukana. Nije poznata uloga za sve proteine GPI skupine osim za proteine uključene u procese aglutinacije i flokulacije (Teparić i Mrša, 2013). Za njihovu izolaciju, stijenke je potrebno tretirati sa β -glukanazama.

Skupina proteina nazvana Scw proteini (soluble cell wall) nekovalentno se vežu za β -1,3-glukan i ekstrahiraju se iz stijenke kuhanjem u SDS-u. Većina proteina ove skupine su enzimi strukturno slični glikozidazama i transglikozidazama zbog čega bi mogli imati ulogu u pregradnji polimera glukana u stijenci tijekom rasta, razmnožavanja, sporulacije i drugih procesa koji mogu dovesti do promjene oblika stanice (Teparić i sur., 2010).

Među prvim detektiranim proteinima izoliranim SDS-om bio je protein Scw4 no ubrzo se pokazalo kako se on osim nekovalentno za staničnu stijenku može vezati i kovalentnom vezom nestabilnom u lužnatom mediju (Teparić i sur., 2010.).

2.3. Protein Scw4

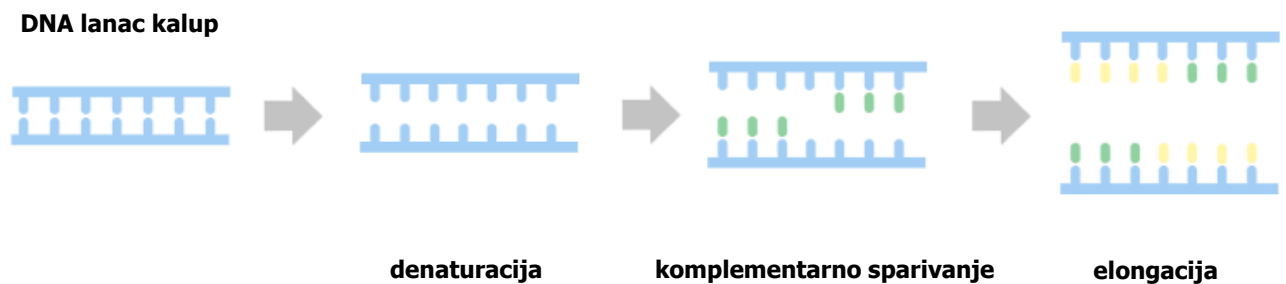
Protein Scw4, zajedno sa proteinom Scw10, bio je među prvim proteinima detektiranim u SDS-ekstraktu (Cappellaro i sur., 1998.) te je zbog toga svrstan u skupinu proteina koji se u stijenku vežu nekovalentnom kemijskom vezom. Strukturno je vrlo sličan proteinu Bgl2, prvom proteinu stanične stijenke čija je primarna struktura u potpunosti razjašnjena (Klebl i Tanner 1989.). Pretpostavlja se da bi protein Scw4 mogao imati enzimsku ulogu u pregradnji glukana u stijenci, ali takva enzimska aktivnost još nije dokazana u *in vitro* uvjetima (Teparić i sur., 2010.). Za protein Scw4 se pokazalo da se osim nekovalentnim interakcijama u staničnu stijenku veže i kovalentnom vezom (Teparić i sur., 2010.). Ta veza je nestabilna u bazičnom mediju pa se Scw4 iz stijenke može izolirati i tretmanom s 30 mM NaOH, karakterističnim za izolaciju proteina Pir skupine. Scw4 protein ne sadrži karakterističnu ponavljajuću aminokiselinsku sekvencu (**SQIGDGQVQATS**) preko koje se za β -1,3-glukan vežu Pir proteini. Osim toga, Scw4 nema niti strukturne elemente preko kojih bi bilo omogućeno vezanje preko GPI-sidra. Jednako kao kod proteina Scw4 kovalentno vezanje u stijenku uočeno je i kod njegovog homologa Scw10. Stoga, ostaje istražiti prirodu kovalentne veze preko kojeg su ova dva proteina vezana za β -1,3-glukan.

2.3.1. PCR i metoda megapočetnice

PCR (Polymerase Chain Reaction) – lančana reakcija polimerazom metoda je koja se koristi u genetičkom inženjerstvu jer omogućava brzo i uspješno umnažanje dijela DNA molekule u *in vitro* uvjetima. Time se dobiva dovoljna količina željene DNA molekule koja se koristi u daljnjim istraživanjima. Za uspješnu provedbu PCR-a potrebno je poznavati sekvencu DNA koja se želi umnožiti kako bi se konstruirale kratke oligonukleotidne sekvence koje služe kao početnice. Početnice su komplementarne 5' i 3' krajevima ciljne sekvence koja služi kao kalup prema kojem će se odvijati sinteza lanca DNA pomoću enzima DNA polimeraze. Osim kalupa, DNA polimeraze i obje početnice, u reakcijsku smjesu potrebno je dodati i dNTP-ove, enzim Taq polimerazu (termostabilna DNA polimeraza) i pufer za polimerazu u kojem se, između ostalog, nalaze magnezijevi ioni (Mg^{2+}), važni za aktivnost enzima. PCR reakcija odvija se u uređaju za PCR koji ima mogućnost održavanja temperature kroz određeni vremenski interval kao i brze izmjene temperature ovisno o uvjetima koje zahtjeva pojedina faza PCR reakcije. PCR se provodi u tri faze koje se ciklički ponavljaju (slika 2):

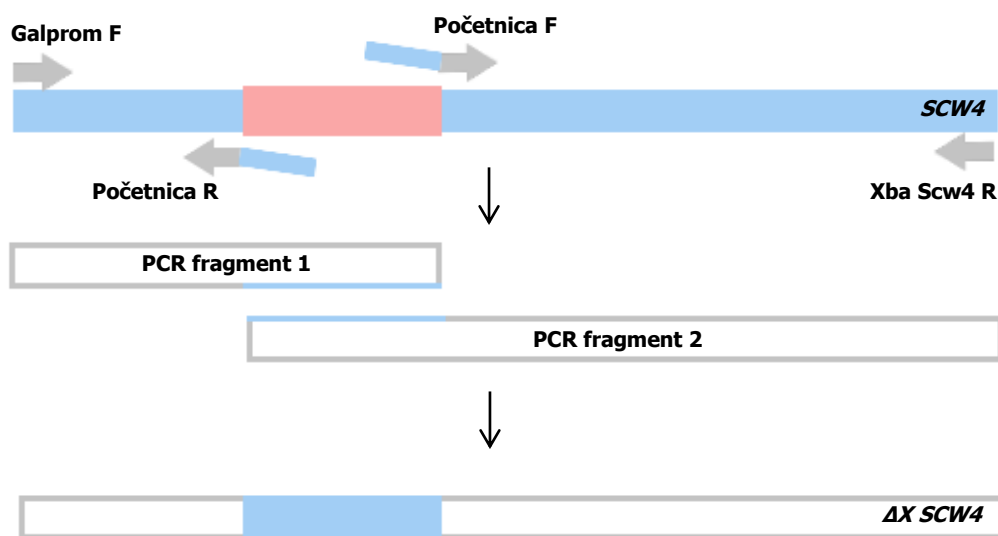
- 1) Faza denaturacije lanaca DNA – reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturu od 95°C kako bi došlo do pucanja vodikovih veza između dvostruke uzvojnice DNA čime nastaju dva lanca DNA koji služe kao kalupi za umnažanje željenog fragmenta.
- 2) Faza komplementarnog sparivanja – reakcijska smjesa se hladi na temperaturu od 50°C do 60°C kako bi došlo do komplementarnog sparivanja početnica na DNA lanac kalup.
- 3) Faza elongacije – temperatura reakcijske smjese se povećava na temperaturu optimalnu za aktivnost Taq polimeraze kako bi produljila početnice dodajući nukleotide komplementarne DNA kalupu.

Ovaj ciklus se ponavlja ~30 puta čime se dobiva veliki broj kopija željenog fragmenta.



Slika 2. Shematski prikaz PCR metode.

Modificirana metoda PCR-a nazvana metodom megapočetnice korištena je u svrhu delecije analize *SCW4* gena. Metoda se razlikuje od običnog PCR-a po tome što se koriste početnice koje nisu potpuno komplementarne DNA kalupu. Upravo takve početnice omogućavaju da se u fragment koji se želi umnožiti uvede ciljna mutacija. U prvom koraku PCR-a koriste se dva para početnica. Prvi par početnica služi za umnažanje dijela gena od promotora do mjesta na kojem se želi uvesti mutacija. Drugim parom početnica umnaža se dio gena nizvodno od mjesta na kojem se uvodi mutacija pa do završetka *SCW4* gena. Do uvođenja mutacije dolazi jer tzv. unutarnje početnice (Početnica R i Početnica F na slici 3) nisu u potpunosti komplementarne lancu kalupu na mjestu gdje se želi uvesti mutacija, nego su u tim dijelovima komplementarne međusobno. Zbog takve komplementarnosti u idućem koraku PCR-a dolazi do sparivanja komplementarnih regija u prvom krugu umnoženih fragmenata koji jedan drugome služe i kao lanac kalup i kao početnica za sintezu konačnog *SCW4* konstrukta (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz uvođenja mutacije u *SCW4* gen metodom megapočetnice.

