

Ispitivanje načina vezanja mutiranog proteina Scw4 u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Matičević, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:050974>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ana Matičević

7492/BT

**ISPITIVANJE NAČINA VEZANJA MUTIRANOG PROTEINA Scw4 U STANIČNU
STIJENKU KVASCA *Saccharomyces cerevisiae***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija II

Mentor: Prof. dr. sc. Renata Teparić

Zagreb, 2020.

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

Ispitivanje načina vezanja mutiranog proteina Scw4 u staničnu stijenku kvasca

Saccharomyces cerevisiae

Ana Matičević , 58211629

Sažetak: Protein Scw4 u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae* može se vezati nekovalentno i kovalentno, no i dalje nije poznato koji dio proteina je odgovoran za kovalentno povezivanje. U prethodnom istraživanju uvedena je mutacija u jednu od regija koja je slična Pir repetitivnim regijama za koje se pretpostavlja da bi mogle biti odgovorne za kovalentno povezivanje. Također je utvrđeno kako se nativni Scw4 u staničnoj stijenci pojavljuje u tri forme različite veličine – neprocesiranoj, procesiranoj sa Kex2 proteazom te procesiranoj sa japsinskim proteazama. U ovom radu ispitan je način vezanja mutiranog proteina Scw4 u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri uzgoju na pH 4 i pH 7. Prethodno izrađen konstrukt sa mutacijom umnožen je u bakteriji *Escherichia coli*, izoliran te su njime transformirane kvaščeve stanice. Kvasci su uzgajani u selektivnoj podlozi za uzgoj u uvjetima indukcije *GAL* promotora. Nakon uzgoja provedena je izolacija i analiza načina vezanja proteina stanične stijenke metodama SDS elektroforeze te metodom western blota. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je ispitivana regija u sekvenci Scw4 proteina bitna za njegovo kovalentno vezanje u staničnu stijenku.

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

Rad sadrži: 29 stranica, 4 slika, 4 tablica, 28 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: prof.dr.sc. Renata Teparić

Pomoć pri izradi: Mateja Lozančić, mag.ing.

Datum obrane: 10. 07.2020.

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

**Examination of the way of binding of the mutated Scw4 protein into the cell wall
of yeast *Saccharomyces cerevisiae***

Ana Matičević, 58211629

Abstract: Protein Scw4 can be bound into the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* non-covalently and covalently. However, the part of the protein responsible for the covalent bond remains unknown. According to previous research, a mutation has been introduced into one of the regions similar to Pir repetitive regions which are supposed to be responsible for the covalent bonding. It has also been established that the Scw4 protein can appear in the cell wall in three different sized forms – unprocessed, processed with Kex2 protease, and processed with yapsin proteases. In this particular research, the way of binding mutated Scw4 protein grown on pH 4 and pH 7 has been examined. An previously made mutated construct has been replicated in *Escherichia coli*, isolated, and used to transform yeast cells which have been grown on selective media under the induction of the promotor. Cell wall proteins have been isolated and analysed by SDS PAGE and by western blotting. According to the results obtained, it can be concluded that the examined region in the Scw4 protein sequence is important for its covalent binding to the cell wall.

Keywords: cell wall, *Saccharomyces cerevisiae*, Scw4

Thesis contains: 29 pages, 4 figures, 4 tables, 28 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: prof.dr.sc. Renata Teparčić

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

Defence date: 10.07.2020.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. Građa stanične stijenke.....	2
2.2.1. Polisaharidi stanične stijenke.....	2
2.2.2. Proteini stanične stijenke.....	4
2.2.2.1. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke.....	4
2.2.2.2. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke	5
2.3. Protein Scw4.....	6
2.4. Proteolitičko procesiranje Scw4 proteina.....	7
2.4.1. Proteaza Kex2.....	7
2.4.2. Japsinske proteaze.....	8
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Kemikalije.....	10
3.1.2. Plazmidi.....	11
3.1.2.1. pBG1805 <i>SCW4</i>	11
3.1.2.2. pBG1805 <i>SCW4mutP</i>	11
3.1.3. Laboratorijski sojevi korištenih mikroorganizama.....	11
3.1.4. Hranjive podloge.....	12
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Izolacija plazmida iz bakterijskih stanica.....	14
3.2.2. Određivanje koncentracije DNA.....	14

