Heterologna ekspresija rekombinantnih enzima za razgradnju atrazina na površini stanične stijenke kvasca Saccharomyces cerevisiae

Debanić, Fran

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:159:028171

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

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 Biotehnologija

Fran Debanić

7203/BT

HETEROLOGNA EKSPRESIJA REKOMBINANTNIH ENZIMA ZA RAZGRADNJU ATRAZINA NA POVRŠINI STANIČNE STIJENKE KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biokemija

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

HETEROLOGNA EKSPRESIJA REKOMBINANTNIH ENZIMA ZA RAZGRADNJU ATRAZINA NA POVRŠINI STANIČNE STIJENKE KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Fran Debanić, 0058207970

Sažetak: Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jedan je od najčešće korištenih mikroorganizama u biotehnologiji, biomedicini i raznim znanstvenim istraživanjima. U ovom radu kvasac se koristio za ekspresiju enzima za razgradnju atrazina koji potječu iz *Pseudomonas sp*. ADP. Atrazin je herbicid koji je zabranjen od strane EU jer zbog svog kumulativnog efekta izaziva onečišćenje okoliša. Metabolički put razgradnje atrazina se sastoji od šest enzimskih reakcija od kojih je svaka katalizirana s po jednim enzimom. Cilj rada je bio eksprimirati i imobilizirati na površini stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* prva četiri enzima metaboličkog puta razgradnje atrazina (AtzA, AtzB, AtzC i AtzD), a u tu svrhu korišteni su proteini stanične stijenke kvasca Pir4 i Ccw12 s kojima su ti enzimi bili genetički fuzionirani. Uspješnost ekspresije i imobilizacije rekombinantih proteina provjeravala se Western blot analizom proteina ekstrahiranih iz izoliranih staničnih stijenki kvasca. Osim toga ispitivala se i aktivnost eksprimiranih rekombinantih enzima u tekućem mediju i na krutoj podlozi u Petrijevim zdjelicama.

Ključne riječi: Atrazin, Ccw12, Pir4, rekombinantni protein, *Saccharomyces cerevisiae*

Rad sadrži: 35 stranica, 8 slika, 3 tablice, 73 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: Izvanredni profesor dr. sc. Renata Teparić

Datum obrane: 19.rujna 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 of Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF THE ATRAZINE DEGRADATION PATHWAY ENZYMES ON THE SURFACE OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae* CELL

Fran Debanić, 0058207970

Abstract: Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most commonly used microorganisms in biotechnology, biomedicine and various scientific research. In this thesis yeast was used to express the atrazine degradation enzymes originated from *Pseudomonas sp.* ADP. Atrazine is a herbicide that is banned from the EU because of its cumulative effect on environmental pollution. The metabolism of atrazine degradation consists of six enzymatic reactions each of which is catalysed with one enzyme. The aim of this study was to express and immobilize the first four enzymes of the atrazine degradation pathway (AtzA, AtzB, AtzC and AtzD) on the surface of the *S. cerevisiae* cell. For this purpose, Pir4 and Ccw12 yeast cell wall proteins were genetically fused with these enzymes. Success of expression and immobilization of the recombinant proteins was verified by Western blot analysis of proteins extracted from isolated yeast cell walls. In addition, the activity of expressed recombinant enzymes in the liquid medium and on the solid substrate in Petri dishes was also investigated**.**

Keywords: Atrazine, Ccw12, Pir4, Recombinant protein, *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis content: 35 pages, 8 figures, 3 tables, 73 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: Associate Professor PhD Renata Teparić

Defence date: 19th of September 2018

SADRŽAJ

1.UVOD.....1

2.TEORIJSKI DIO.....3

2.1. Stanična stijenka.....3

2.1.1 Funkcija stanične stijenke kvasca.....3

2.1.2 Unutarnji sloj stanične stijenke kvasca.....4

2.1.3 Vanjski sloj stanične stijenke kvasca.....7

2.2 Metabolički put razgradnje atrazina.....12

2.3 Heterologna ekspresija proteina na površini stanične stijenke kvasca.....13

3. MATERIJALI I METODE.....16

3.1. Kemikalije.....16

3.2 Sastav otopina i pufera.....16

3.3 Sojevi kvasaca.....18

3.4 Hranjiva podloga korištena u radu.....18

3.5. Plazmidi korišteni u radu.....19

3.6. Metode.....22

3.6.1. Uzgoj stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.....22

3.6.2. Izolacija staničnih stijenki.....23

3.6.3. SDS, NaOH i β-glukanazni tretman staničnih stijenki – priprema uzoraka za elektroforezu.....23

3.6.4. SDS elektroforeza.....24

3.6.5 Western blot.....25

3.6.6 Detekcija aktivnosti enzima.....25

4. REZULTATI.....27

4.1. Ekspresija proteina na staničnoj stijenci.....27

4.2. Rezultati detekcije aktivnosti na krutoj i tekućoj podlozi.....27

4.2.1. Detekcija aktvnosti rekombinantnih enzima Pir4AtzA, AtzACcw12 i Pir4AtzD na krutoj podlozi.....27

4.2.2. Detekcija aktivnosti enzima AtzB i AtzD u tekućoj podlozi.....28

5.RASPRAVA.....30

6.ZAKLJUČCI.....33

7. LITERATURA.....34

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* eukariotski je jednostanični mikroorganizam ovalnog oblika karakterističnog zelenog odsjaja. Često ga se naziva i pekarskim ili pivskim kvascem zbog njegove tradicionalne uloge u procesu dizanja tijesta, odnosno pivskog vrenja. Pripada carstvu *Fungi*, koljenu *Ascomycetes*. Stanice divljeg tipa u prirodi je moguće pronaći na površini zrelog voća, u gastrointestinalnom traktu ljudi i na površini kukaca te toplokrvnih životinja. Pronađen je čak i u vodenim staništima. Genom se sastoji od 12052kb te je prvi potpuno sekvencionirani genom eukariotskog organizma. Zbog toga je danas korišten kao modelni organizam u istraživanju procesa i događaja kao što su starenje, neurodegenerativni poremećaj, apoptoza, stanični ciklus, ekspresija i regulacija gena, metabolizam te mnogi drugi.

Ljudi su koristili kvasac još od prapovijesti neznajući uopće da postoji sve dok Pasteur nije otkrio u prošlom stoljeću njegovu ulogu u procesu fermentacije. Ubrzo nakon toga Hansen je izolirao jednu stanicu pivskog kvasca te tako počeo koristiti čistu kulturu za proizvodnju piva. Njegova prednost je u tome što podnosi visoke koncentracije alkohola, u potpunosti previre glukozu, može metabolizirati disaharide i trisaharide, te je odgovoran za ugodnu aromu proizvoda.

Ubrzanim razvojem i napretkom biotehnologije i genetičkog inženjerstva otvaraju se mogućnosti konstruiranja novih poboljšanih sojeva kvasca koji se mogu koristiti za povećanje prinosa proizvoda ili ekspresiju rekombinantnih proteina i njihovo proučavanje.

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene kvasca *S. cerevisiae* za ekspresiju rekombinantnih enzima atrazin klorohidrolaze (AtzA), hidroksiatrazin etilaminohidrolaze (AtzB), N-izopropilamelid izopropilaminohidrolaze (AtzC) i 2,4-dihidroksi-6-(N'-etil)amino-1,3,5-triazin etilaminohidrolaze (AtzD) iz bakterije *Pseudomonas sp.* Navedeni enzimi sudjeluju u prva četiri koraka metaboličkog puta razgradnje atrazina. Atrazin je herbicid koji je 2004. zabranjen od strane EU zbog zagađenja vode. Ima nisku topivost te je vrlo stabilan spoj, a to uzrokuje njegovu akumulaciju u prirodi te slabu biorazgradivost. Upotrebom ovakvih rekombinantnih

sojeva koji imaju vezan enzim na staničnu stijenku bila bi moguća efikasnija razgradnja reziduala atrazina iz okoliša jer bi supstrat na taj način bio dostupniji enzimima za razgradnju, tj. ne bi se morao transportirati u stanicu da bude razgrađen. Razne se metode koriste za fuzioniranje i ekspresiju željenih proteina, a neke od njih su fuzioniranje s C-terminalnim djelom Aga2 podjednice α-aglutinina, fuzioniranje s GPI proteinima stanične stijenke (npr. Cwp1 i Cwp2), fuzioniranje preko C-terminalnog djela s flokulacijskom domenom proteina Flo1 te sa PIR proteinima koji su pogodni za ekspresiju enzima kojima se aktivno mjesto nalazi u blizini C-terminusa.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Stanična stijenka

2.1.1 Funkcija stanične stijenke

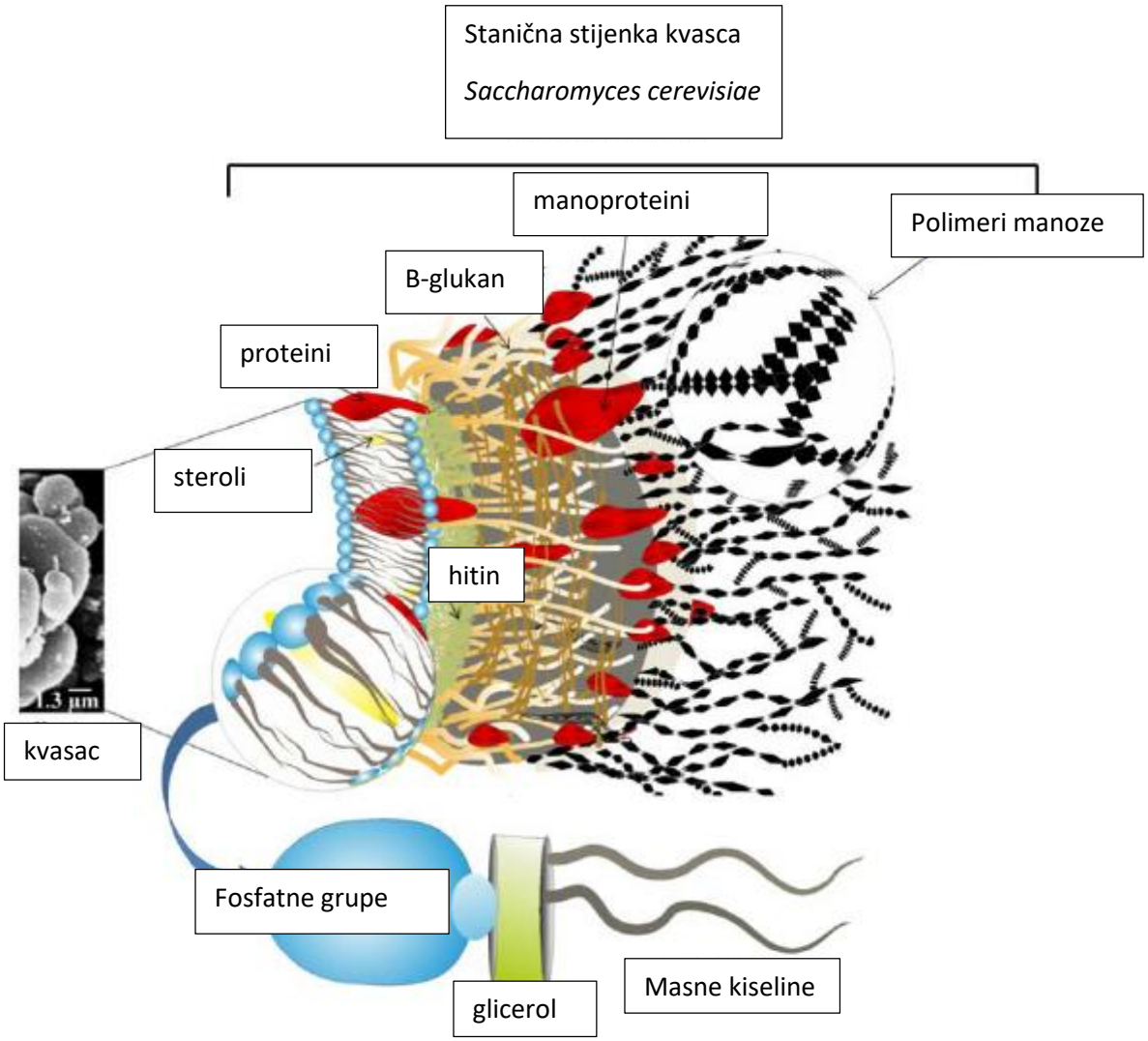
Kvasac posjeduje kompleksnu staničnu stijenku koja ima mnogo funkcija. U tablici 1. navedene su neke od njih.