Crvenom bojom označena je regija u genu koja se želi deletirati. Plavom bojom označeni su dijelovi početnica koji nisu komplementarni lancu kalupu već međusobno. Zahvaljujući međusobnoj komplementarnosti početnica u idućem koraku PCR-a dolazi do sparivanja u prvom koraku umnoženih fragmenata što rezultira dobivanjem konačnog produkta sa deletiranom ciljnom regijom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

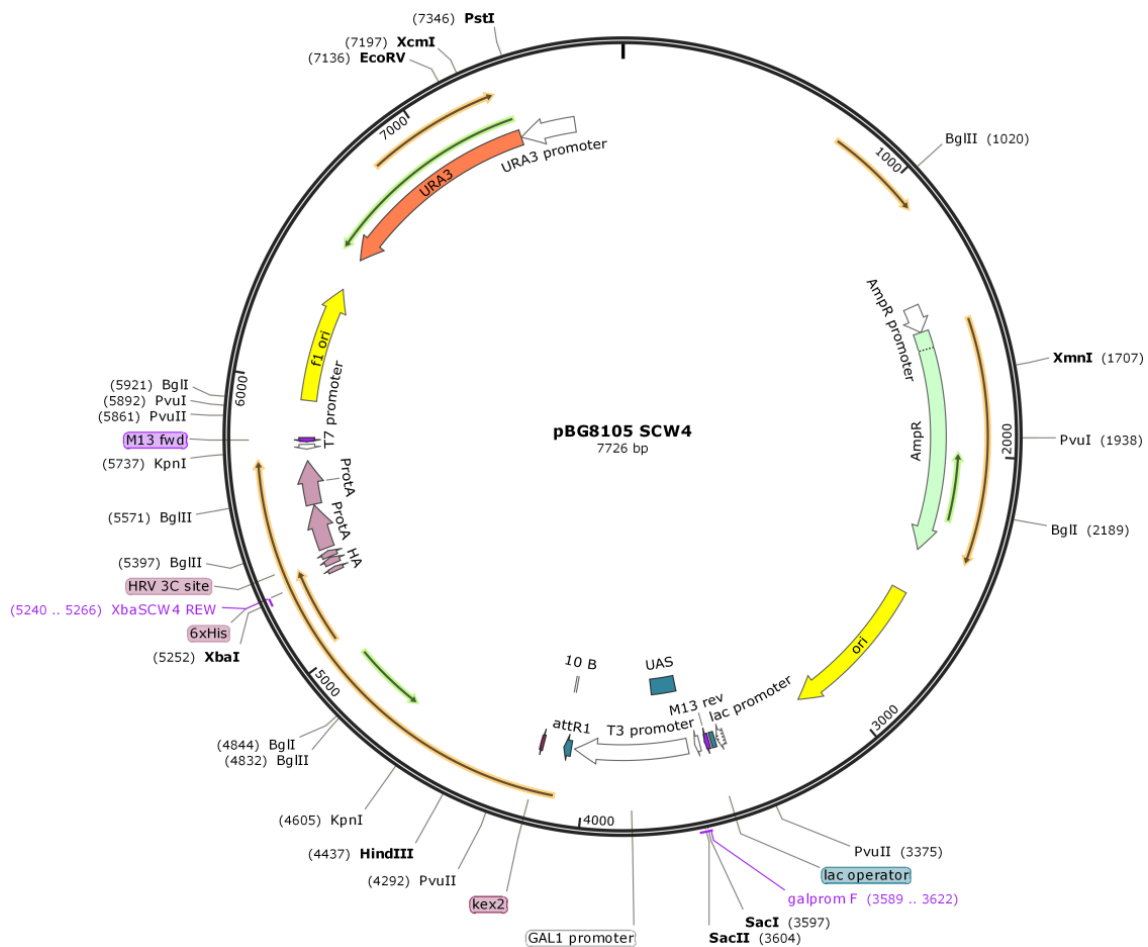
- agarozna – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- D (+) glukoza bezvodna – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- D (+) rafinoza pentahidrat – Acros Organics (USA)
- D (+) galaktoza – Acros Organics (USA)
- agar – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- histidin, uracil, leucin, triptofan – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- kvašćev ekstrakt – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- amonijev persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, Triton X-100, akrilamid, β -merkaptotetanol i Na-dodecilsulfat (SDS) – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- ECL-otopine za razvijanje blota – Bio-Rad (USA)
- Ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- restrikcijski enzimi: SacI, XbaI i BglI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- standardi za DNA elektroforezu - Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- Taq polimeraza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- T4 DNA ligaza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- kit za TA ligaciju "pGEM-T Vector System" (Promega, Madison, SAD)
- "NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up" kit (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- "NucleoSpin® Plasmid" kit (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)

Sve ostale kemikalije korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od standardnih dobavljača i analitičke su čistoće.

3.1.2. Plazmidi

3.1.2.1. pBG1805 SCW4

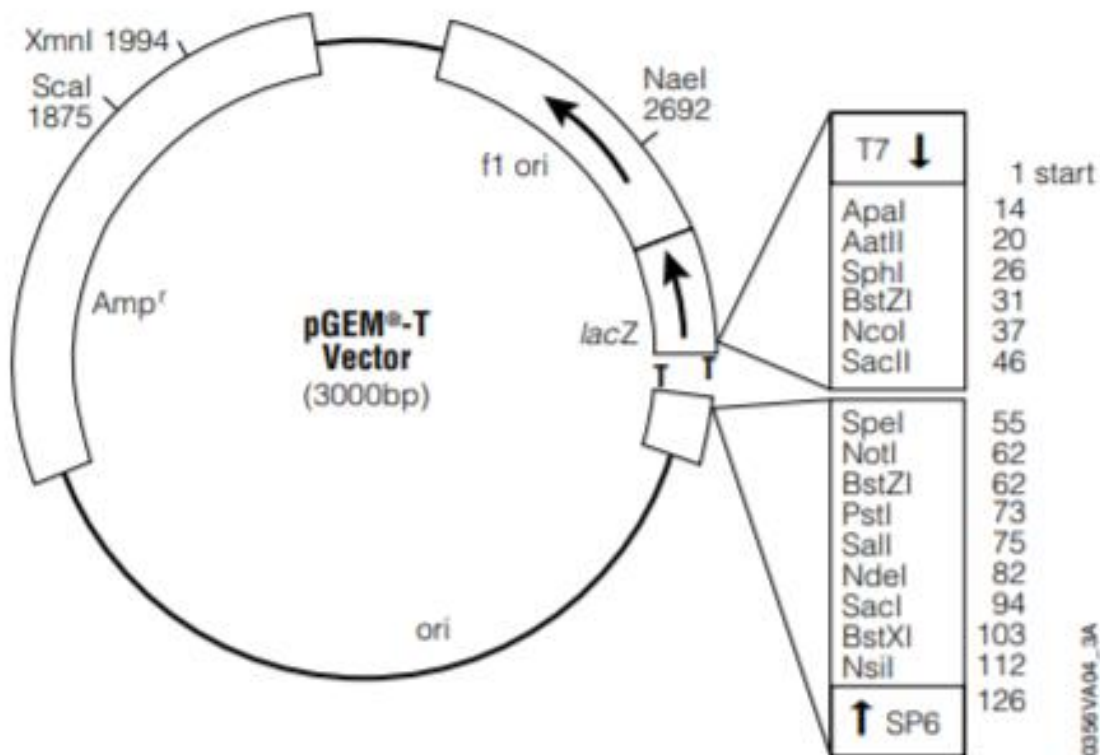
Plazmid pBG1805 *SCW4* (slika 4) korišten je kao kalup u svrhu deletiranja dijelova gena *SCW4* pomoću PCR-a metodom megapočetnice. Gen *SCW4* se na plazmidu nalazi pod kontrolom *GAL1* promotora, čime je omogućena indukcija *SCW4* gena u prisutnosti galaktoze u hranjivoj podlozi. Plazmid sadrži ishodište replikacije *ori* kako bi se mogao samostalno replicirati unutar bakterijske stanice. Osim toga, sadrži i dva selektivna markera: gen *bla* koji kodira za enzim β-laktamazu i gen *URA3* iz kvasca. Enzim β-laktamaza cijepa β-laktamski prsten antibiotika ampicilina koji se dodaje u selektivnu hranjivu podlogu kako bi se omogućila selekcija transformiranih bakterijskih stanica. Za selekciju transformiranih kvašćevih stanica na hranjivoj YNB Ura⁻ podlozi zaslužan je gen *URA3*. Nizvodno od gena *SCW4* nalazi se -HA sekvenca i niz od šest histidina (6xHis) pomoću kojih se protein Scw4 može detektirati sa specifičnim antitijelima.