3.2.3. Restriksijska analiza izoliranih plazmida.....	14
3.2.4. DNA elektroforeza.....	14
3.2.5. Transformacija kvasca LiAc metodom.....	14
3.2.6. Uzgoj kvasca uz indukciju GAL promotora.....	15
3.2.7. Izolacija stanične stijenke kvasca.....	15
3.2.8. SDS tretman stijenci.....	16
3.2.9. NaOH tretman stijenci.....	16
3.2.10. SDS PAGE elektroforeza.....	17
3.2.11. Western blot.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
4.1. Restriksijska analiza plazmida pBG1805 <i>SCW4</i> i pBG1805 <i>SCW4mutP</i> s enzimom Sapl.....	21
4.2. Transformacija kvasca LiAc metodom.....	22
4.3. Provjera načina vezanja mutiranog Scw4 proteina u staničnu stijenku kvasca western blot metodom.....	22
5. ZAKLJUČCI.....	26
6. POPIS LITERATURE.....	27

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam koji se tradicionalno upotrebljava u fermentacijama hrane i pića zbog čega je i najistraženiji industrijski mikroorganizam. *Saccharomyces cerevisiae* se koristi kao modelni organizam za istraživanje eukariotskih stanica. Pogodan je za uporabu kao modelni organizam jer ima kratko generacijsko vrijeme, uzgoj kvasca je jeftin, a genetička manipulacija laka. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dinamična je struktura koja stanici kvasca pruža osmotsku stabilnost, čvrstoću i zaštitu od mehaničkih utjecaja. Građena je od dva strukturno i funkcionalno različita sloja. Unutarnji sloj stanične stijenke osigurava osmotsku i mehaničku stabilnost, a građen je od polimera β -1,3-glukana i β -1,6-glukana te hitina. Vanjski sloj stanične stijenke građen je od manoproteina koji se na polimere glukana mogu vezati kovalentno ili nekovalentno. Nevalentno vezani proteini se iz stanične stijenke mogu izolirati kuhanjem u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptetanola dok se kovalentno vezani proteini iz stanične stijenke mogu izolirati tretmanom sa blagom lužinom ili enzimom β -glukanazom (Grbavac i sur., 2017).

Protein Scw4 prvotno je izoliran u SDS ekstraktu te okarakteriziran kao nevalentno vezani protein (Cappellaro i sur., 1998), no daljnjim istraživanjima utvrđeno je kako se protein Scw4 može izolirati i tretmanom stijenke sa 30 mM NaOH odnosno da se Scw4 u staničnu stijenku može vezati i kovalentno (Teparić i sur., 2007). Izolacija proteina tretmanom stijenki sa 30 mM NaOH karakteristična je za izolaciju proteina PIR porodice koji sadrže repetitivnu sekvencu aminokiselina koja sadržava glutaminske ostatke važne za kovalentno povezivanje sa β -1,3-glukanom. Unutar sekvence proteina Scw4 pronađene su regije slične PIR repetitivnim sekvencama koje bi mogle biti odgovorne za kovalentno povezivanje proteina Scw4 u staničnu stijenku, no i dalje nije poznato koji dio proteina je odgovoran za kovalentno povezivanje. Stoga je u prethodnom istraživanju metodom megapočetnice lančanom reakcijom polimeraze uvedena mutacija u prvu regiju sličnu PIR repetitivnoj sekvenci unutar gena *SCW4*. Pripremljeni konstrukt umnožen je u bakteriji *Escherichia coli* te izoliran iz bakterijskih stanica. Konstruktom su transformirane stanice kvasca unutar kojih dolazi do ekspresije konstrukta. Ekspresija i vezanje mutiranog proteina Scw4 u staničnu stijenku provjerena je metodom western blota. Cilj ovoga rada bio je ispitati način vezanja mutiranog proteina Scw4 u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te utjecaj pH vrijednosti uzgoja kvasca na vezanje i procesiranje mutiranih oblika proteina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam koji pripada carstvu *Fungi*. Optimalna temperatura rasta iznosi od 28°C do 30°C, aktivan je i u kiselom okruženju te tolerantan na visoke koncentracije etanola i nisku razinu kisika. Može se razmnožavati spolno, mejozom ili nespolno, pupanjem. Osim toga, karakteriziraju ga i kratko generacijsko vrijeme, jeftin uzgoj te laka genetička manipulacija. Kvaščev genom prvi je sekvencionirani genom eukariotskog organizma. Zbog svega navedenog se koristi kao modelni organizam u istraživanjima staničnih procesa u eukariotskim stanicama.