Tablica 1. Funkcije stanične stijenke kvasca

Otpornost na razlike u osmotskom tlaku unutar i izvan stanice
Otpornost na biološke, kemijske i fizičke utjecaja izvana
Selektivna propusnost za veće molekule
Održavanje oblika stanice
Primanje vanjskih podražaja/signala

Važnost stanične stijenke možda najbolje prikazuje činjenica da je čak 20% gena kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* povezano sa uspostavljanjem strukture stijenke (De Groot i sur., 2001). Osim što je stanična stijenka čvrsta u isto vrijeme je i elastična te ima veliku ulogu tijekom staničnog ciklusa (parenje, sporulacija), odnosno tijekom morfogeneze i rasta može mijenjati oblik i reagirati na vanjske utjecaje te je pod kontrolom CWI (cell wall integrity) signalnog puta.

Sve navedene funkcije proizlaze iz same strukture stanične stijenke koja je složena. Sastoji se od elektron propusnog unutarnjeg sloja te elektron nepropusnog vanjskog sloja (Capellaro i sur., 1998.). Kvasci ulažu velike količine energije za biosintezu stijenke koja ovisno o okolnim uvjetima čini 10-25% mase stanice (Orlean 1997; Smits i sur., 1999; Aguilar-Uscanga i François 2003). Na slici 1. prikazana je struktura stanične stijenke kvasca *S.cerevisiae.*



Slika 1. Prikaz strukture stanične stijenke kvasca *S.cerevisiae* (*https://www.researchgate.net/profile/Ismael_Gonzalez7/publication/256795420/figure/fig1/AS:297809191424001@1448014652026/Structure-of-Saccharomyces-cerevisiae-cell-wall.png*)

2.1.2 Unutarnji sloj stanične stijenke kvasca

Unutarnji sloj stanične stijenke kvasca se sastoji od polimera glukana i hitina (β-1,4-N-acetilglukozamin polimeri) te je odgovaran za mehaničku čvrstoću i elastičnost stijenke. Najveći dio ovog sloja građen je od β-1,3-glukana (80-90%). Preostali dio je građen većinom od β-1,6-glukana (8-18%) te manjim djelom (1-2%) od lanaca hitina (Rees i sur., 1982; Smits i sur., 1999). β-1,3-glukan je razgranati polimer s prosječno 1500 molekula glukoze. Pripada u skupinu molekula koje imaju strukturu tzv. „šupljeg heliksa". To je skupina molekula karakteristične strukture nalik spiralno oblikovanoj žici. Iz toga proizlazi čvrstoća, a ujedno je

takva struktura iznimno fleksibilna (može mijenjati izduženost) te se na taj način može objasniti i elastičnost stijenke (Rees, 1971.). Strukturu β-1,3-glukana potvrdili su Krainer i suradnici (1994.) koristeći $_{13}$C-NMR na živim stanicama. Gore navedeni broj od 1500 molekula glukoze u prosječnom lancu β-1,3-glukana odnosi se na stanice u stacionarnoj fazi. Za sintezu β-1,3-glukana stanica koristi enzimski kompleks β-1,3-glukan sintazu koji sintetizira glukan iz UDP-glukoza (Inoue i sur., 1996; Douglas, 2001.). Djelovanjem antifungalnim agensima direktno na glukan sintazu moguće je onemogućiti sintezu same stijenke te rast kvasaca (Wiederhold i Lewis 2003.; Perlin 2007.). Razina ekspresije β-1,3-glukan sintaze ovisi o tome u kojoj fazi rasta se stanica nalazi te koji je korišten izvor ugljika u podlozi za rast. Kompleks β-1,3-glukan sintaze sadrže Fks1, Gsc2/Fks2 i Fks3 proteine. Fks1 eksprimiran je tokom vegetativnog rasta, Fks2 tokom sporulacije, a Fks3 je neistražen.

Usko povezani geni *FKS1* i *FKS2* kodiraju za katalitičke podjedinice glukan sintaze (Douglas i sur. 1994., Mazur i sur. 1995.; Ram i sur. 1995.). Fks1 i Fks2 su veliki transmembranski proteini koji imaju središnju domenu u citoplazmi. Mutacije u proteinu Fks1 rezultiraju rezistencijom na antifungalne agense (Douglas 2001.). Ta spoznaja ukazuje da takvi agensi djeluju na katalitičku podjedinicu glukan sintaze, ali nije poznat mehanizam njihovog djelovanja. β-1,3-glukan sintaza aktivira se pomoću proteina Wsc1 preko Rom2 proteina, a inhibira djelovanjem Lrg1 proteina iz grupe Rho1 proteina (Watanabe i sur., 2002.).

Nije poznato produžuju li se lanci β -1,3-glukana na reducirajućem ili nereducirajućem kraju. S obzirom da je potvrđena polimerizacija na nereducirajućem kraju polimera poput hitina, celuloze ili homogalaktouronana, pretpostavlja se da takav mehanizam reakcije ima i β -1,3-glukan sintaza (Klis i sur., 2006.). Osim toga, time bi reducirajući kraj bio slobodan za vezanje s drugim komponentama stijenke.

β -1,3-glukan sintetizira se kao ravnolančana molekula pa su za razgranjenje takve molekule potrebni procesirajući enzimi. Isto tako, takvi enzimi potrebni su da bi se molekula β -1,3-glukana integrirala u već postojeću glukansku mrežu. Smatra se da u skupinu

enzima koji kataliziraju reakcije razgranjenja glukana i povezivanja glukana sa drugim komponentama stijenke spadaju proteini poput Gas1 (endotransglikozilaze odgovorne za produživanje i pregradnju lanaca) i BgI2 (endotransglikozilaze odgovorne za sintezu intralančanih β -1,6-glikozidnih veza) (Goldman i sur., 1995.).

Za razliku od β-1,3-glukana, drugi gradivni element unutarnjeg sloja, β-1,6-glukan, građen je od prosječno 130 molekula glukoze te je visoko razgranat i topljiv. Uloga mu je da poveže β-1,3-glukansku mrežu s proteinima stanične stijenke koji se u stijenku vežu preko ostatka glikozilfosfatidilinozitol (GPI) sidra. GPI je kratkolančani lipid vezan na C-terminalni kraj proteina i javlja se kao jedna od posttranslacijskih modifikacija.

Sinteza β-1,6-glukana se provodi β-1,6-glukan sintazama koja povezuje oko 130 jedinica glukoze (Orlean, 2012.). U ovisnosti o aktivnosti proteina smještenih u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevom aparatu i na površini stanice, mijenja se razina β-1,6-glukana u unutarnjem sloju. Kre6 i Skn1 su glukozil transferaze koje se pretežno nalaze u Golgijevom aparatu (Roemer, 1994.). U endoplazmatskom retikulumu se nalaze proteini Cwh41, Gls2, Kre5, i Cne1, a na površini stanične stijenke Kre1, Kre9 te Knh1 (Boone i sur., 1990; Klis, 1994.; Montijn i sur., 1994.; Orlean, 1997.).

Osim β-1,6-glukana, dodatna molekula zastupljena u unutarnjem sloju stijenke je hitin. Hitin se javlja u obliku dva antiparalelna lanca, uglavnom oko ožiljaka na stanici (nakon pupanja). To je polimer građen od otprilike 190 molekula N-acetilglukozamina. Hitin je strukturno vrlo sličan α-celulozi upravo zbog oblika dva antiparalelna lanca povezana vodikovim vezama koji se nereducirajućim krajevima vežu za β-1,3-glukan i β-1,6-glukan.

Sinteza hitina strogo je regulirana. Sintezu hitina kataliziraju tri hitin-sintaze, hitin sintaze I (Chs1), hitin sintaze II (Chs2) i hitin sintaze III (Chs3), aktivirane i locirane u plazma membrani, a sama razina hitina u stijenci vrlo je varijabilna ovisno u uvjetima i fazi rasta (Klis, 2006.).

Uglavnom je količina hitina u stijenci mala (1-2 % suhe tvari stanične stijenke). Međutim, taj

postotak raste i do 20 % u slučaju oslabljene stanične stijenke i aktivacije mehanizama spašavanja stanice (Klis, 2006.).

U trenutku kad je stanica spremna za pupanje, hitin sintaza formira hitinski prsten iz kojeg, naposljetku, apikalno raste pup. Hitinski prsten, vezan na β-1,3-glukansku mrežu, posljedično definira debljinu spone između pupa i stanice majke uz stabilizaciju stijenke same stanice majke. Kad je stanica majka spremna za pupanje, hitin sintaza III producira hitin koji ocrtava mjesto ožiljka. Stanična stijenka se na tom mjestu počinje stanjivati i upravo to formira takozvani ožiljak na samoj površini stijenke. Osim inicijacije pupanja stanice, sintetizirani hitin s vremenom, širenjem centripetalno od postojećeg prstena, sudjeluje u formiranju primarnog septuma što rezultira razdvajanjem pupa od stanice majke. Primarni septum počinje izvana i iznutra prekrivati sekundarni septum, a kad je on potpuno formiran, stanica kćer eksprimira hitinazu koja razgrađuje hitinski primarni sloj što, uz sudjelovanje drugih degradacijskih enzima, dovodi do odvajanja stanice kćeri od stanice majke ostavljajući na njoj trajni ožiljak (Cabib i sur., 1982.)

2.1.2 Vanjski sloj stanične stijenke kvasca

Uloga vanjskog sloja stijenke je da daje naboj i regulira permeabilnost stanične stijenke te je odgovoran za seksualna obilježja i potencijalno patogenost (Orlean, 1997.). Glavni gradivni element vanjskog sloja stijenke su manoproteini koji su zapravo glikozilirani proteini, a na bočnim ograncima mogu imati vezane različite supstituente te na taj način pridonose kemijskoj raznolikosti stanične stijenke. Manoproteini su polipeptidi s vezanim razgranatim polimerom manoze, mananom. Udio ugljikohidrata u molekuli je od 50 do 95 % (Orlean, 1997.). Aminokiselinski ostaci vezani su na manozu N- ili O- glikozidnim vezama preko asparaginskih, odnosno, treoninskih ili serinskih ostataka. N-glikozidni lanci prekrivaju površinu stanične stijenke i sprečavaju kontakt molekula iz okoline stanice sa unutarnjim slojevima stijenke. O-