Slika 4. Građa pBG1805 *SCW4* plazmida

3.1.2.2. pGEM-T

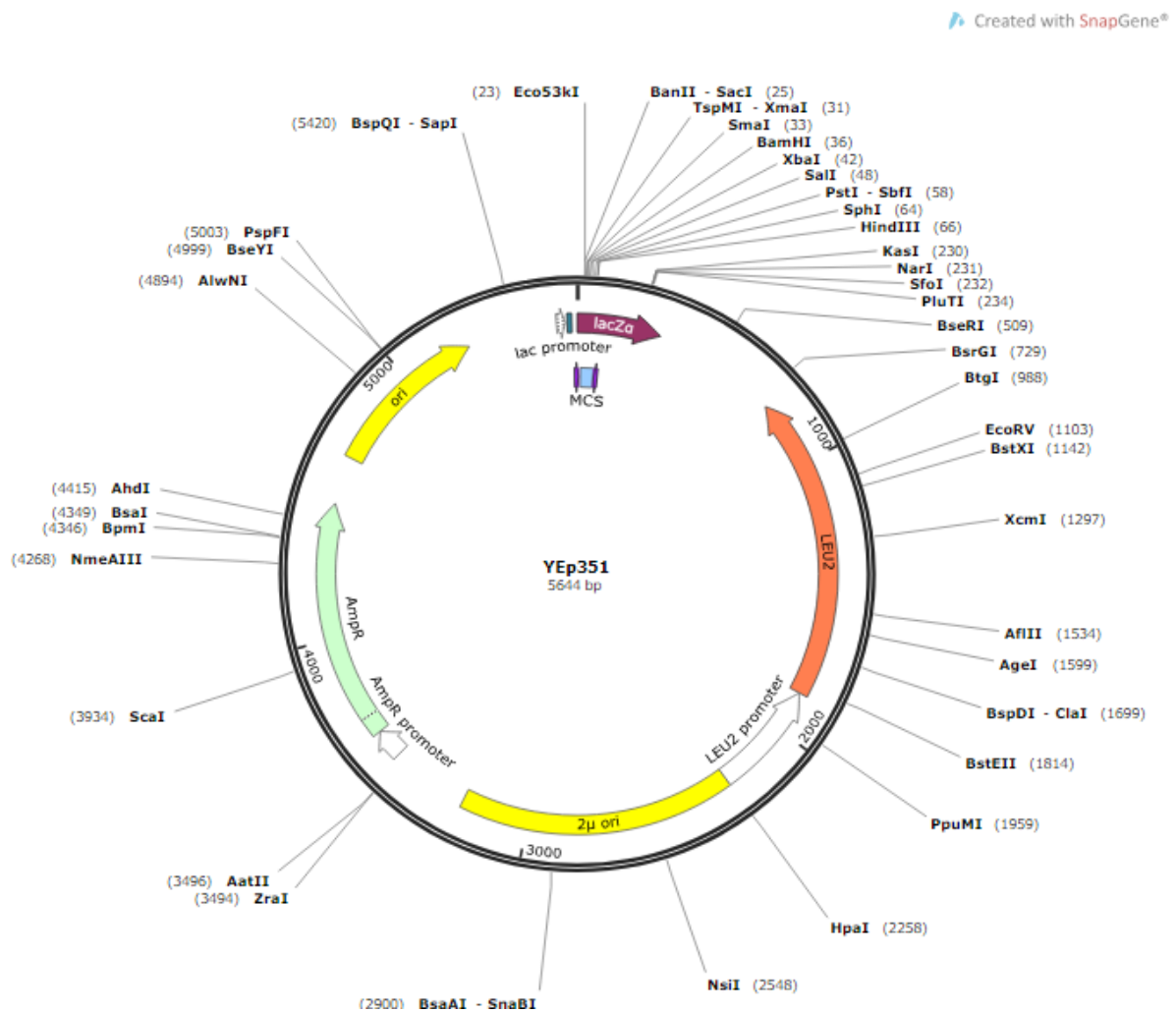
Plazmid pGEM-T (slika 5) dugačak 3000 bp korišten je kao vektor za TA-ligaciju PCR konstrukata. Uspješnu ligaciju fragmenata umnoženih PCR-om u ovaj linearizirani vektor omogućava po jedan nespareni timidin (T) na 3'-terminalnim krajevima vektora, s obzirom na to da fragmenti dobiveni PCR-om na svojim krajevima imaju nesparene adenine (A). Plazmid pGEM-T sadrži i gen *bla* za selekciju transformiranih bakterijskih stanica na podlozi s ampicilinom. Osim rezistencije na ampicilin, transformirane bakterijske stanice se mogu selekcionirati tzv. "plavo-bijelom selekcijom" jer plazmid sadrži gen *lacZ* sa umetnutim polilinkerom u koji se mogu insertirati PCR fragmenti i time onemogućiti ekspresiju gena *lacZ*, odnosno sintezu β -galaktozidaze. Funkcionalnost *lacZ* gena provjerava se tako da se u hranjivu podlogu doda X-gal, supstrat β -galaktozidaze. Ukoliko je *lacZ* funkcionalan doći će sinteze β -galaktozidaze koja će pocijepati X-gal te će kao produkt nastati plavo obojene kolonije. Ako plavo obojenje u podlozi nije prisutno znači da je došlo do disrupcije gena *lacZ* insercijom PCR fragmenata.



Slika 5. Sastav pGEM-T plazmida

3.1.2.3. YEp351

Plazmid YEp351 (slika 6) korišten je kao kvaščev vektor za ligaciju s konstruktom *SCW4* gena. Plazmid YEp351 s insertiranim konstruktima korišten je za transformaciju stanica kvasca *S. cerevisiae*. Navedeni plazmid koristi se kao vektor za transformaciju ne samo kvaščevih, nego i bakterijskih stanica zahvaljujući tome što posjeduje ishodište replikacije (*ori*) za samostalnu replikaciju unutar bakterijske stanice. Osim toga sadrži i gena *bla* koji omogućuje selekciju bakterijskih stanica transformiranih ovim plazmidom na hranjivim podlogama koje sadrže ampicilin. Selekcionirati se može i tzv. "plavo-bijelom selekcijom" jer sadrži gen *lacZ* unutar kojeg je polilinker. Za selekciju transformanata kvasaca koristi se gen *LEU2* koji služi kao auktotrofni marker.



Slika 6. Sastav YEp351 plazmida

3.1.3. Laboratorijski sojevi korištenih mikroorganizama

Soj bakterije

Genotip kompetentnih stanica bakterije *E. coli* korištenih u svrhu umnažanja gena:

DH5 α F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ

Soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

U radu je korišten laboratorijski soj kvasca BY4741 (Brachmann i sur., 1998.) genotipa: MAT a, *his3* Δ , *leu2* Δ , *met15* Δ , *ura3* Δ .

3.1.4. Hranjive podloge

Hranjiva podloga za uzgoj bakterije *E. coli*

E. coli uzgajana je na tekućoj i krutoj LB podlozi čiji je sastav prikazan u tablici 1.

Tablica 1. Sastav LB hranjive podloge za uzgoj *E. coli*

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

Nakon pripreme, hranjive podloge je potrebno sterilizirati u autoklavu na temperaturi od 121°C i tlaku od 1 atm 20 minuta. Za uzgoj stanica transformanata potrebno je u ohlađenu LB hranjivu podlogu sterilno dodati ampicilin u koncentraciji 100 μ g/mL.

Hranjiva podloga za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*

Za submerzni uzgoj stanica kvasca korištena je YNB selektivna podloga čiji je sastav prikazan u tablici 2.

Tablica 2. Sastav tekuće YNB hranjive podloge

	Koncentracija
YNB-AA/AS	6,7 g/L
"drop-out"	1,6 g/L
aminokiseline	prema auksotrofnosti

"Drop-out" podrazumijeva smjesu aminokiselina, nukleotidnih baza i vitamina potrebnih za rast kvasca. Otopine aminokiselina sterilizirane autoklaviranjem dodaju se u podlogu ovisno o auksotrofnosti soja u koncentracijama prikazanim u tablici 3.