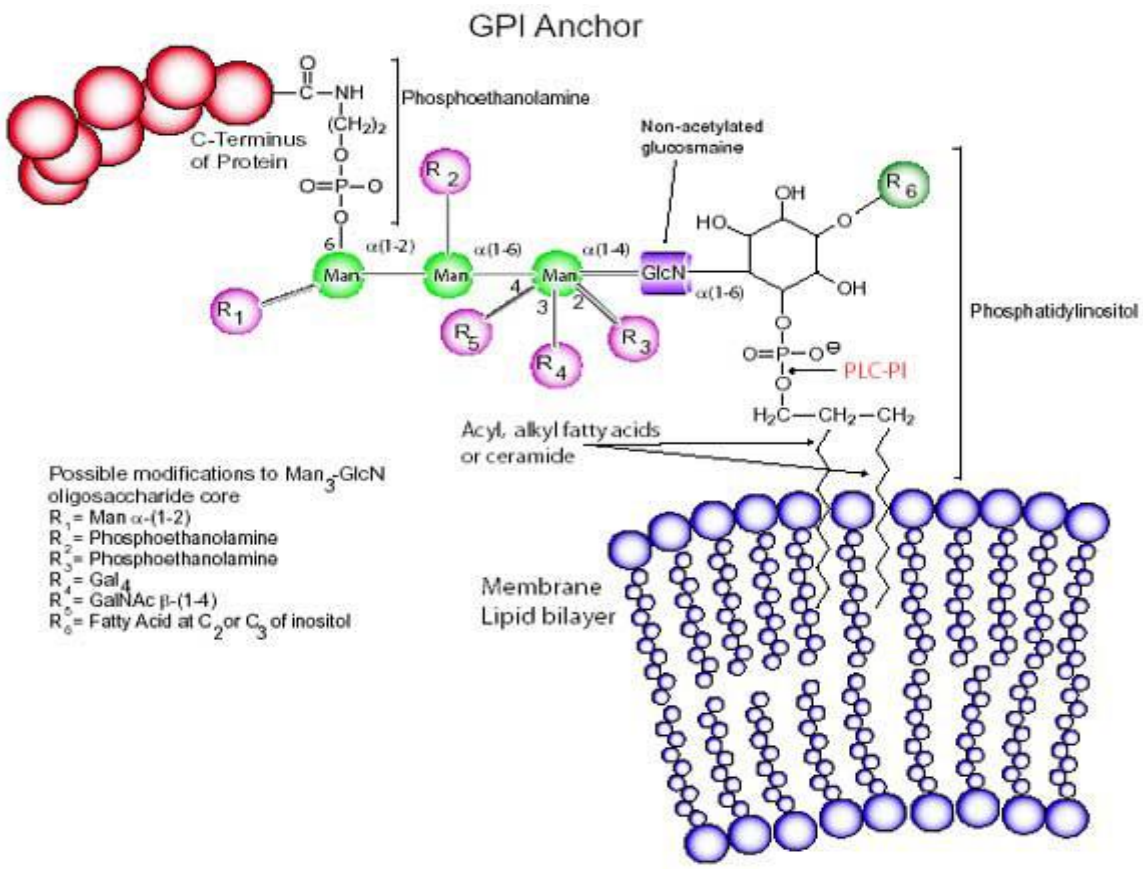
glikozilacija je vrlo bitna za pravilno formiranje stanične stijenke. Narušavanje O-glikozilacije dovodi do pretjerane razgradnje manoproteina, kao i do smanjenja udjela β-1,6-glukana u staničnoj stijenci. Pretpostavlja se da sinteza β-1,6-glukana, njegova lokalizacija i funkcioniranje ovise o O-glikozilaciji (Gentszch i sur., 1996.). Poznati primjeri O-glikoziliranih proteina bitnih za pravilnu sintezu stanične stijenke su Kre9 i Gas1/Ggp1. Pretpostavlja se da je uloga Kre9 povezivanje novonastalih lanaca β-1,6-glukana u staničnu stijenku dok Gas1/Ggp1 ima β-1,3-glukanoziltransglikozilaznu aktivnost (Lesage i Bussey, 2006.).

Funkcija i djelovanje velikog broja manoproteina stijenke još uvijek nije poznata, ali pretpostavlja se da neka svojstva kao npr. prisutnost negativnog naboja zbog fosfatnih grupa proizlazi iz kemijske strukture manoproteina. Ipak, neke funkcije manoproteina (α-D-manan) su poznate, a to su omogućavanje interakcija među stanicama, interakcije s okolinom te određivanje imunospecifičnosti kvasca (Ruiz-Herrera, 1996.). Manoproteine stijenke je moguće podjeliti u dvije skupine, ovisno o tome kako su vezani s ugljikohidratnim komponentama stijenke, i to na kovalentno i nekovalentno vezane manoproteine.

Nekovalentno vezani proteini uglavnom su O-glikozilirani te čine oko 80 % manoproteina stanične stijenke (Cappellaro i sur., 1998.). Njihova je raspodjela u staničnoj stijenci potpuno ravnomjerna, a analizama je utvrđeno da posjeduju veliki udio homologije s enzimima glikozidazama i transglikozidazama (Biondo i sur., 2005.). Zbog uloge tih enzima u intramolekulskoj pregradnji β-glukana u staničnoj stijenci tijekom životnih procesa, kao što su rast, pupanje, parenje i sporulacija, smatra se da ovi proteini imaju ulogu u spomenutim promjenama (Teparić i sur., 2010.).

Kovalentno vezani proteini se mogu podjeliti u dvije podskupine. Jedna skupina se u stijenku veže preko ostatka glikozilfosfatidilinozitol (GPI) sidra, a druga su tzv. PIR proteini. GPI se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu stanice u više koraka. Fosfolipidni supstrat, fosfatidilinozitol, kao i UDP-N-acetilglukozamin, dolihol–fosfatidil-manoza i fosfatidil-etanolamin, sintetizirani su u citosolu stanice i potom transportirani u vanjsku membranu

endoplazmatskog retikuluma. Analize pokazuju da su enzimi bitni za sintezu molekule GPI, GPI-transferaze i N-acetilaze, lokalizirani u vanjskoj membrani, no njihovo je aktivno mjesto okrenuto prema lumenu endoplazmatskog retikuluma (Fujita i sur., 2009.). Prvi korak u sintezi GPI sidra jest premještanje N-acetilglukozamina s UDP-N-acetilglukozamina na fosfatidilinozitol. Dobiveni N-acetilglukozamin-fosfatidilinozitol potom je deaciliran te nastaje glukozamin-fosfatidilinozitol. Ovakav deacilirani glukozamin vrlo je specifičan za sintezu GPI sidra i za sada je poznato djelovanje triju enzima uključenih u njegovu sintezu (Doering i sur., 1989.; Stevens i Raetz, 1991.), a geni koji kodiraju za ta tri enzima su *GPI1, GPI2* i *SPT14* (Doering i Franzot, 1999.). Potom se na njega veže dolihol–fosfatidilmanoza, a na reducirajući kraj svake treće manoze nadodaje se etanolamin-fosfat, čiji je donor fosfatidil-etanolamin. Nakon toga molekula GPI prolazi kroz modifikacije (Conzelmann i sur., 1986.). Proteini koji su ovisni o GPI sidru imaju na N-terminalnom kraju sekvencu koja omogućuje njihov transport do endoplazmatskog retikuluma, a na C-terminalnom kraju imaju sekvencu na koju se veže GPI sidro transaminacijom nakon što se proteolitički ukloni ta signalana sekvenca. Nakon vezanja sidra slijedi transport manoproteina do plazma membrane za čiju su uspješnost odgovorni sfingolipidi (Horvath i sur., 1994.). Na slici 2. prikazano je kako se protein povezuje s GPI sidrom te nakon toga sa stijenkom.



Slika 2. Prikaz načina vezanja C-terminalnog djela proteina s GPI sidrom *(https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/biochemicals/migrationbiochemicals1/GPI-Anchor.jpg)*

Skupini GPI proteina pripadaju proteini iz tzv. GAS i TIR obitelji, aglutinini i flokulini nalik lektinima. GAS obitelji se sastoji od pet članova, a zasad je poznato da posjeduju aktivnost remodeliranja glukana. Najistraženiji predstavnik te skupine, Gas1p, pokazuje transglikozidaznu aktivnost formiranjem β-1,3-glikozidne veze između reducirajućeg kraja jednog glukanskog lanca i nereducirajućeg kraja drugog (Hartland i sur., 1996.; Mouyna i sur., 2000.). TIR obitelj proteina također je slabo istražena i za sada nisu detaljno poznate njihove funkcije. Primjećeno je da su razine ekspresije gena za pojedine članove ove skupine različite pri anaerobnim uvjetima uzgoja. U tu skupinu spadaju proteini poput Cwp1p, Cwp2p, Dan1p, Dan2p, Tir1p, Tir2p, Tir3p, Tir4p te Tip1p. Primjećeno je da ekspresija gena za Cwp1p, Cwp2p i Tip1p varira u odnosu na trenutnu fazu staničnog ciklusa (Smits i sur., 2006.) te da su Dan1p,

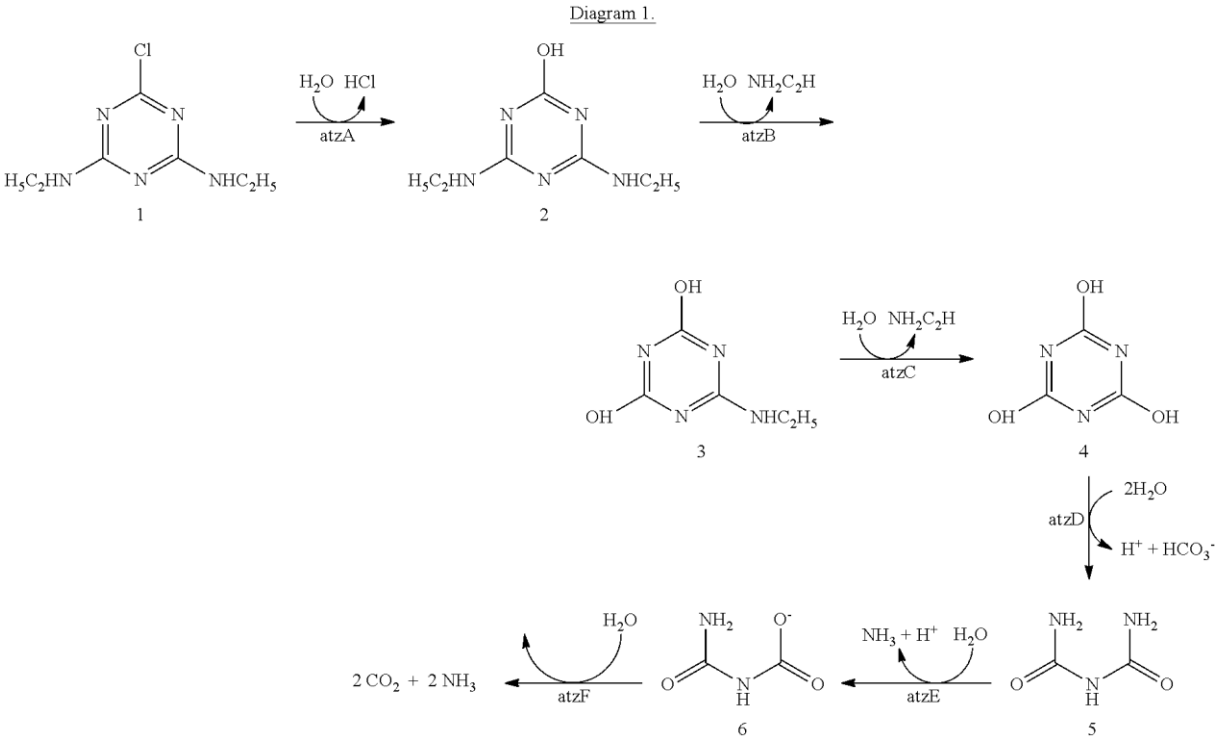
Dan3p, Dan4p i Tir4p odgovorni za apsorpciju sterola pri anaerobnim uvjetima (Wilcox i sur., 2002.). Flokulini su odgovorni za flokulaciju, dok su aglutinini proteini potrebni za povezivanje α- i a- tipa stanica tokom parenja. Detaljnije su istražene i egzoglukanaza Exg2 i transglikozidaze Crh1 i Utr2/Crh2 čija je funkcija stvaranje veze između β-1,3-glukana i hitina (Teparić i sur., 2010.). PIR proteini koriste drugi mehanizam vezanja za staničnu stijenku. Kratica PIR potječe od karakterističnih sekvenci koje se ponavljaju u N-terminalnom dijelu ove skupine proteina (eng. proteins with internal repeats), a geni koji kodiraju za njih su *PIR1, PIR2, PIR3* i *PIR4* (Toh-e i sur., 1993.). Obilježavaju se kraticom Ccw koja označava kovaletno vezanje proteina za staničnu stijenku (eng. covalently linked cell wall proteins). Za sada su poznata četiri proteina s jednim do jedanaest ponavljanja repetitivne sekvence – Pir1/Ccw6, Pir2/Ccw7, Pir3/Ccw8 i Pir4/Ccw5. Za sve PIR proteine zajedničko je da ne sadrže GPI signalnu sekvencu, da je za njihovo procesiranje odgovorna Kex2 endoproteaza te da su direktno vezani na β-1,3-glukan esterskom vezom. Većinom su O-glikozilirani s visokim udjelom serina i treonina te karakterističnom N-terminalnom signalnom sekvencom koja ih vodi u sekretorni put. Isto tako sadrže i repetitivnu sekvencu koja je odgovorna za kovalentno vezanje za staničnu stijenku, QIGDGQVQ. Još se uvijek ne zna koja je uloga PIR proteina, ali smatra se da je jedna od uloga održavanje integriteta stanice zato što sojevi koji imaju inaktivirane *PIR* gene pokazuju nepravilan rast i veću osjetljivost na osmotin koji narušava strukturu stijenke (Kapteyn i sur., 1999.). PIR proteini sudjeluju i u određenim fazama staničnog ciklusa. Tako se npr. povećana ekspresija proteina Pir1 može uočiti u kasnoj M te ranoj G1 fazi staničnog ciklusa (Bony i sur., 1998). Ekspresija *PIR1, PIR2* i *PIR3* povećava se prilikom odvajanja stanice kćeri od stanice majke (Spellmann, 1998.). Od svih proteina PIR obitelji, najviše istražen je Pir4/Ccw5. Utvrđeno je da taj protein ima samo jednu potpunu repetitivnu sekvencu čijom je delecijom izazvana sekrecija proteina u okolni medij. Sličan efekt izaziva i promjena triju glutaminskih (Gln69, Gln74 i Gln76) ili jednog asparaginskog ostatka (Asp72) unutar te sekvence. Detaljnijom analizom utvrđeno je da samo Gln74 prolazi kroz modifikacije te da je

vjerojatno on direktno odgovoran za kovalentno vezanje proteina za staničnu stijenku (Ecker i sur., 2006.).

2.2 Metabolički put razgradnje atrazina

Atrazin je herbicid koji pripada skupini s-triazina. S obzirom na akumulaciju u okolišu i njegovu toksičnost, danas se posvećuje pažnja istraživanjima i primjeni ekspresije rekombinantnih enzima za katabolizam atrazina. Metabolički put razgradnje atrazina se sastoji od šest reakcija od kojih je svaka katalizirana jednim enzimom. Primarni mehanizam razgradnje je biološka degradacija tokom koje se događa dekloriranje do hidroksiatrazina koji se dealkilacijom transformira u N-izopropilamelid te onda u cijanuričnu kiselinu (Cook i sur., 1985.; Dutta i Singh 2013.). Geni koji kodiraju za enzime ovog metaboličkog puta u čistim bakterijskim kulturama u aerobnim uvjetima su dobro poznati i karakterizirani (Vibber i sur., 2007.). Najpoznatiji mikroorganizam za biološku degradaciju atrazina je *Pseudomonas sp*. ADP te mu je ovaj metabolički put dobro proučen (Mandelbaum i sur., 1995; De Souza i sur., 1998). Ovaj soj posjeduje plazmid pADP-1 na kojem se nalaze *atz* geni koji kodiraju za odgovarajuće enzime (Martinez i sur., 2001.). Geni *atzA, atzB* i *atzC* kodiraju za prva tri enzima dok *atzDEF* operon kodira za ostatak enzima na putu razgradnje (De Souza i sur., 1996; Boundy-Mills i sur., 1997; Sadowsky i sur., 1998; Garcia-Gonzalez i sur., 2005.). Operon se aktivira LysR regulatorom koji se eksprimira pri smanjenoj koncentraciji dušika i u prisustvu cijanurične kiseline te se cijanurična kiselina prevodi u ugljični dioksid i amonijak (Shapir i sur., 2005; Porrua i sur., 2010.). *Atz* geni su široko rasprostranjeni te su pronađeni u mikroorganizmima izoliranim u Kanadi, SAD-u, Čileu, Francuskoj, Hrvatskoj, Kini, Brazilu, Indiji i Egiptu sa sličnostima od 97% (Vaishampayan i sur., 2007; Hernandez i sur., 2008; Sene i sur., 2010; El Sebai i sur., 2011; Fernandes i sur., 2014.). Osim u *Pseudomonas sp*, *atz* geni pronađeni su i u rodovima *Caulobacter, Variovorax, Rhizobium, Sphingomonas, Burkholderia, Nocardia, Flavobacterium, Achromobacter, Arthrobacter, Ensifer* i drugim (Smith i sur., 2005;

Vaishampayan i sur. 2007; Udiković-Kolić i sur. 2010; El Sebai i sur., 2011.). Na slici 3. prikazane su reakcije razgradnje atrazina.



Slika 3. Prikaz metaboličkog puta razgradnje atrazina

(*http://patentimages.storage.googleapis.com/US20090017525A1/US20090017525A1-20090115-C00001.png*)

2.3 Heterologna ekspresija proteina na površini stanične stijenke kvasca

Ova tehnika poznata pod nazivom „yeast surface display" danas pronalazi veliku primjenu u biokemiji, medicini, biomedicini i biotehnologiji. Velike se mogućnosti otvaraju primjenom ove tehnike u proteinskom inženjerstvu s ciljem povećanja stabilnosti, afiniteta prema supstratima i drugih karakteristika proteina. Metoda se temelji na fuzioniranju željenog proteina s proteinom vezanim u staničnu stijenku. Proteini se najčešće proteinskim inženjerstvom mijenjaju s ciljem povećanja stabilnosti, afiniteta vezanja sa specifičnim molekulama (npr.

enzim-susptrat, protein-antitijelo), te povećane termostabilnosti. Osim proteinskog inženjerstva „yeast display" se koristi i kod mapiranja proteina, identifikacije protein-protein interakcija te konstruiranja stanica kvasaca za različite namjene. Kod kvasaca se najčešće vezanje željenog proteina u staničnu stijenku izvodi tako da se gen koji kodira za protein fuzionira s genom koji kodira za Aga2 podjedinicu α-aglutinina, točnije s C-terminalnim djelom Aga2 podjedinice. Primjer uspješnog fuzioniranja te ekspresije je bio kada su Ryckaert i suradnici 2005. godine fuzionirali gen za trans-sialidazu iz *Trypanosoma cruzi* s C-terminalnim djelom Aga2p te je takav soj korišten za sialilaciju sintetičkih oligosaharida. Osim Aga2 za heterolognu ekspresiju mogu se koristiti i GPI proteini stanične stijenke kao npr. Cwp1, Cwp2, Tip1, Sed1 i Tir1 kojima je uspješno izložena β-galaktozidaza na površini stijenke kvasca (Van der Vaart i sur., 1997.). Neki od njih kao što su Cwp2 i Sed1 pokazali su se kao bolji nosači te je uspješnost heterologne ekspresije na površini stijenke šest do osam puta veća, nego kod korištenja α-aglutinina (Van der Vaart i sur., 1997.). Flo1 sustav je još jedna od često korištenih modela heterologne ekspresije u kojoj se željeni protein fuzionira preko C-terminalnog djela s flokulacijskom domenom proteina Flo1 koja se nekovalentno veže s mananom u staničnoj stijenci (Kondo i Ueda, 2004.). Sato i sur. (2009.) su pokazali da se zbog dugačkog sidra povećava aktivnost glukoamilaze prema polimernim supstratima ako se fuzionira s Flo1. Još jedan primjer je fuzioniranje lipaze iz *R. oryzae* s Flo1 gdje je lipaza pokazala povećanu aktivnost (Matsumoto i sur., 2002; Nakamura i sur., 2006.). Heterologna ekspresija korištenjem PIR sustava je pogodna za enzime kojima se aktivno mjesto nalazi blizu C-terminusa. Usporedbom nekoliko PIR proteina pokazano je da se fuzijom s *PIR3* enzim eksprimira s većom aktivnosti nego kod fuzioniranja s *PIR1* i *PIR4* što ukazuje na to da se fuzijski proteini s *PIR3* efikasnije i homogenije lokaliziraju u staničnoj stijenci (Sumita i sur., 2005.). Shimma i sur. (2009.) su fuzionirali katalitičke regije 51 različite humane sialil-, fukozil-, galaktozil-, N-acetil galaktozaminil-, i N-acetil glukozaminil transferaze s Pir1, Pir3 i Pir4

proteinima te ih je 40 pokazalo aktivnost. Osim toga *PIR1* i *PIR3* fuzije pokazale su sinergijski efekt ako su se eksprimirale simultano.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 KEMIKALIJE

- Kvaščev ekstrakt i kvaščeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) – Biolife (Milano, Italija)
- Aminokiseline i nukleotidi: histidin, uracil, leucin, triptofan, lizin – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- ECL-otopine za razvijanje blota – Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, SAD)
- Standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- Amonijev persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, Triton X-100, β-merkaptoetanol, Na-dodecilsulfat (SDS) – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) – LKB Produkter AB (Bromma, Švedska)
- Ponceau S i polietilenglikol 4000 (PEG 4000) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- Anti-HA antitijela – Roche Diagnostics DmbH (Mannheim, Njemačka)
- D (+) glukoza bezvodna – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- D (+) rafinoza pentahidrat – Acros Organics (SAD)
- D (+) galaktoza – Acros Organics (SAD)

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

3.2 Sastav otopina i pufera

<u>Laemmli pufer</u>

50 mM Tris-HCl pufer pH 6.8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 5% β -merkaptoetanol, 0,001% bromfenol plavo

<u>TE - pufer</u>

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5-8

<u>Tris-HCl pufer pH 8.8 za donji gel</u>

68,2 g Tris-a, 1,5 g SDS-a, 500 mL destilirane vode

Tris-HCl pufer pH 6.8 za gornji gel

8,4 g Tris-a, 0,55 g SDS-a, 500 mL destilirane vode

Otopina akrilamida i bisakrilamida (30%)

60 g akrilamid, 1,6g bisakrilamid, 200mL destilirana voda

Amonijev persulfat - APS

10 g amonijevog persulfata, 100 mL vode

Pufer za elektroforezu (10x koncentriran, 1L)

30 g Tris-a, 144 g glicina, 10 g SDS-a, destilirana voda

Pufer za uzorke, 25 mL, 5x koncentriran, pH 6.8

0,75 g Tris-a, 0,095 g EDTA III, 2,5 g SDS-a. 10 mL glicerola, 6.25 mL β -merkaptoetanola, brom-fenol plavo

Karbonatni pufer za Western blot

1 g $NaHCO_3$, 0,33 g Na_2CO_3, 200 mL metanola, 800 mL destilirane vode.

Ponceau S boja

0,1 g boje, 100 mL 5% octene kiseline

Pufer za blokiranje (1 L)

6 g Tris-a, 8,8 g NaCl, 0,1% Triton X-100

50 mM K-fosfatni pufer pH 8 (1L)

16,51 g kalijev hidrogen fosfat i 0,708 g kalijev dihidrogen fosfat

3.3 Sojevi kvasaca

U Tablici 2 prikazani su sojevi kvasaca korišteni u eksperimentalnom radu.