Tablica 3. Volumeni aminokiselina koje se u podloge dodaju prema auksotrofnosti

Aminokiseline	Koncentracija radne otopine [g/L]	Koncentracija u hranjivoj podlozi [g/L]
His	6	0,08
Ura	2	0,08
Leu	15	0,16
Trp	5	0,08

Šećeri glukoza, rafinoza ili galaktoza dodaju se u hranjivu podlogu neposredno prije naciepljivanja u konačnoj koncentraciji 2%. Za dobivanje krute YNB hranjive podloge potrebno je u podlogu dodati 15 g/L agara. Nakon pripreme podloge je potrebno sterilizirati autoklaviranjem na temperaturi od 121°C i tlaku od 1 atm 20 minuta.

3.2. Metode

3.2.1. PCR metoda megapočetnice

Pomoću PCR metode megapočetnice u gen *SCW4* uvode se mutacije u svrhu pronalaska regija koje bi mogle kodirati za slijed aminokiselina odgovoran za kovalentno vezanje Scw4 proteina u stijenku. Ovom metodom napravljena su dva konstrukata za potrebe ovog rada. Konstrukti $\Delta 202SCW4$ i $\Delta 231SCW4$ dobiveni su delecijom dijelova *SCW4* gena koji kodiraju za dio proteinske sekvence i to od signalne sekvence do 202.-og, odnosno 231.-og aminokiselinskog ostatka (slika 7). Kao kalup u reakcijama PCR-a korišten je plazmid pBG1805 *SCW4*.

```
MRLSNLIASASLLSAATLAAPANHEHKDKRAVTTTTVQKQTTIIVNGAASTPVAALEENAVV
NSAPAAATSTTSSAASVATAAASSSENNSQVSAASPASSAATSTQSSSSQASSSSSSGE
DVSSFASGVRGITYTPYESSGACKSASEVASDLAQLTDFPVIRLYGTDCNQVENVFKAKASN
QKVFLGIYYVDQIQDGVNTIKSAVESYGSWDDVTTVSGNELVNGNQATPSQVGQYIDSG
RSALKAAGYTGPVSVDTFIAVWINNPELCDYSDYMAVNAHAYFDKNTVAQDSGKWLLE
QIQRWMTACDGKKNVVITESGWPSKGETYGVAVPSKENGKDAVSAITSSCGADTFLFTAF
NDYWKADGAYGVEKKYWGILSNE
```

Slika 7. Aminokiselinska sekvencena Scw4 proteina. Crvenom bojom prikazana je signalna sekvencena Scw4 proteina. Dio označen plavom bojom prikazuje sekvencu koja je deletirana u $\Delta 202Scw4$ konstruktu. Potcrtani dio sekvence deletiran je u $\Delta 231Scw4$ konstruktu.

Za provedbu ove metode potrebno je provesti nekoliko PCR-a reakcija. Za dobivanje konstrukata $\Delta 202SCW4$ i $\Delta 231SCW4$ u prvom koraku PCR-a korištene su početnice Galprom F i $\Delta 202 SCW4 R$, odnosno $\Delta 231 SCW4 R$, kako bi se umnožile regije inducibilnog promotora *GAL1* i početak *SCW4* gena, uzvodno od dijela mutirane regije. U drugom koraku PCR-a upotrebom parova početnica $\Delta 202 SCW4 F$, odnosno $\Delta 231 SCW4 F$, i *Xba SCW4 R* umnožen je dio *SCW4* gena nizvodno od mjesta koji se želi deletirati. Sekvence početnica prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz slijeda nukleotida korištenih kao početnice

Početnice	Sekvence
galprom F	GCTGGAGCTCCACCGCGGGAACGGATTAGAAGCC
Xba SCW4 R	ATGATGATGTCTAGATTCATTGGATAG
Δ202 SCW4 F	CTGCTGCTACTCTTGCTGCTGGTGTCAACACCATCAAGTCTGC
Δ202 SCW4 R	GCAGACTTGATGGTGTGACACCAGCAGCAAGAGTAGCAGCAG
Δ231 SCW4 F	CTGCTGCTACTCTTGCTGCTGGTAACCAAGCTACCCC
Δ231 SCW4 R	GGGGTAGCTTGGTTACCAGCAGCAAGAGTAGCAGCAG

U oba koraka kao lanac kalup korišten je plazmid pBG1805 *SCW4*. Do uvođenja mutacije došlo je jer početnice nisu bile komplementarne dijelu gena koji se želi deletirati. U regijama u kojim nije bile komplementarnosti sa lancem kalupom početnice su bile međusobno komplementarne što je iskorišteno u provedbi trećeg koraka PCR-a. Zahvaljujući komplementarnosti tih početnica došlo je do sparivanja sintetiziranih fragmenata pri čemu su jedan drugome služili i kao lanac kalup i kao početnice za sintezu konačnog mutiranog *SCW4* gena.

Reakcijska smjesa za provedbu prvog i drugog koraka PCR-a sadržavala je 0,3 μL plazmida pB1805 *SCW4*, 5 μL 10 puta koncentriranog pufera za Taq polimerazu, 1 μL smjese dNTP-ova, 1 μL enzima Taq polimeraze, po 2 μL pojedinih početnica i 38,7 μL vode. PCR reakcija provedena je prema uvjetima prikazanim u tablici 5. Faze denaturacija-sparivanje-elongacija ponavljaju se 30 puta.

Tablica 5. Uvjeti provođenja prve PCR reakcije

Faza PCR-a	Temperatura	Vrijeme provođenja
početna denaturacija	95°C	1 min
denaturacija	95°C	45 sec
sparivanje početnica s kalupom	65°C	1,5 min
elongacija	68°C	1,5 min
završna elongacija	68°C	5 min
hlađenje	4°C	∞

Provedbom prvog kruga PCR reakcija dobivena su dva PCR produkta. U sljedećem krugu PCR-a potrebno je povezati ta dva produkta kako bi se dobio konačan konstrukt sa deletiranom ciljnom regijom. Kako bi se odredio volumen otopine pojedinih PCR produkata potreban za njihovo međusobno povezivanje potrebno je odrediti masene koncentracije tih produkata. Koncentracija umnoženih produkata se određuje mjerenjem apsorbancije na 260 nm. Nakon mjerenja apsorbancije na 260 nm pomoću formule se odrede koncentracije:

$$\gamma = A_{260} \cdot f \cdot 50 \mu\text{g/mL}$$

gdje je f faktor razrjeđenja, a faktor $50 \mu\text{g/mL}$ je koncentracija DNA pri kojoj je $A_{260}=1$. Iz koncentracije i poznate duljine konstrukata odredi se volumen otopine fragmenta potreban za ligaciju, kako bi imali ekvimolarne koncentracije fragmenata u reakcijskoj smjesi, pomoću formule:

$$V = L \cdot \frac{M}{\gamma}$$

gdje je L duljina pojedinog konstrukta (kb), M recipročna vrijednost sume duljina fragmenata ($1/\text{kb}$), a γ masena koncentracija otopine fragmenata. U provedbi drugog kruga PCR-a prethodno dobiveni umnoženi fragmenti služe jedan drugome i kao kalup i kao početnice.

Reakcijska smjesa za dobivanje konačnog $\Delta 202$ SCW4 konstrukta sadržavala je $1 \mu\text{L}$ smjese dNTP-ova, $5 \mu\text{L}$ pufera za Taq polimerazu, $0,5 \mu\text{L}$ Taq polimeraze, $3 \mu\text{L}$ fragmenata $\Delta 202_1$ i $\Delta 202_2$ te $37,5 \mu\text{L}$ vode. Reakcijska smjesa za dobivanje konačnog $\Delta 231$ SCW4 konstrukta sadržavala je $1 \mu\text{L}$ smjese dNTP-ova, $5 \mu\text{L}$ pufera za Taq polimerazu, $0,5 \mu\text{L}$ Taq polimeraze, $2 \mu\text{L}$ fragmenta $\Delta 231_1$, $3,6 \mu\text{L}$ fragmenta $\Delta 231_2$ te $37,9 \mu\text{L}$ vode. Reakcija se provodila kroz 15 ciklusa prema uvjetima prikazanim u tablici 6.

Tablica 6. Uvjeti provođenja druge PCR reakcije

Faza PCR-a	Temperatura	Vrijeme provođenja
početna denaturacija	95°C	1 min
denaturacija	95°C	45 sec
sparivanje početnica s kalupom	65°C	1,5 min
elongacija	68°C	2 min
završna elongacija	68°C	5 min
hlađenje	4°C	∞

Nakon što su dobiveni konstrukti *SCW4* gena metodom megapočetnice potrebno je provesti još jednu reakciju PCR kako bi se u velikom broju kopija umnožili dobiveni mutirani konstrukti. Početnice koje se koriste u ovoj PCR reakciji su Galprom F i Xba SCW4 R. U reakcijsku smjesu se doda 10 µL reakcijske smjese prethodno provedenog PCR-a, 0,5 µL Taq polimeraze, 5 µL pufera za Taq polimerazu, 1 µL dNTP-ova, po 1 µL Galprom F i Xba Scw4 R početnica te 31, 5 µL vode. Uvjeti provedbe PCR-a jednaki su uvjetima drugog kruga PCR reakcije s tom razlikom da se faze denaturacija-sparivanje-elongacija ponavljaju 30 puta.