Tablica 2. Genotip sojeva kvasca korištenih u radu

soj	genotip
Y00000 Pir4 - AtzA	MAT a, *his3*Δ, *leu2*Δ, *met15*Δ, *ura3*Δ + YEp351Pir4atzA plazmid
Y00000 Pir4 - AtzC	MAT a, *his3*Δ, *leu2*Δ, *met15*Δ, *ura3*Δ + YEp351Pir4atzC plazmid
Y00000 Pir4 - AtzD	MAT a, *his3*Δ, *leu2*Δ, *met15*Δ, *ura3*Δ + YEp351Pir4atzD plazmid
Y00000 Ccw12 - AtzA	MAT a, *his3*Δ, *leu2*Δ, *met15*Δ, *ura3*Δ + YEp351Ccw12atzA plazmid
Y00000 Ccw12 - AtzB	MAT a, *his3*Δ, *leu2*Δ, *met15*Δ, *ura3*Δ + YEp351Ccw12atzB plazmid
Y00000 Ccw12 - AtzD	MAT a, *his3*Δ, *leu2*Δ, *met15*Δ, *ura3*Δ + YEp351Ccw12atzD plazmid
Y00000 Pir4	MAT a, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, ura3Δ + Yep351Pir4 plazmid
Y00000 Ccw12	MAT a, his3Δ, leu2Δ, met15Δ, ura3Δ + pRS425Ccw12 plazmid

3.4 Hranjiva podloga korištena u radu

U tablici 3. prikazan je sastav hranjivih podloga korištenih u eksperimentalnom radu. Podloge su sterilizirane autoklaviranjem (20 min., 121 °C, 1 Atm).

Tablica 3. Prikaz sastava tekućih i čvrstih podloga za uzgoj i čuvanje kvasaca (izraženo na volumen podloge 500mL)

podloga	YNB	Drop out	Glukoza	Agar	Histidin	Uracil	Triptofan
Tekuća	3,35g	1g	-	-	0,04g	0,04g	0,04g
ploče	1,675g	1g	5g	4g	0,04g	0,04g	0,04g

"Drop-out" je smjesa aminokiselina, nukleotidnih baza i vitamina potrebnih za rast kvasca. Za uzgoj stanica kvasca u tekućoj podlozi je kao izvor ugljika korišten šećer glukoza ili rafinoza, a za indukciju ekspresije pod *GAL* promotorom galaktoza. Otopine šećera su se pripremale u 20%-tnim koncentracijama te se nakon toga sterilizirale u autoklavu (20 min., 121 °C, 1

Atm). Prilikom dodavanja otopina šećera u podlogu konačna koncentracija šećera u podlozi je bila 2%.

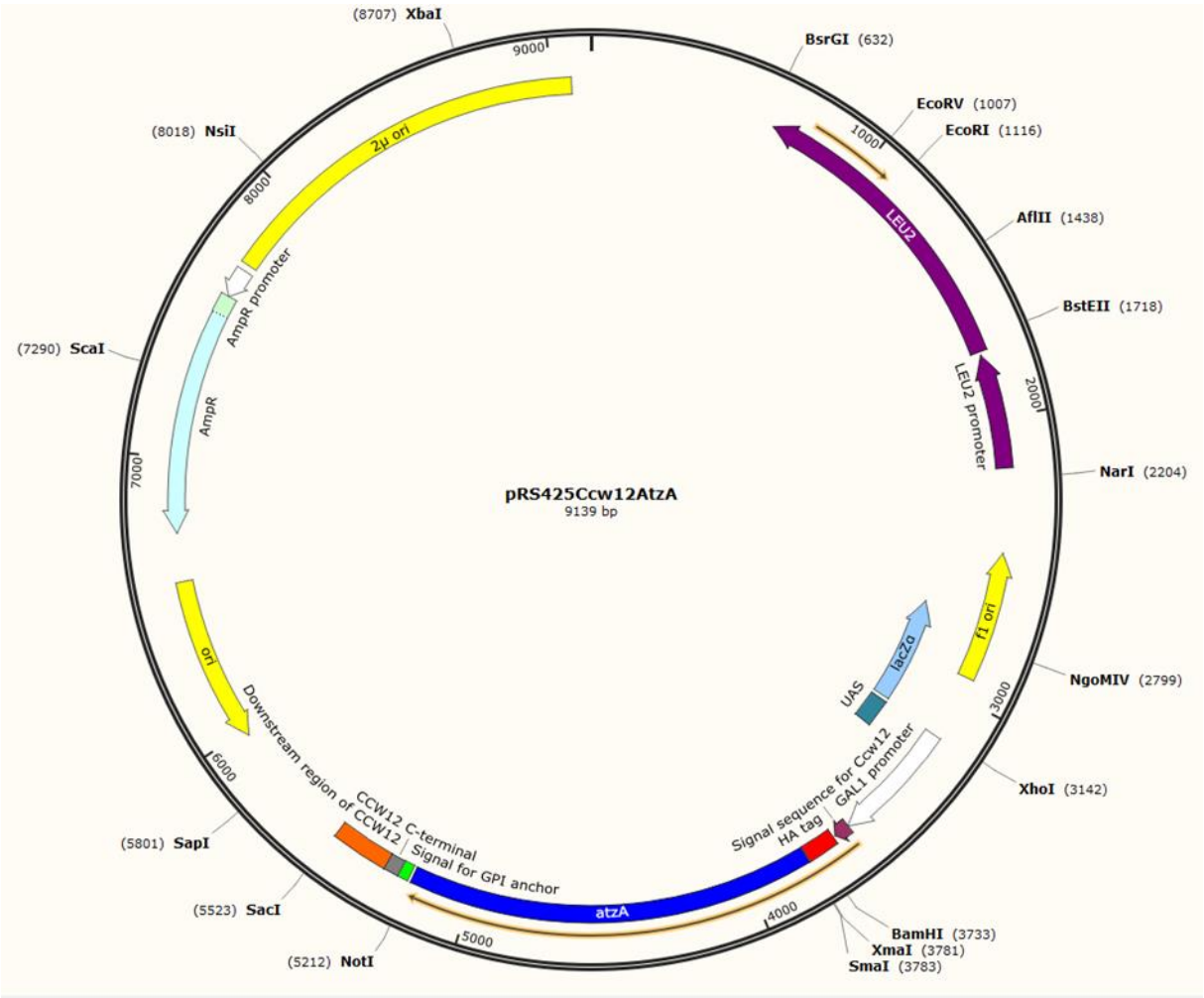
3.5. Plazmidi korišteni u radu

Na slikama 4. i 5. su prikazani primjeri plazmida kojima su transformirani sojevi kvasca korišteni u radu. Kao marker za selekciju transformanata kvasca korišten je gen *LEU3* iz biosintetskog puta sinteze leucina, s obzirom da su korišteni sojevi kvasca imali inaktiviran taj gen. Kvasci se prvo uzgajaju na podlozi sa glukozom, odnosno rafinozom, a zatim se kada dostignu logaritamsku fazu rasta precjepljuju na podlogu s galaktozom koja je induktor *GAL1* promotora pod kojim se nalaze rekombinantni geni. U slučaju kada je željeni enzim fuzioniran sa dijelom proteina stijenke Ccw12, rekombinantni enzim će u stijenku biti vezan preko C-terminalnog kraja, a kada je fuzioniran sa proteinom stijenke Pir4 rekombinantni protein će biti vezan u stijenku preko N-terminalnog kraja. Osim toga, u konstruktu rekombinantnog gena se nalazi i HA-oznaka, na koju se specifično veže komercijalno dostupno antitijelo te se na taj način rekombinantni protein može detektirati metodom Western blota. Ovi plazmidi su korišteni za transformaciju kvasca kako bi se dobili sojevi s atzA, atB, atzC i atzD rekombinantnim proteinima izloženim na površini stanica transformanata, dok su ne transformirani sojevi kvasca korišten kao negativna kontrola u provođenju eksperimenata. U Tablici 3 prikazani su plazmidi kojima su transformirane stanice kvasca.

Tablica 3. Popis plazmida kojima su transformirani korišteni sojevi te njihove karakteristike

Plazmid	Karakteristike	Oznaka za selekciju
YEp351Pir4atzA	Plazmid kodira za *CCW5atzA* (HA- tag) pod kontrolom *GAL1* promotora	Yep351Pir4 / AmpR, *LEU2*
YEp351Pir4atzC	Plazmid kodira za *CCW5atzC* (HA- tag) pod kontrolom *GAL1* promotora	Yep351Pir4 / AmpR, *LEU2*
YEp351Pir4atzD	Plazmid kodira za *CCW5atzD* (HA- tag) pod kontrolom *GAL1* promotora	Yep351Pir4 / AmpR, *LEU2*

pRS425Ccw12atzA	Plazmid kodira za *CCW12atzA* (HA- tag) pod kontrolom *GAL1* promotora	pRS425Ccw12 / AmpR, *LEU2*
pRS425Ccw12atzB	Plazmid kodira za *CCW12atzB* (HA- tag) pod kontrolom *GAL1* promotora	pRS425Ccw12 / AmpR, *LEU2*
pRS425Ccw12atzD	Plazmid kodira za *CCW12atzD* (HA- tag) pod kontrolom *GAL1* promotora	pRS425Ccw12 / AmpR, *LEU2*
Yep351Pir4	Plazmid kodira za Pir4 (HA-tag) pod kontrolom *GAL1* promotora	pCCW5-HA / AmpR, LEU2
pRS425Ccw12	Plazmid kodira za Ccw12 (HA-tag) pod kontrolom *GAL1* promotora	pRS425GalRnyCcw12 / AmpR, LEU2



Slika 4. Prikaz plazmida pRS425 Ccw12AtzA koji nosi *atz* gen fuzioniranim s genom za Ccw12 protein stanične stijenke.

Slika 5. Prikaz plazmida Yep351Pir4AtzA koji nosi *atzA* gen fuzioniranim s genom za protein stanične stijenke Pir4/Ccw5.

3.6 METODE

3.6.1. Uzgoj stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

GAL1 promotor u potpunosti je reprimiran pri uzgoju kvasca na podlozi s glukozom te se inducira kada se u podlogu u kojoj se uzgaja kvasac kao izvor ugljika doda galaktoza. Prvo se kvasac uzgoji na selektivnoj podlozi s 2% glukoze do stacionarne faze rasta u 5 mL medija. Zatim se alikvot uzgojenog kvasca prebacuje u 10 mL istog medija s 2% rafinoze na početni OD_{600} 0,1 i inkubira u tresilici na 30 °C dok kvasac ne naraste do stacionarne faze. Nakon toga kultura se razrijedi do OD_{600} 0,5 i uzgaja u 10 mL podloge istog sastava do OD_{600} 1-1,5. Za konačan uzgoj, alikvot kvasca se prebacuje u 50 mL iste podloge s 2% galaktoze i 0,2% rafinoze tako da početni OD_{600} bude 0,4 i uzgaja preko noći u tresilici na 30 °C.

3.6.2. Izolacija staničnih stijenki

Nakon uzgoja u tekućoj podlozi stanice kvasca prvo se odvajaju od podloge centrifugiranjem (3000 okretaja/min kroz 5 minuta). Nakon odvajanja od podloge stanice se ispiru dva puta u po 30 mL destilirane vode (resuspendiranje taloga nakon centrifugiranja, centrifugiranje na 3000 okretaja/min kroz 5 minuta, bacanje supernatanta i ponovno resuspendiranje taloga u volumenu svježe destilirane vode). Tako dobiveni talog ispranih stanica resuspendira se u odgovarajućem volumenu K-fosfatnog pufera (50 mM, pH 8) tako da gustoća suspenzije bude 1 OD_{600}/µL pufera. U eppendorfice sa suspenzijom stanica dodaju se staklene kuglice promjera 0.5 mm. Volumen staklenih kuglica odgovara 2/3 ukupnog volumena suspenzije stanica. Razbijanje se odvija 2 puta po 10 minuta na vorteksu pri maksimalnoj brzini. Bitno je da stanice budu potpuno razbijene i da se nakon razbijanja suspenzija dobro ohladi u ledu kako bi se smanjila aktivnost proteaza koje su oslobođene sa intracelularnim sadržajem. Talog stijenki se odvaja od staklenih kuglica centrifugiranjem 1 minutu na 13 000 okretaja/min. Eppendorfice se buše na dnu užarenom iglom, takve se ulažu u čiste eppendorfice i tokom centrifuge se suspenzija cijedi kroz kuglice i otvor na dnu u čistu eppendorficu. U eppednorfici se nakon centrifugiranja nalazi intracelularni sadržaj stanice kvasca, ali i talog u kojem su sadržane fragmentirane stijenke stanica. Potrebno je u daljnjem postupku koristiti talog (izolirane stijenke) tako da se supernatant pažljivo odvaja pipetom i još jednom centrifigura 1 min na 13 000 okretaja/min kako bi bili izdvojeni i potencijalno zaostali fragmenti stijenki. Na taj je način su izolirane stanične stijenke kvasca.

3.6.3. SDS, NaOH i β-glukanazni tretman izoliranih stijenki – priprema uzoraka za elektroforezu

Talogu stijenki dodaje se 1 mL Laemmli pufera. Suspenzija se kuha 10 min u vrijućoj vodenoj kupelji. Centrifugiranjem pri 13 000 okretaja/min, u trajanju od 1 minute, stijenke se odvajaju od ekstrakta. Korak se ponavlja još jednom. Čuvaju se oba ekstrakta. Nakon drugog kuhanja,

talog stijenki ispire se četiri puta 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH 8. Isprane stijenke se nakon tretmana Laemmlijevim puferom ispiru još jednom u 1 mL destilirane vode. Potom se resuspendiraju u omjeru otprilike 50 µL 30 mM NaOH na 125 OD_{600} jedinica i slijedi inkubacija preko noći na 4 °C. Idući dan stijenke se odvajaju od ekstrakta centrifugiranjem na 13 000 okretaja/min tokom 1 minute. Za β-glukanazni tretman stijenki uzorci se nakon kuhanja u Laemmlijevom puferu ispiru 50 mM K-fosfatnim puferom pH 6, resuspendiraju se u istom puferu te se dodaje 9 IU β-glukanaze (koncentracija je 4,5 IU/µL), odnosno 1 IU jedinica na 10 OD_{600} jedinica kvasca. Inkubacija traje 2 sata pri 55 °C u termobloku te se centrifugira 10 min pri 13000rpm. Na taj način dobiven je ekstrakt koji sadrži proteine stijenke koji se dalje analiziraju elektroforezom.

3.6.4. SDS elektroforeza

Gel za elektroforezu se sastoji od dva dijela – gornjeg, koji služi kao gel za sabijanje uzorka, i donjeg u kojem se odvija razdvajanje proteina. Gel za sabijanje sadrži: 4.5 gL^{-1} akrilamida, 1.2 g L^{-1} N, N'-metilenbisakrilamid, 1 g L^{-1} SDS, 0.75 g L^{-1} N,N,N´,N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) i 75 g L^{-1} amonijev persulfat (APS) u 0.5 M Tris-Cl puferu pH 6.8. Gel za razdvajanje sadrži: 100 g L^{-1} akrilamid, 3 g L^{-1} N,N'-metilenbisakrilamid, 1 g L^{-1} SDS, 0.5 g L^{-1} N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) i 50 g L^{-1} amonijev persulfat (APS) u 1.5 M Tris-HCl puferu pH 8.8. Nakon pripreme donjeg gela i stavljanja gela između stakala, na njega se dodaje malo izopropanola koji će spriječiti kontakt kisika s gelom što je bitno jer je kisik inhibitor polimerizacije. Nakon što odstoji oko 45 minuta, izopropanol se ukloni sa površine gela za razdvajanje pomoću filter papira te se na njega izlijeva gornji gel. Gornji gel služi za sabijanje proteina iz uzorka u usku frontu koja ulazi u gel za razdvajanje. Pripremljeni gel stavlja se u kadicu za elektroforezu i zalije puferom za elektroforezu (3 g L^{-1} TRIS, 14.4 g L^{-1} glycin, 1 g L^{-1} SDS) . Uzorci se pripremaju tako da se u njih dodaje 5x koncentrirani pufer za uzorke (0.03 g mL^{-1} Tris; 3.8 g L^{-1} EDTA; 0.1 gmL^{-1} SDS; 0.25 mL mL-1 β-merkaptoetanol; 0.05 g L^{-1} bromofenol plavo). Uzorci se nanose u jažice, pokreće se elektroforeza na 200 V i provodi se

otprilike 45-60 minuta (prekida se u trenutku kad fronta boje dođe do kraja gela za razdvajanje).

3.6.5. Western blot

Odmah po završetku elektroforeze, gel se prebacuje u uređaj za blotiranje. Slažu se redom plastična rešetka - dvije spužvice - dva filter papira - nitroceluloza - gel - dva filter papira – dvije spužvice - plastična rešetka. Sve se priprema pod vodom jer između slojeva ne smije zaostati mjehurića zraka. Tako pripremljen „sendvič" prebacuje se u kadicu za transfer s prethodno pripremljenim puferom (25mM Tris, 192 mM glicin pH 8.3, 20% metanol) tako da gel bude okrenut prema negativnoj elektrodi. Transfer proteina iz gela na nitroceluloznu membranu se odvija pri struji od 380 mA u trajanju od 90 do 120 minuta. Nakon transfera nitroceluloza se boji Ponceau S bojom tako dugo dok se ne pojave bendovi. Standardi se označe grafitnom olovkom, nitroceluloza se potom ispire destiliranom vodom i inkubira u 10 mL pufera za blokiranje (50 mM Tris–HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% v/v Triton X-100) uz dodatak 1% obranog mlijeka. Inkubacija ide preko noći na 4 °C. Idući dan, pufer za blokiranje sa mlijekom se odlije, dodaje se novih 5 mL istog pufera i 3 µL HA-antitijela (koja će reagirati s prije spomenutom HA-oznakom u rekombinantnom proteinu). Inkubacija s antitijelima teče 90 ili više minuta na tresilici pri sobnoj temperaturi. Nakon toga nitroceluloza se ispire tri puta po 10 minuta sa 5mL pufera za blokiranje. Membrana se natopi supstratom Clarity Western ECL (BIO-RAD, Hercules, California, SAD) (200 µl supstrata A + 200 µl supstrata B) koji u interakciji s enzimom koji je vezan na anti-HA antitijela razvija kemiluminiscentni produkt. Za detekciju signala na membrani je korišten ˝C-digit˝ uređaj (LI-COR Biosciences, Lincoln, SAD) koji snima kemiluminiscentni signal sa membrane.

3.6.6 Detekcija aktivnosti enzima

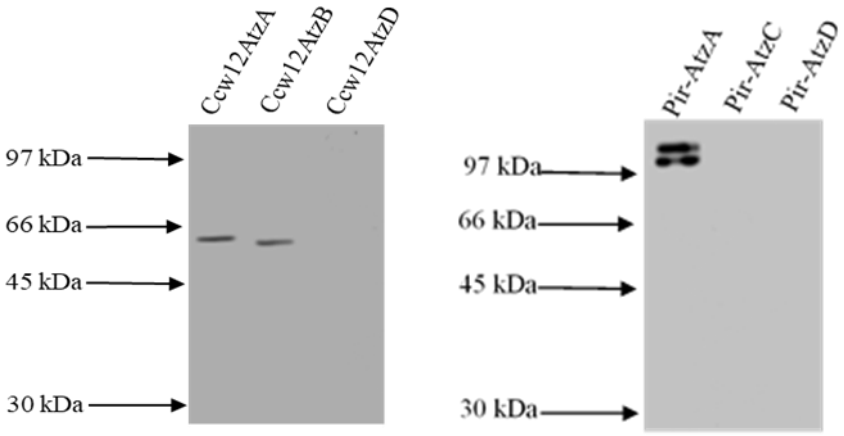
Korištene su dvije metode detekcije aktivnosti. Prva je na krutim podlogama koje su istog sastava kao u tablici 2, ali uz dodatak supstrata (cijanurična kiselina ili atrazin). U slučaju

sojeva s AtzA rekombinantnim proteinom dodaje se 500 µg/mL otopine atrazina u steriliziranu podlogu prije izlijevanja u ploče. Za praćenje aktivnosti AtzD postupak je isti osim što se umjesto atrazina dodaje 17,5 mg/mL otopine cijanurične kiseline u sterilnu podlogu prije izlijevanja u ploče. Kvasac se na pločama uzgaja u termostatu pri 30 ^{0}C tijekom 4 dana. Ukoliko ima aktivnosti ona bi se trebala registrirati pojavom prozirnih zona oko kolonija kvasaca. Kod praćenja aktivnosti u tekućoj podlozi potrebno je nakon završetka uzgoja stanice prvo odvojiti od podloge centrifugiranjem te odliti podlogu, zatim se stanice isperu 50 mM fosfatnim puferom pH 7. Nakon toga se na talog stanica dodaje po 3 mL 50 mM fosfatnog pufera pH 7 u svaku Falcon epruvetu, 100 µmol/L hidroksiatrazina, odnosno 3,75 mmol/L izopropilamelida te se suspenzija inkubira na sobnoj temperaturi 24 sata, a zatim se provode mjerenja na UV spektrofotometru pri valnoj duljini 242 nm za hidroksiatrazin, te pri 240 nm za izopropilamelid. Osim toga, provodi se i inkubacija i mjerenje samo sa puferom kako bi se eliminarala promjena apsorbancije koja nije izazvana enzimskom reakcijom. Mjerenje se provodi tako da se 1 mL suspenzije stanica otpipetira u epruvetu te centrifugira 5 min na 3000 rpm kako bi se samo supernatant u kojem se nalazi produkt uzeo za mjerenje. Supstrati reakcija koje kataliziraju enzimi kodirani genima *atz* apsorbiraju svjetlost navedenih valnih duljina te se aktivnost očituje smanjenjem apsorbancije.

4. REZULTATI

4.1. Ekspresija i imobilizacija proteina na staničnoj stijenci

Kako bi se provjerila uspješnost ekspresije i ugradnje proteina u staničnu stijenku provedena je izolacija stijenki i ekstakcija proteina stijenke kao što je opisano u poglavlju „Materijali i metode". Ekstahirani proteini su zatim analizirani elektroforezom i Western blotom. Rezultati (slika 6.) pokazuju da su Ccw12AtzA, Ccw12AtzB i Pir4AtzA eksprimirani te imobilizirani na površini stanične stijenke kvasca. AtzC i AtzD nisu detektirani Western blotom. Razlozi za ovakav rezultat mogu biti različiti. Jedna od mogućnosti je da ovi enzimi nisu uspješno eksprimirani ili da nisu uspješno transportirani na površinu stanice. Drugi uzrok tomu može biti premala koncentracija imobiliziranog enzima koju nije moguće detektirati ovom metodom.



Slika 6. Western blot analiza proteina izoliranih iz stijenki β-glukanazom (Ccw12AtzA, Ccw12AtzB i Ccw12AtzD) i ekstrakcijom pomoću NaOH (Pir4AtzA, Pir4AtzC i Pir4AtzD)

4.2 Rezultati detekcije aktivnosti na krutoj i tekućoj podlozi

4.2.1 Detekcija aktvnosti rekombinantnih enzima Pir4AtzA, AtzACcw12 i Pir4AtzD na krutoj podlozi

U poglavlju „Materijali i metode" opisan je postupak detekcije aktivnosti rekombinantnih enzima AtzA, AtzB i AtzD na krutoj i tekućoj hranjivoj podlozi. Izabrana su četiri soja s plazmidom koji nosi gene za Pir4AtzD te kao kontrola soj koji nosi plazmid sa genom za Pir4,

ali bez AtzD. Na drugu ploču su nacjepljeni po jedan soj s plazmidom koji nosi gen za AtzA, Ccw12AtzA i Pir4AtzA te kao kontrole sojevi koji nose plazmid sa genom samo za Ccw12 i Pir4 bez enzima za razgradnju atrazina. Na Slici 7 i Slici 8 su prikazani rezultati.