3.2.2. DNA gel elektroforeza

DNA elektroforeza provedena je u 1% agaroznom gelu. Za dobivanje 1% agaroznog gela agarozu je potrebno zagrijavanjem otopiti u TAE puferu (40 mmol/L TRIS-Hac pH=8; 1 mmol/L EDTA). Nakon nanošenja uzoraka u jažice gela podesi se napon od 80 V pri kojem se provodi elektroforeza. Gel se po završetku elektroforeze uranja u vodenu otopinu etidij-bromida (1 mg/L) kako bi se DNA vrpce vizualizirale pod UV svjetlom transiluminatora.

3.2.3. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Izolacija DNA fragmenata iz agaroznog gela provedena je upotrebom "NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up" kita prema uputama proizvođača (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Princip izolacije DNA fragmenata se temelji na vezanju DNA na silica-membranu u prisustvu kaotropnih soli (gvanidin hidroklorid i gvanidin tiocijanat), a do elucije dolazi u uvjetima niske koncentracije soli u blago lužnatom pH.

3.2.4. TA-ligacija PCR konstrukata u plazmid pGEM-T

Prije pripreme ligacijske smjese potrebno je odrediti koncentracije PCR produkata kako bi se mogli odrediti volumeni otopine PCR produkata koji se dodaju u ligacijsku smjesu u količini ekvimolarnoj količini vektora. Mase PCR produkata (insert) računaju se prema formuli:

$$m(\text{insert, ng}) = \frac{m(\text{vektor, ng}) \cdot \text{veličina inserta (kb)}}{\text{veličina vektora (kb)}} \cdot \frac{\text{insert}}{\text{vektor}}$$

Iz izračunatih masa i određenih koncentracija dobije se volumen otopine PCR konstrukata za ligacijsku smjesu. Osim toga se u ligacijsku smjesu dodaje i 1 μL plazmidnog vektora pGEM-T mase 50 ng, 1 μL T4 DNA ligaze, 5 μL pufera za ligazu i vode do ukupnog volumena ligacijske smjese od 10 μL . Ligacijska smjesa se inkubira preko noći na 4°C.

3.2.5. Transformacija kompetentnih stanica *E. coli*

Alikvot kompetentnih bakterijskih stanica 30 minuta se otapa na ledu. Nakon što je alikvot stanica otopljen dodaje mu se 5 μL ligacijske smjese te se inkubira na ledu 30 minuta. Zatim slijedi "heat-shock" 20 sekundi na 42°C nakon čega se smjesa ponovno hladi na ledu tijekom 2-3 minute. Zatim se u smjesu dodaje 950 μL LB tekućeg medija prethodno inkubiranog na 37°C te se gotova smjesa za transformaciju inkubira sat vremena u termobloku na istoj temperaturi. Suspenziju stanica potrebno je još centrifugirati na 8000 rpm kroz 2 minute te ukloniti supernatant u kojemu je hranjiva podloga tako da ostane oko 100 μL supernatanta sa stanicama. Stanice je potrebno nacijepiti na krutu LB+Amp podlogu i inkubirati na 37°C u termostatu preko noći. Nakon što kolonije narastu potrebno ih je precijepiti u 5 mL tekuće LB+Amp podloge i uzgajati pri istim uvjetima.

3.2.6. Izolacija plazmida iz bakterijskih stanica *E. coli*

Stanice *E. coli* uzgajaju se preko noći na 37°C u tekućoj LB+Amp hranjivoj podlozi. Plazmidna DNA se iz prekonodne kulture *E. coli* izolira pomoću "NucleoSpin® Plasmid" kita prema uputama proizvođača (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

3.2.7. Ligacija fragmenata DNA i plazmida YEp351

Plazmidna DNA izolirana iz *E. coli* pocijepana je restrikcijskim enzimima SacI i XbaI te su veličine fragmenata provjerene DNA gel-elektroforezom. Nakon što je potvrđena ispravnost PCR produkata na gelu, fragmente je potrebno izolirati iz gela i izmjeriti njihovu koncentraciju. Masa fragmenta se računa prema formuli navedenoj u poglavlju 3.2.4. (TA ligacija), nakon čega se iz prethodno izmjerene koncentracije odredi volumen fragmenata

koji se dodaje u ligacijsku smjesu zajedno sa 100 ng YEp351 plazmidnog vektora, enzimom T4 ligazom, puferom za ligazu i vodom. Ligacijska smjesa se inkubira na sobnoj temperaturi jedan do dva sata.

3.2.8. Restriksijska analiza PCR produkata

Umnoženi DNA konstrukti ligirani u vektor pGEM-T pocijepani su restriksijskim enzimima SacI i XbaI kako bi se pomoću ljepljivih krajeva mogli ligirati u kvašćev plazmidni vektor YEp351. Cijepanje DNA fragmenata izoliranih iz pGEM-T proveo je restriksijskim enzimom BglI u svrhu provjere ispravnosti konstrukata prije ligacije u kvašćev vektor. Cijepanje je provedeno prema uputama proizvođača restriksijskih enzima (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD).

3.2.9. Transformacija kvasca

Prije transformacije kvasac je potrebno uzgojiti preko noći i ujutro ga razrijediti te dalje uzgajati tako da napravi barem 2 generacije i naraste do 2 OD₆₀₀ jedinice po mililitru, u ukupno 5 mL podloge. Nakon što je kvasac narastao suspenzija se centrifugira pri 4000 o/min tijekom 5 minuta te se podloga sterilno ukloni. Stanice se ispiru sa 10-15 mL sterilne destilirane vode i odcentrifugiraju kako bi se uklonili tragovi hranjive podloge. Zatim se stanice resuspendiraju u 1 mL 0,1 M litijevog acetata i po 1 mL suspenzije se prebacuje u eppendorficu. Suspenzija se centrifugira pri 8000 o/min tijekom 1 minute te se sterilno pomoću pipete ukloni sav litijev acetat. Zatim se dodaje u slojevima redom 240 µL PEG-a (50% w/v), 36 µL 1M litijevog acetata, 25 µL pripremljene jednolančane tzv. „carrier“ DNA (2mg/mL), 50 µL smjese sterilne vode i plazmidne DNA. Smjesa se vorteksira približno minutu dok se ne resuspendira pelet stanica te se inkubira pri 30°C tijekom 30 minuta nakon čega slijedi „heat shock“ pri 42°C tijekom 20 minuta. Suspenzija se centrifugira pri 8000 o/min tijekom 15 sekundi, ukloni se supernatant, stanice se resuspendiraju u 1 mL sterilne vode i 100 µL suspenzije stanica se "striking" metodom nacijepi na selektivne YNB Leu ploče. Kolonijama je potrebno 2 do 4 dana da narastu do odgovarajuće veličine.

3.2.10. Uzgoj kvasca sa indukcijom *GAL* promotora

Gen *SCW4* nalazi se pod kontrolom *GAL1* promotora. *GAL1* promotor u potpunosti je reprimiran pri uzgoju kvasca na podlozi s glukozom te postaje aktivan tek kada se u podlogu u kojoj se uzgaja kvasac doda galaktoza. Prvo je potrebno kvasac uzgojiti na selektivnoj podlozi s 2% glukoze do stacionarne faze u 5 mL medija. Zatim se alikvot uzgojenog kvasca prebacuje na podlogu s 2% rafinoze sa početnim OD₆₀₀ 0,1 i inkubira u tresilici na 30 °C dok kvasac ne naraste do stacionarne faze u 10 mL medija. Zatim se kultura razrijedi do OD₆₀₀ 0,5 i uzgaja u podlozi istog sastava do OD₆₀₀ 1-1,5 u 10 mL medija, nakon čega se prebacuje na podlogu s 2% galaktoze i 2% rafinoze u 50 mL hranjivog medija i uzgaja preko noći u tresilici na na 30 °C.