Slika 7. Rezultati detekcije aktivnosti sojeva s Pir4AtzA i Ccw12AtzA i kontrolnih sojeva bez AtzA

Slika 8. Rezultati detekcije aktivnosti sojeva s Pir4AtzD i kontrolnog soja bez AtzD

Niti jedan od ispitivanih sojeva nije pokazao aktivnost na krutoj podlozi u koju je dodan odgovarajući supstrat.

4.2.2. Detekcija aktivnosti enzima AtzB i AtzD u tekućoj podlozi

U poglavlju „Materijali i metode" opisan je postupak detekcije aktivnosti enzima u tekućoj podlozi. Korišten je soj s na površinu stanice vezanim rekombinantnim enzimima Ccw12AtzB te sojevi s vezanim Pir4Atz dok su kao kontrole korišteni sojevi s na površinu stanice vezanim proteinima Pir4 i Ccw12 koji ne sadrže enzim AtzB, odnosno AtzA. Izmjerene su i apsorbancije

supstrata N-izopropilamelida i hidroksiatrazina u puferu (slijepa proba) te su sve dobivene vrijednosti prikazane u Tablici 3. Inkubacija se provodila na sobnoj temperaturi 24 sata. Vrijednosti prikazane iznad crvene linije u Tablici 3 su mjerene na valnoj duljini 240nm, a ispod te linije na 242nm. S obzirom da se mjeri promjena koncentracije supstrata ako postoji aktivnost očekuje se pad apsorbancije, međutim dobiveni rezultati pokazuju čak i blagi porast apsorbancije iz čega možemo zaključiti da nema aktivnosti enzima.

Tablica 3. Eksperimentalno dobiveni rezultati detekcije aktivnosti mjereni UV spektrometrom pri 240 i 242nm

Sojevi	$A_{240/242}$
Pir4 AtzC 1	2,527
Pir4 AtzC 2	2,421
Pir4 AtzC 3	2,422
Pir4 AtzC 4	2,619
N-izopropilamelid + pufer (slijepa proba)	2,230
Pir4	2,490
Ccw12 AtzB	0,747
Ccw12	0,352
Hidroksiatrazin + pufer (slijepa proba)	0,446

5. RASPRAVA

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae,* pripadnik carstva *Fungi*, danas ima široku primjenu u biotehnologiji, prehrambenoj industriji, pivarstvu, vinarstvu i dr. Dodatna prednost korištenja ovog organizma je to što se lako uzgaja u jeftinim podlogama, ima relativno veliku brzinu rasta i dobro podnosi različite fizikalne uvjete.

Stanična stijenka je zanimljiva za istraživanja jer zbog svoje kompleksne strukture nudi razne mogućosti primjene. Mogu se razlikovati dva specifična sloja stanične stijenke, unutarnji i vanjski. Unutarnji se sastoji od β-1,3 i β-1,6-glukana te hitina. β-1,3-glukan daje stanici čvrstoću i oblik dok je β-1,6-glukan posrednik između β-1,3-glukanske mreže i ostalih molekula koje izgrađuju stijenku (Rees, 1971; Orlean, 2012.). Hitin ima važnu ulogu kod morfoloških promjena stanice (pupanje, sporulacija, rast) (Klis, 2006.). Vanjski sloj stijenke se sastoji od manoproteina, polipeptida s vezanim mananom, koji se u staničnu stijenku vežu kovalentno ili nekovalentno. Manoproteini se kovalentno vežu u staničnu stijenku preko tzv. repetitivne sekvence (PIR porodica proteina) ili preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog sidra (GPI proteini). Osim kovalentno vezanih manoproteina u stijenci se nalazi i skupina nekovalentno vezanih proteina koji se za komponente stanične stijenke vežu nespecifičnim nekovalentnim vezama (Capellaro i sur., 1998.). Vanjski sloj stijenke akumulira negativan naboj, selektivno je propusan prema određenim molekulama te sudjeluje u zaštiti stanice od štetnih molekula iz okoliša. Za vezanje rekombinantnih proteina na površinu stanične stijenke najčešće se koriste GPI proteini (van der Vaart i sur., 1997.).

Atrazin je herbicid iz skupine s-triazina, simetričnih heterocikličkih spojeva koji imaju atom dušika u strukturi. Bio je u širokoj upotrebi sve dok nije otkriven njegov akumulacijski efekt u okolišu zbog visoke biostabilnosti. Nakon toga je u EU zabranjena njegova upotreba. U prirodi postoje mikroorganizmi koji imaju enzime za katabolizam atrazina, a među njima je najpoznatija bakterija *Pseudomonas sp*. ADP. Sam metabolički put za razgradnju atrazina se

sastoji od šest reakcija kojima se atrazin razgrađuje do amonijaka i ugljičnog dioksida (Shapir i sur., 2005; Porrua i sur., 2010.).

U eksperimentalnom dijelu ovog radu cilj je bio ispitati moguććnost da se u kvascu eksprimiraju rekombinantni enzimi AtzA, AtzB, AtzC i AtzD iz *Pseudomonas sp*. ADP te da ih se izloži na površinu stanične stijenke kvasca *S.cerevisiae* genetičkom fuzijom ovih enzima sa proteinima stanične stijenke Pir4 ili Ccw12. Stoga su sojevi kvasaca transformirani s plazmidima koji su nosili gene za po jedan od enzima iz metaboličkog puta za razgradnju atrazina fuzionirane s genima za Pir4 ili Ccw12 protein stanične stijenke kvasca. U slučaju fuzije sa proteinom Pir4, rekombinantni enzimi vezani su za stijenku preko N-terminusa, a u slučaju fuzije sa proteinom Ccw12 preko C-terminusa. Ekspresija rekombinantnih gena je inducirana dodatkom galaktoze u podlogu za rast jer su se rekombinantni geni nalazili pod kontorolom *GAL* promotora. Razbijanjem stanica kvasca BeadBug uređajem stanične stijenke se odvajaju od intracelularnog sadržaja te se daljnjim postupcima iz njih izoliraju nekovalentno vezani proteini stijenke (SDS-ekstrakt) i kovalentno vezani proteini stijenke. Kovalentno vezani proteini PIR porodice se ekstrahiraju iz stijenki pomoću NaOH, dok se proteini vezani preko ostatka GPI sidra ekstrahiraju iz stijenki β-glukanazom. Tako dobiveni ekstrahirani proteini se razdvajaju elektroforezom u poliakrilamidnom gelu nakon čega se provodi Western blot analiza kako bi se detektirali željeni rekombinantni enzimi. Rezultat Western blot analize pokazao je da su enzimi Ccw12AtzA, Pir4AtzA i Ccw12AtzB uspješno eksprimirani i izloženi na površini stanične stijenke dok Pir4AtzC, Pir4AtzD i Ccw12AtzD nisu, a razloga može biti više. Jedan od mogućih razloga je premala koncentracija enzima koja je ispod granice detekcije Western blot metodom, a drugi da su rekombinantni proteini uslijed pogrešnog smatanja nakon translacije degradirani staničnim proteazama ili da nisu uspješno transportirani do stanične stijenke. Ispitivanje aktivnosti rekombinantnih proteina provodilo se u jednom slučaju na čvrstoj hranjivoj podlozi s dodanim supstratom cijanuričnom kiselinom za soj koji eksprimira rekombinantni AtzD, odnosno s atrazinom za soj koji eksprimira rekombinantni AtzA. U drugom

slučaju aktivnost je ispitivana u puferu s dodatkom hidroksiatrazina (za soj koji eksprimira rekombinantni AtzB) i cijanurične kiseline (za soj koji eksprimira rekombinantni AtzD). Oba slučaja su pokazala da aktivnosti nema jer na čvrstim hranjivim podlogama nije došlo do pojava prozirnih zona oko kolonija kvasaca, što bi se dogodilo da je razgrađen supstrat koji je polimeriziran u pločama. Mjerenjem apsorbancije u UV području u kojem apsorbiraju supstrati hidroksiatrazin i cijanurična kiselina također nije detektirana aktivnost tj. nije došlo do smanjenja apsorbancije, što znači da supstrati nisu razgrađeni. U slučaju kada je Western blot analizom potvrđena prisutnost rekombinantnih proteina u stijenci, a nije detektirana njihova aktivnost, mogući razlog za dobivanje ovakvog rezultata je premala koncentracija nastalog produkta koja je ispod granice detekcije korištenih metoda. Druga je mogućnost da rekombinantni enzimi nisu aktivni jer im aktivno mjesto nije pravilno formirano zbog promjena konformacije do kojih je moglo doći usljed povezivanja enzima sa proteinom stanične stijenke na C- ili N-terminalnom kraju.

6. ZAKLJUČCI

Rekombinantni enzimi Pir4AtzA, AtzACcw12 i AtzBCcw12 su uspješno eksprimirani i vezani na površinu stanične stijenke. Međutim, Pir4AtzC, Ccw12AtzD i Pir4AtzD nisu detektirani ni u jednom od tri vrste ekstrakata (SDS, NaOH i beta glukanazni) stijenki što može biti posljedica premale količine imobiliziranih enzima što onemogućuje njihovu detekciju ovom metodom.

Pir4AtzC i AtzCCcw12 rekombinantni enzimi nisu detektirani Western blot metodom niti u jednom od tri vrste ekstrakata, što znači da nisu uspješno eksprimiran ili transportirani na površinu stanice ili da je količina enzima u stijenci ispod granice detekcije ovom metodom.

Aktivnost niti jednog od rekombinantnih enzima nije detektirana niti jednom iskušanom metodom, što može biti posljedica promjene konformacije enzima prilikom fuzioniranja u rekombinantnu formu ili premale količine proizvedenih rekombinantnih enzima da bi se njihova aktivnost mogla detektirati primjenjenim metodama.

7. LITERATURA

Aguilar-Uscanga, B., Francois, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiolgy, 37, 268–274.

Anirban Dutta & Neera Singh (2013) Degradation of atrazine in mineral salts medium and soil using enrichment culture, Journal of Environmental Science and Health, Part B, 48:10, 860-868,

Biondo, C., Midiri, A., Messina, L., Tomasello, F., Garufi, G., Catania, M., … Mancuso, G. (2005). MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense againstCryptococcus neoformans. European Journal of Immunology, 35(3), 870–878

Bony, M., Barre, P., & Blondin, B. (1998). Distribution of the flocculation protein, Flop, at the cell surface during yeast growth: The availability of Flop determines the flocculation level. Yeast, 14(1), 25–35.

Boone C., Sommer S. S., Hensel A., Bussey H. (1990) Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall β-glucan assembly. Journal of Cell Biology 110:1833–1843.

Boundy-Mills, K., M. L. de Souza, R. M. Mandelbaum, L. P. Wackett, and M. J. Sadowsky. 1997. The atzB gene of Pseudomonas sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. Applied Environmental Microbiology 63:916–923.

Cabib, E., Roberts, R., & Bowers, B. (1982). Synthesis of the Yeast Cell Wall and its Regulation. Annual Review of Biochemistry, 51(1), 763–793.

Capellaro C., Mrša V., Tanner W. (1998) New potential cell wall glucanases of Saccharomyces cerevisiae and their involment in mating. Journal of Bacteriology 180, 5030-5037

Cappellaro, C., C. Baldermann, R. Rachel, and W. Tanner, 1994 Mating type-specific cell-cell recognition of Saccharomyces cerevisiae: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. The EMBO Journal 13: 4737–4744

Conzelmann A, Spiazzi A, Hyman R, Bron C. (1986) Anchoring of membrane proteins via phosphatidylinositol is deficient in two classes of Thy-1 negative mutant lymphoma cells. The EMBO Journal 15, 3291–3296

Cook A. M., Beilstein P., Grossenbacher H. and Hinter R. (1985) Ring cleavage and degradative pathway of cyanuric acid in bacteria. Biochemical Journal 231, 255 30.

De Groot, P.W., Ruiz, C., Vázquez de Aldana, C.R., Dueñas, E., Cid, V.J., Del Rey, F., et al., 2001. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in Saccharomyces cerevisiae. Comparative and Function Genomics 2, 124–142.

de Souza, M. L., D. Newcombe, S. Alvey, D. E. Crowley, A. Hay, M. J. Sadowsky, and L. P. Wackett. 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. Applied Environmental Microbiology 64:178– 184.

de Souza, M. L., M. J. Sadowsky, and L. P. Wackett. 1996. Atrazine chlorohydrolase from Pseudomonas sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. Journal of Bacteriology 178:4894–4900

Doering T.L., Masterson W.J., Englund P.T., Hart G.W. (1989) Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. Journal of Biological Chemistry 11168-11173

Douglas, C. M., 2001 Fungal β-1,3-D-glucan synthesis. Medical Mycology 39:55-66

Douglas, C. M., F. Foor, J. A. Marrinan, N. Morin, J. B. Nielsen et al., 1994 The Saccaharomyces cerevisiae FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-β-D-glucan synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 12907–12911

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. Journal of Bacteriology 281, 11523-11529

El Sebaï, T., Devers-Lamrani, M., Changey, F., Rouard, N., & Martin-Laurent, F. (2011). Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta: Isolation of Arthrobacter sp. TES6, an atrazine-degrading strain. International Biodeterioration & Biodegradation, 65(8), 1249–1255.

Fernandes, A. F. T., da Silva, M. B. P., Martins, V. V., Miranda, C. E. S., & Stehling, E. G. (2014). Isolation and characterization of a Pseudomonas aeruginosa from a virgin Brazilian Amazon region with potential to degrade atrazine. Environmental Science and Pollution Research, 21(24), 13974–13978.

FRANZOT, S. P., & DOERING, T. L. (1999). Inositol acylation of glycosylphosphatidylinositols in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformansz* and the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical Journal, 340(1), 25–32

Fujita, M., Maeda, Y., Ra, M., Yamaguchi, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2009). GPI Glycan Remodeling by PGAP5 Regulates Transport of GPI-Anchored Proteins from the ER to the Golgi. Cell, 139(2), 352–365.

García-González, V., Porrua, O. and Santero, E. (2005), Regulation of the Pseudomonas sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. Journal of Bacteriology, 187, 155–167.

Gentzsch M, Tanner W. 1996. The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. The EMBO Journal 15: 5752–5759.

Goldman R.C., Sullivan P.A., Zakula D., Capobianco J.O. (1995) Kinetics of β-1,3 Glucan Interaction at the Donor and Acceptor Sites of the Fungal Glucosyltransferase Encoded by the BGL2 Gene. European Journal of Biochemistry 227, 372–378

Hartland, R., Fontaine, T., Debeaupuis, J., Simenel, C., Delepierre, M. and Latgé, J. (1996). A Novel β-(1,2,3)-Glucanosyltransferase from the Cell Wall of *Aspergillus fumigatus*. Journal of Biological Chemistry, 271(43), 26843-26849

Hernández M, Villalobos P, Morgante V, González M, Reiff C, Moore E et al (2008) Isolation and characterization of a novel simazinedegrading bacterium from agricultural soil of central Chile, *Pseudomonas sp*. MHP41. FEMS Microbiology Letters 286:184–190

Horvath, A., Sütterlin, C., Manning-Krieg, U., Movva, N. and Riezman, H. (1994). Ceramide synthesis enhances transport of GPI-anchored proteins to the Golgi apparatus in yeast. The EMBO Journal, 13(16), 3687-3695.

Inoue, S. B., H. Qadota, T. Arisawa, Y. Anraku, T. Watanabe et al., 1996 Signaling toward 1,3-β-glucan synthesis. Cell Structure and Function 21: 395-402

Kapteyn, J. C., P. van Egmond, E. Sievi, H. van den Ende, M. Makarow et al., 1999 The contribution of the O-glycosylated protein Pir2/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild type cells and β-1,6-glucan-deficient mutants. Molecular Microbiology 31: 1835–1844.

Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1426(2), 373–383.

Klis F. M. (1994) Review: cell wall assembly in yeast. Yeast 10:851–869.

Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 23(3), 185–202

Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display - applications of molecular display. Applied Microbiology and Biotechnology 2004; 64:28-40.

Krainer E., Stark R. E., Naider F., Alagramam K., Becker J. M. (1994) Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle-spinning C- 13-NMR. Biopolymers. 34, 1627–1635

Lesage, G. and Bussey, H. (2006). Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70(2), 317-343.

Mandelbaum R. T., Allan D. L. and Wackett L. P. (1995) Isolation and characterization of a *Pseudomonas sp*. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. Applied and Environmenral Microbiology 61, 1451-1457.

Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, R., Wing, R. and Sadowsky, M.J. (2001), Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas sp*. strain ADP. Journal of Bacteriology, 183, 5684-5697.

Matsumoto T, Fukudu H, Ueda M, Tanaka A, Kondo A. Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. Applied Environmental Microbiology 2002; 68: 4517-4522

Mazur, P., N. Morin, W. Baginsky, M. el-Sherbeini, J. A. Clemas et al., 1995 Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-β-D-glucan synthase. Molecular and Cellular Biology 15: 5671–5681.

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

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. and Latgé, J. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored Glucanosyltransferases Play an Active Role in the Biosynthesis of the Fungal Cell Wall. Journal of Biological Chemistry, 275(20), 14882-14889

Nakamura Y, Matsumoto T, Nomoto F, Ueda M, Fukuda H, Kondo A. Enhancement of activity of lipase-displaying yeast cells and their application to optical resolution of (R, S)-1-benzyloxy-3-chloro-2-propyl monosuccinate. Biotechnology Progress 2006; 22: 998-1002

Orlean P. (1997) Biogenesis of yeast cell wall and surface components. in The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, eds Pringle J. R., Broach J. R., Jones E. W. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y), 3. Cell cycle and cell biology:229–362.

Orlean P. (2012) Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. Genetics. 192, 775–818

Perlin, D. S., 2007 Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. Drug Resistent Updates 10: 121–130.

Porrua O, Platero AI, Santero E, Del Solar G & Govantes F (2010) Complex interplay between the LysR-type regulator AtzR and its binding site mediates atzDEF activation in response to two distinct signals. Molecular Microbiology 76: 331–347.

Ram, A. F., S. S. C. Brekelmans, L. J. W. M. Oehlen, and F. M. Klis, 1995 Identification of two cell cycle regulated genes affecting the β-1,3-glucan content of cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters 358: 165–170.

Rees D.A., Scott W.E. (1971) Polysaccharide conformation. Part VI. Computer modelbuilding for linear and branched pyranoglycans. Correlations with biological function. Preliminary assessment of inter-residue forces in aqueous solution. Further interpretation of optical rotation in terms of chain conformation. Journal of the Chemical Society B: Physical Organic, 469-479

Rees, D. A., E. R. Morris, D. Thom, and J. K. Madden, 1982 Shapes and interactions of carbohydrate chains, pp. 196–290 in The Polysaccharides, Vol. 1, edited by G. O. Aspinall. Academic Press, New York

Roemer, T. (1994). Characterization of the yeast (1-->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. The Journal of Cell Biology, 127(2), 567–579

Ruiz-Herrera, J., Leon, C. G., Carabez-Trejo, A., & Reyes-Salinas, E. (1996). Structure and Chemical Composition of the Cell Walls from the Haploid Yeast and Mycelial Forms of *Ustilago maydis*. Fungal Genetics and Biology, 20(2), 133–142

Ryckaert S, Martens V, Vusser KD, Contreras R. Development of a *S. cerevisiae* whole cell biocatalyst for in vitro sialylation of oligosaccharides. Journal of Biotechnology 2005

Sadowsky, M. J., Z. Tong, M. L. de Souza, and L. P. Wackett. 1998. AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. Jorunal of Bacteriology 180:152–158

Sato N, Matsumoto T, Ueda M, Tanaka A, Fukuda H, Kondo A. Long anchor using Flo1p protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. Applied Microbiology and Biotechnology 2002; 60: 549-747.

Sene, L., Converti, A., Secchi, G. A. R., & Simão, R. de C. G. (2010). New aspects on atrazine biodegradation. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53(2), 487–496.

Shapir, N., Sadowsky, M.J., and Wackett, L.P. (2005) Purification and characterization of allophanate hydrolase (AtzF) from *Pseudomonas sp*. strain ADP. Jorunal of Bacteriology 187: 3731–3738.

Shimma YI, Saito F, Oosawa F, Jigami Y. Construction of a library of human glycosyltransferases immobilized in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Environmental Microbiology 2006; 72: 7003-7012.

Smith, D., Alvey, S., Crowley D. E. (2005), Cooperative catabolic pathways within an atrazinedegrading enrichment culture isolated from soil. FEMS Microbiology Ecology, 53, 265 – 273

Smits G.J., Schenken L.R., Brul S., Pringle J.R., Klis F.M. (2006) Role of cell cycleregulated expression in the localized incorporation of cell wall proteins in yeast. Molecular Biology of the Cell. 17, 3267-3280

Smits,G. J., J. C. Kapteyn,H. van den Ende, and F.M. Klis, 1999 Cell wall dynamics in yeast. Current Opinion in Microbiology 2: 348–352.

Spellman P.T., Sherlock G., Zhang M.Q. (1998) Comprehensive identification of cell cycleregulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. Biology of the Cell 9, 3273-3297

Stevens V.L., Raetz C.R. (1991) Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants. Journal of Biological Chemistry 266, 10039-10042

Sumita T, Yoko-o T, Shimma Y, Jigami Y. Comparison of cell wall localization among Pir family proteins and functional dissection of the region required for cell wall binding and bud scar recruitment of Pir1p. Eukaryot Cell. 2005; 4:1872-1881.

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

Toh-e A., Yasunaga S., Nisogi K., Tanaka K., Oguchi T., Matsui Y. (1993.) Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are releated to each other, and PIR1 and PIR2 are requiered for tolerance to heat shock. Yeast. 9, 481-494

Udiković Kolić, N., Hršak, D., Devers, M., Klepac-Ceraj, V., Petrić, I., & Martin-Laurent, F. (2010). Taxonomic and functional diversity of atrazine-degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil. Journal of Applied Microbiology.

Vaishampayan, P.A., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K. (2007), Isolation and characterization of Arthrobacter sp. strain MCM B-436, an atrazinedegrading bacterium, from rhrizospheric soil. International Biodeteration and Biodegradation, 60, 273-278

van der Vaart JM, Biesbeke R, Chapman JW, Toschka HY, Klis FM, Verrips T. Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell expression of heterologous proteins. Applied Environmental Microbiology 1997; 63:615-620.

Vibber, L.L., Pressler, M.J. & Colores, G.M. Applied Microbiology and Biotechnology (2007) 75: 921

Watanabe D., Utsugi T., Minemura M., Hirata A., Abe M., Ohya Y. (2002.) Movement of yeast 1,3-β-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. Genes to Cells. 7, 1-9

Wiederhold, N. P., and R. E. Lewis, 2003 The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. Expert Opinion on Investigational Drugs 12: 1313–1333

Wilcox L.J., Balderes D.A., Wharton B., Tinkelenberg A.H., Rao G., Sturley S.L. (2002) Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. Jorunal of Biological Chemistry 277, 32466-32472

Zadnja stranica završnog rada

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.

Fran Debanić

ime i prezime studenta