3.2.11. Izolacija stanične stijenke kvasca

Za izolaciju staničnih stijenki kvasac je potrebno uzgojiti u Erlenmayerovoj tikvici do približno 2 OD₆₀₀ jedinice po mililitru, u ukupnom volumenu od 50 mL tekuće YNB Leu⁻ hranjive podloge. Nakon završenog uzgoja suspenzija stanica se centrifugira 5 minuta na 3000 rpm kako bi se kvaščeve stanice odvojile od podloge. Zaostali talog stanica se ispiru dva puta s destiliranom vodom i dva puta u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 8 uz centrifugiranje između svakog ispiranja. Talog se resuspendira u približno 100 µL istog pufera i dobivena suspenzija se prenosi u epruvete za razbijanje na BeadBug uređaju te se dodaju staklene kuglice u volumenu ~50% volumena suspenzije stanica. Razbijanje stanica se odvija pri brzini od 4000 rpm tijekom 3 minute. Postupak se po potrebi može ponoviti uz inkubiranje suspenzija stanica na ledu između dva intervala razbijanja. Suspenzija razbijenih stanica se centrifugira 2 minute pri 8000 rpm kako bi se odvojio supernatant s intracelularnim sadržajem. Talog stijenki ispiru se 4 puta s po 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH 8.

3.2.12. SDS tretman stijenki

Talogu stijenki dodaje se 1 mL Laemmlijevog pufera (50 mM Tris-HCl pufera pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2% SDS-a, 0,001% boje bromfenol plavo i 5% β -merkaptoetanol) te se talog resuspendira nakon čega se dobivena suspenzija inkubira 10 minuta u vrijućoj vodenoj kupelji. Nakon inkubacije centrifugiranjem tijekom 3 minute pri 8000 rpm se odvoji supernatant koji sadrži nekovalentno vezane proteine stanične stijenke i spremi se na -20°C .

3.2.13. SDS PAGE elektroforeza

Nekovalentno vezani proteini dobiveni ekstrakcijom sa SDS-om razdvajaju se na poliakrilamidnom gelu SDS-elektroforezom po Laemmliju. Prije provedbe elektroforeze potrebno je napraviti gel koji se sastoji od dva dijela: gela za razdvajanje (donji gel) pH 8,8 i gela za sabijanje (gornji gel) pH 6,8. Prvo se napravi gel za razdvajanje koji sadrži 10% akrilamida, 0,3% N, N' – metilenbisakrilamida, 0,1% SDS-a, 0,05% TEMED-a i 5% amonij-persulfata u 1,5 M Tris-HCl puferu pH 8,8. Gel za sabijanje sadrži 4,5% akrilamida, 0,12% N, N' – metilenbisakrilamida, 0,1% SDS-a, 0,075% TEMED-a i 7,5% amonij-persulfata u 0,5M Tris-HCl puferu pH 6,8. Na gotov gel se nanose uzorci proteina SDS-ekstrakta i smjesa LMW (Low molecular weight) standarda. Prije nanošenja, uzorcima SDS-ekstrakta se dodaje Laemmlijev pufer za uzorke (5x koncentriran). Pufer za uzorke sastoji se od 50 mM Tris-HCl pufera pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2% SDS-a, 10% glicerola, 0,001% boje bromfenol plavo i 5% β -merkaptoetanol. Elektroforeza se provodi u 25 mM Tris-glicin puferu pH 6,8 s 0,1% SDS-a pri naponu od 180 V u trajanju od 1 sata i 30 minuta.

3.2.14. Western blot

Nakon završene SDS-elektroforeze razdvojeni proteini se iz poliakrilamidnog gela prenose na nitroceluloznu membranu Western blot metodom kako bi se sa anti-HA antitijelima mogli detektirati proteini SDS-ekstrakta obilježeni –HA oznakom.

Proteini se sa poliakrilamidnog gela prenose "semi-dry" transferom na nitroceluloznu membranu. Za transfer se koristi TRIS-glicinski pufer (TRIS 3,03 g; glicin 14,4 g; metanol

200 mL i destilirana voda 800 mL), a transfer se odvija u uređaju za transfer (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, BioRad) tijekom 25 minuta pri 1 A i 25 V.

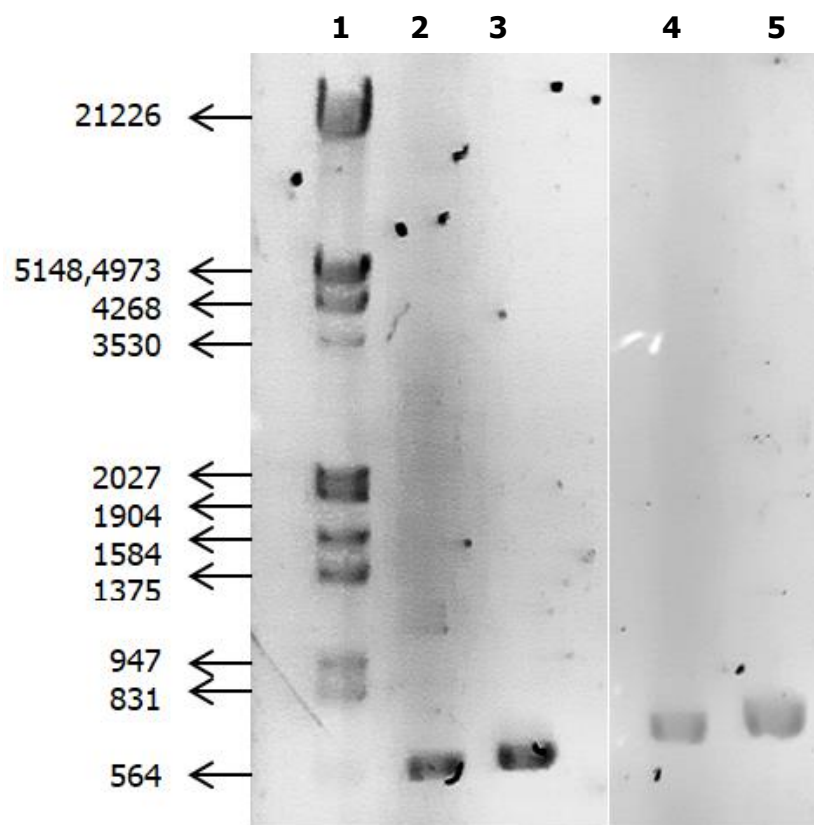
Nakon transfera se nitrocelulozna membrana boja sa Ponceau S bojom (0,1g/100 mL 5%-tne octene kiseline) do pojave vrpce LMW standarda čiji se položaj zabilježi tupom grafitnom olovkom. Destiliranom vodom odbojana membrana se zatim blokira u 10 mL tzv. pufera za blokiranje (50 mM TRIS-HCl pufer pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) sa 2% obranog mlijeka 90 minuta na sobnoj temperaturi i tresilici pri 200 o/min ili preko noći na 4°C. Pufer za blokiranje se odlije i dodaje se novih 5 mL pufera za blokiranje i 5 µL anti-HA antitijela te se inkubira na tresilici kroz 90 minuta. Nakon toga se membrana ispiru sa 10 mL pufera za blokiranje tri puta po 10 minuta na tresilici. Na ispranoj membrani se posebnom kemiluminiscentnom olovkom (WesternSure Pen) označe standardi te se nanosi 800 µL ECL-otopina (Bio-Rad, USA) za razvijanje blota nakon čega slijedi vizualizacija pomoću C-digit uređaja (C-DiGit® Blot Scanner - LI-COR Biosciences).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

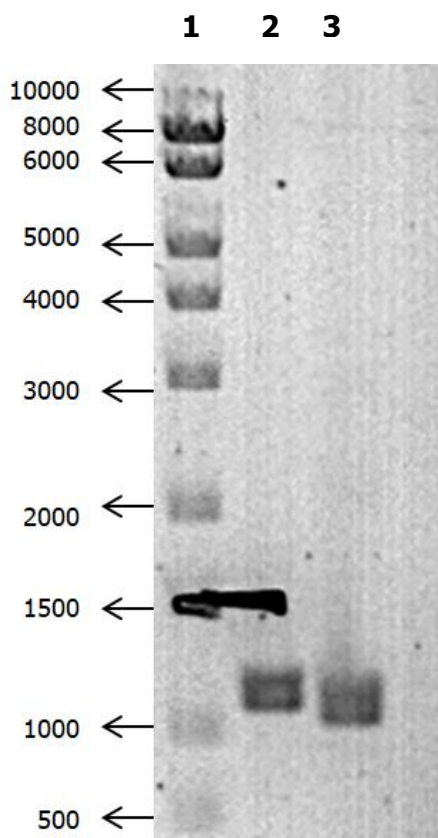
4.1.1. Uvođenje mutacija u gen *SCW4* pomoću PCR-a metodom megapočetnice

U genu *SCW4* ciljne regije su deletirane pomoću PCR-a metodom megapočetnice. U prvom koraku PCR reakcije korištenjem početnica Galprom F i $\Delta 202$ SCW4 R, odnosno $\Delta 231$ SCW4 R, dobiveni su fragmenti $\Delta 202_1$ i $\Delta 231_1$, a pomoću početnica $\Delta 202$ SCW4 F, odnosno $\Delta 231$ SCW4 F i Xba SCW4 R dobiveni su fragmenti $\Delta 202_2$ i $\Delta 231_2$ (slika 8).



Slika 8. DNA gel-elektroforeza PCR-om umnoženih fragmenata. Uzorci: 1. Standard - λ /HindIII+EcoRI; 2. PCR fragment $\Delta 202_1$ (588 pb); 3. PCR fragment $\Delta 202_2$ (590 pb); 4. PCR fragment $\Delta 231_1$ (582 pb); 5. PCR fragment $\Delta 231_2$ (503 pb).

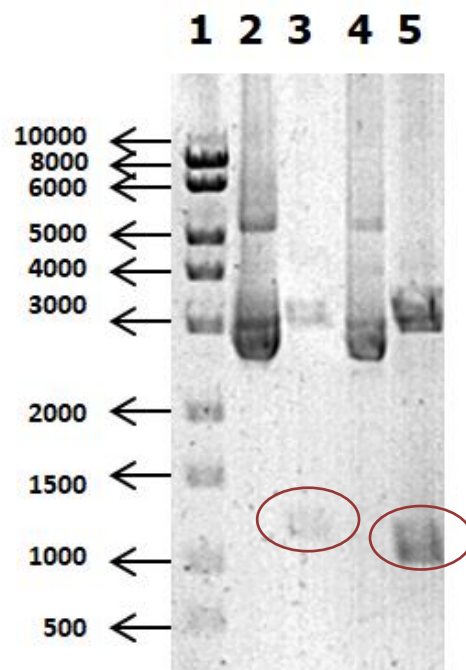
U drugom koraku PCR-a umnoženi su mutirani fragmenti *SCW4* gena korištenjem vanjskih početnica (Galprom F i Xba Scw4 R). Time su dobiveni cijeloviti konstrukti $\Delta 202SCW4$ i $\Delta 231SCW4$ sa uvedenim ciljnim mutacijama, a rezultat je provjeren DNA-elektroforezom što je prikazano na slici 9.



Slika 9. DNA gel-elektroforeza konačnih PCR fragmenata dobivenih povezivanjem PCR fragmenata 1 i 2. Uzorci: 1. Standard – DNA ladder 1kb; 2. PCR fragment $\Delta 202$ SCW4 (1135 pb); 3. PCR fragment $\Delta 231$ SCW4 (1048 pb).

4.1.2. TA-ligacija konstrukata u plazmid pGEM-T i restrikcijska analiza

PCR-om dobiveni mutirani *SCW4* geni ligirani su u plazmid pGEM-T metodom TA-ligacije. Ligacijskom smjesom transformirane su kompetentne bakterijske stanice. Transformanti su selekcionirani na hranjivoj LB podlozi s ampicilinom nakon čega su plazmidi izolirani iz transformiranih stanica. Plazmidi su pocijepani restrikcijskim enzimima SacI i XbaI kako bi se izolirani fragmenti mogli preko ljepljivih krajeva ligirati u kvašćev vektor YEp351, koji također sadrži restrikcijska mjesta za SacI i XbaI. Uspješnost restikcije provjerena je na gelu DNA-elektroforezom čiji je rezultat prikazan na slici 10.

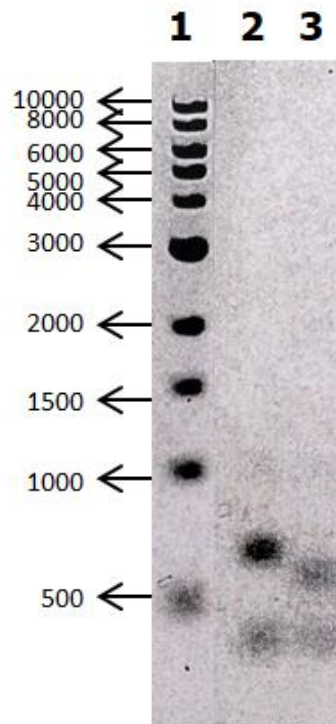


Slika 10. Restrikcijska analiza pGEM-T Δ 202SCW4 i pGEM-T Δ 231SCW4. Uzorci: **1.** Standard - DNA ladder 1kb; **2.** pGEM-T Δ 202Scw4; **3.** pGEM-T Δ 202Scw4 pocijepan sa SacI i XbaI; **4.** pGEM-T Δ 231Scw4. Zaokružene DNA vrpce izolirane su iz gela radi provedbe ligacije u kvašćev plazmidni vektor.

4.1.3. Ligacija mutiranih *SCW4* gena u plazmid YEp351

Mutirani *SCW4* geni (zaokruženi na slici 10) izolirani su iz agaroznog gela pomoću kita za izolaciju prema uputama proizvođača. Izolirani fragmenti se u YEp351 ligiraju pomoću ljepljivih krajeva dobivenih nakon restrikcije sa enzimima SacI i XbaI te se ligacijskom smjesom transformiraju kompetentne stanice *E. coli*. Prije ligacije izoliranih fragmenata u kvašćev plazmidni vektor napravljena je restrikcijska analiza oba fragmenta s restrikcijskim enzimom BglI kako bi se potvrdila njihova ispravnost. Mjesto u genu koje cijepa BglI nalazi se u oba fragmenta te ako su oba fragmenta ispravna doći će do cijepanja na fragmente veličine 713 i 422 pb za konstrukt $\Delta 202SCW4$ te 622 i 422 pb za konstrukt $\Delta 231SCW4$. Cijepanje je provjereno na agaroznom gelu DNA elektroforezom (slika 11).

Nakon umnažanja, plazmidi su izolirani iz bakterijskih transformanata te su izoliranim plazmidima transformirane kompetentne stanice kvasca *S. cerevisiae*.

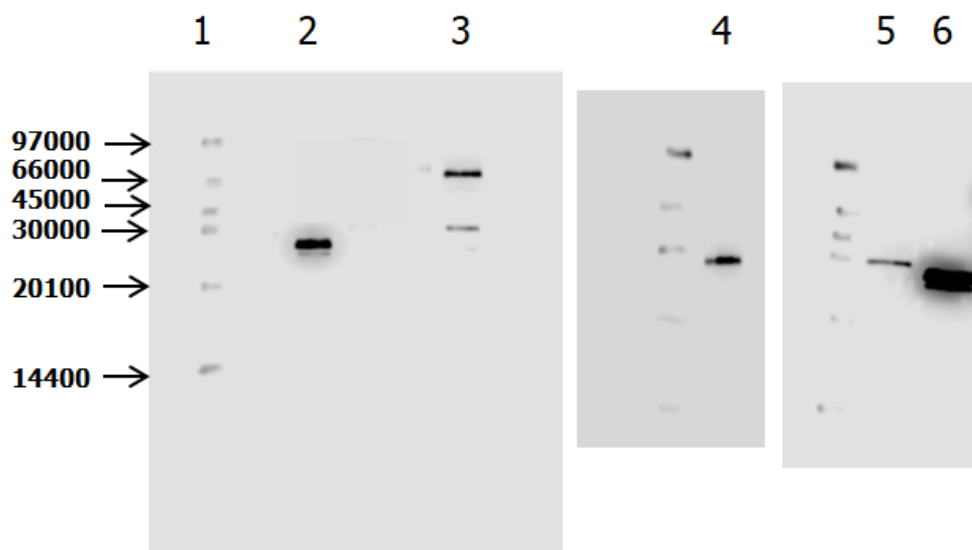


Slika 11. Izolirani mutirani fragmenti *SCW4* gena pocijepani restrikcijskim enzimom BglI.

Uzorci: **1.** Standard – DNA ladder 1kb; **2.** Fragmenti $\Delta 202 SCW4$ (713pb i 422 pb); **3.** Fragmenti $\Delta 231 SCW4$ (622pb i 422 pb).

4.1.4. Provjera uspješnosti ekspresije mutiranih oblika Scw4 proteina u SDS - ekstraktu proteina stanične stijenke pomoću Western blot metode

Kvaščeve stanice transformirane su s YEp351 plazmidima u koje su ligirani delecijски konstrukti *SCW4* gena. Kvasci su uzgajani u YNB Leu⁻ hranjivoj podlozi u uvjetima indukcije *GAL1* promotora pod čijom kontrolom se nalaze konstrukti gena *SCW4*. Nakon uzgoja kvasaca na galaktozi do vrijednosti 2 OD₆₀₀ jedinice po mililitru provedena je izolacija stijenki i proteina stijenke. Proteini stijenke su izolirani kuhanjem u SDS-u uz dodatak β-merkaptotetanolu nakon čega su proteini u SDS-ekstraktu razdvojeni na poliakrilamidnom gelu SDS-elektroforezom. Proteini se iz gela elektroforetski prenose na nitroceluloznu membranu Western blot metodom. Proteini obilježeni sa HA-oznakom detektirani su na membrani anti-HA antitijelima, a rezultat je prikazan na slici 12.



Slika 12. Provjera uspješnosti ekspresije mutiranih oblika proteina Scw4 Western blot metodom na nitroceluloznoj membrani. Uzorci: **1.** LMW proteinski standardi; **2.** Mutirani oblik $\Delta 231$ Scw4 proteina; **3.** Nativni oblik Scw4 proteina; **4.** Mutirani oblik $\Delta 202$ Scw4 proteina; **5.** i **6.** Usporedba veličina (kDa) mutiranog oblika $\Delta 202$ Scw4 i $\Delta 231$ Scw4 proteina.

4.2. Rasprava

Prema dosadašnjim istraživanjima proteini stanične stijenke se svrstavaju u tri skupine, ovisno o tome na koji način ostvaruju nekovalentnu, odnosno kovalentnu kemijsku interakciju sa glukanskim slojem stanične stijenke. Tako se tretmanom stijenke sa vrućim SDS-om uz dodatak β -merkaptetoetanolu mogu izolirati nekovalentno vezani proteini, tretiranjem stijenki s enzimima glukanzama mogu se izolirati proteini koji se u stijenkama vežu kovalentno preko ostataka glikozilfosfatidil-inozitolnog sidra, te inkubacijom stijenki u 30 mM NaOH na 4°C mogu se izolirati kovalentno vezani proteini Pir skupine. Za skupinu od četiri tzv. Pir proteina se zna da imaju izraženu homologiju u sekvenci za koju se pokazalo da je odgovorna za nastanak kovalentne veze sa β -1,3-glukanom u stijenci. Ta sekvenca, koja se pojavljuje kod sva četiri Pir proteina, samo u različitom broju ponavljanja, sastavljena je od 12 aminokiselinskih ostataka. Od tih 12 aminokiselinskih ostataka tri su glutamini te se povezivanjem pobočnog ogranka jednog od njih sa -OH skupinom glukoze koja gradi polimere β -1,3-glukana ostvaruje kovalentno vezanje proteina u stijenkama (Ecker i sur., 2006.). U jednom od prijašnjih istraživanja je pokazano da se nakon tretmana stijenki mutanta kojem nedostaju sva četiri Pir proteina sa 30 mM NaOH u ekstraktu još uvijek pojavljuje proteinska vrpca veličine oko 67 kDa što odgovara veličini Scw4 i Scw10 proteina (Teparić i sur., 2007). Potom je napravljen mutant kojemu je uz Pir proteine uklonjen i protein Scw4. Ovaj mutant je podvrgnut jednakom protokolu izolacije proteina i analiza je pokazala izostanak 67 kDa vrpce prisutne u prethodnom eksperimentu (Teparić i sur., 2007). Time je pokazano da se protein Scw4 osim nekovalentnom veže i kovalentnom vezom u staničnu stijenkama kvasca. Obzirom da mehanizam kovalentnog povezivanja Scw4 proteina nije poznat, prema načinu njegove izolacije pretpostavlja se kako bi mogao biti sličan mehanizmu vezanja Pir proteina. Nakon analize sekvence *SCW4* gena u potrazi za regijom koja bi mogla kodirati za slijed aminokiselinskih ostataka odgovornih za kovalentno vezanje proteina Scw4 na stijenkama kvasca napravljena je delecijaska analiza. Delecijaska analiza podrazumijeva deletiranje dijelova *SCW4* gena te dobivanje niza mutanata kojima se onda provjerava način vezanja dobivenog mutiranog proteina Scw4 u stijenkama. Mutacije se uvode u gen pomoću PCR metode megapočetnice. U ovom radu napravljena su i ispitana dva konstrukta – $\Delta 202SCW4$ i $\Delta 231SCW4$. PCR metodom megapočetnice deletirani su dijelovi gena koji kodiraju za dio sekvence proteina od signalne sekvence do 202.-og, odnosno 231.-og aminokiselinskog ostatka. Mutirani konstrukti umnoženi su PCR-om te su TA-ligacijom ligirani u plazmid pGEM-T. Ligacijskom smjesom su transformirane kompetentne stanice *E. coli* te su iz transformanata poraslih na selektivnoj podlozi izolirani plazmidi koji su zatim

pocijepani sa restrikcijskim enzimima SacI i XbaI. Tim korakom dobiveni su konstrukti sa ljepljivim krajevima preko kojih se mogu ligirati u ciljnu plazmi YEp351 kojim se mogu transformirati kvaščeve stanice. Transformirane stanice kvasca uzgajane su na selektivnoj YNB Leu⁻ podlozi sa galaktozom kako bi došlo do indukcije *GAL1* promotora pod čijom kontrolom se nalaze konstrukti gena *SCW4*. Nakon uzgoja provedena je izolacija proteina stanične stijenke kuhanjem izoliranih staničnih stijenki u SDS-u uz dodatak β-merkaptoetanolu te su proteini iz SDS-ekstrakta razdvojeni SDS-elektroforezom. Western blot metodom detektirani su mutirani Scw4 proteini pomoću antitijela na -HA oznaku. Time je pokazano kako se konstruirani mutirani oblici *SCW4* gena, $\Delta 202SCW4$ i $\Delta 231SCW4$, uspješno eksprimiraju.

S obzirom na to da je za oba Scw4 mutanta vezanje u stijenku dokazano samo u SDS-ekstraktu preostaje ispitati postojanje proteinskih vrpca u 30 mM NaOH ekstraktu kako bi se pokazalo nalazi li se u deletiranoj regiji gena sekvenca koja kodira za aminokiselinske ostatke koji bi mogli biti odgovorni za kovalentno vezanje Scw4 u staničnu stijenku.

5. ZAKLJUČCI

PCR-om dobiveni mutirani oblici *SCW4*, $\Delta 202SCW4$ i $\Delta 231SCW4$, uspješno su ligirani u plazmid YEp351 i ligacijskom smjesom uspješno su transformirane kvaščeve stanice.

Western blot metodom potvrđena je ekspresija i nekovalentno vezanje oba mutirana Scw4 proteina u staničnu stijenku kvasca.

Mutirani oblici proteina Scw4 pokazuju razlike u molekularnoj masi u odnosu na nativni Scw4 protein što je i očekivano obzirom da im nedostaju dijelovi gena koje kodiraju za dio proteina od signalne sekvence pa do 202.-og, odnosno 231.-og aminokiselinskog ostatka.

6. POPIS LITERATURE

1. Brachmann C.B., Davies A., Cost G.J., Caputo E., Li J., Hieter P., Boeke J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**: 115–132
2. Brown T.A. (2010) Gene cloning and DNA analysis, 6. izd., Wiley-Blackwell., str 6-7.
3. Cappellaro C., Mrša V., Tanner W. (1998.) New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *The Journal of Bacteriology*, **180** : 5030–5037
4. Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrša V., Tanner W. (2006.) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-Glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *The Journal of Biological Chemistry*, **281** : 11523-11529.
5. Gietz R.D. and schiestl R.H. (1995.) Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **5** : 255-269
6. Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jaecq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Phillipse P., Tettelin H., Oliver S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, **274**: 546 - 567
7. Grbavac A., Čanak I., Stuparević I., Teparić R., Mrša V. (2016.) Proteolytic processing of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein Scw4 regulates its activity and influences its covalent binding to glucan. *Biochimica et Biophysica Acta*: 507-515
8. Kapteyn J.C., Ram A.F., Groos E.M., Kollar R., Montijn R.C. (1997.) Altered extent of cross-linking of β -1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β -1,3-glucan content. *The Journal of Bacteriology*, **179** : 6279-6284
9. Klebl F., Tanner W. (1989.) Molecular cloning of a cell wall exo- β -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Bacteriology*, **171** : 6259–6264.

10. Kollar R., Petrakova E., Ashwell G., Robbins P.W., Cabib E. (1995.) Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and β -1,3-glucan. *The Journal of Biological Chemistry*, **270** : 1170–1178.
11. Mrša V., Seidl T., Gentsch M., Tanner W. (1997.) Specific Labelling of Cell Wall Proteins by Biotinylation. Identification of Four Covalently Linked O-mannosylated Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13** : 1145–1154
12. Mrša V., Tanner W. (1999.) Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5, Ccw6, Ccw7 and Ccw8 (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **15** : 813-820
13. Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2007.) Binding assay for incorporation of alkali-extractable proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **24** : 259–266.
14. Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2010.) Incorporation of Homologous and Heterologous Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Food Technology and Biotechnology*. **48** : 317–328
15. Teparić R., Mrša V. (2013.) Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. *Current Genetics*, **59** : 171 – 185

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.

Anja Damjanović

ime i prezime studenta