2.2. Građa stanične stijenke

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dinamična je struktura koja stanici kvasca osigurava mehaničku i osmotsku stabilnost te stanici daje čvrstoću i oblik. S druge strane, podložna je promjenama u kemijskom sastavu, fizičkim svojstvima te obliku ovisno o fazi staničnog rasta, tijekom parenja ili sporulacije. Sastoji se od unutarnjeg sloja građenog od polisaharida koji osigurava osmotsku i mehaničku stabilnost te vanjskog sloja građenog od manoproteina koji osigurava komunikaciju stanice s okolinom.

2.2.1. Polisaharidi stanične stijenke

Staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izgrađuju polisaharidi polimeri β -1,3-glukana i β -1,6-glukana koji su građeni od glukoze, hitin koji je građen od N-acetilglukozamina te manan koji je građen od manoze. β -1,3-glukan, β -1,6-glukan i hitin određuju oblik stanice kvasca te osiguravaju njenu mehaničku i osmotsku stabilnost, dok manan čini ugljikohidratni dio manoproteina stijenke i ograničava propusnost stijenke.

β -1,3-glukan je ravnolančani polimer izgrađen od oko 1500 glukoznih jedinica povezanih u lance. Lanci β -1,3-glukana formiraju strukturu uzvojnice čime se osigurava čvrstoća i osmotska stabilnost stanične stijenke (Lesage i Bussey, 2006). Sintezu β -1,3-glukana provodi multienzimski kompleks β -1,3-glukan sintaza smješten u staničnoj membrani (Qadota, 1996), a sastoji se od dvije katalitičke (Fks1 i Fks2) i jedne regulatorne podjedinice (Rho1p GTPaza). Multienzimski kompleks aktivira se pomoću senzornog proteina Wsc1p smještenog na

površini stanice koji aktivira β -1,3-glukan sintazu preko Rom2p proteina dok je s druge strane protein Lrg1p iz grupe Rho1p proteina inhibira (Watanabe i sur., 2002). Prilikom sinteze stanične stijenke prvi se sintetizira β -1,3-glukan koji se zatim kovalentno povezuje sa β -1,6-glukanom i hitinom, pri čemu se 40-50% hitina reducirajućim krajem povezuje β -1,4-glikozidnom vezom s nereducirajućim krajem β -1,3-glukana (Lesage i Bussey, 2006).

β -1,6-glukan je razgranati polimer glukoze izgrađen od oko 130 monomernih glukoznih jedinica povezanih uz pomoć UDP-ovisnog enzima β -1,3-glukan sintaze (Orlean, 2002) pri čemu se mjesta grananja nalaze prosječno na svakoj petoj glukoznoj jedinici. Za biosintezu β -1,6-glukana kodira više od 20 gena iz *KRE* grupe uključujući i njihove homologe *SKN1* i *KNH1*, no njegov biosintetski put te struktura nisu potpuno razjašnjeni. Brojni proteini smješteni u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevom tijelu i staničnoj membrani utječu na količinu β -1,6-glukana u stanici (Aimanianda i sur., 2009). β -1,6-glukan stabilizira staničnu stijenku zbog uloge u povezivanju ostalih komponenata stijenke.

Hitin je linearni polimer N-acetilglukozamina izgrađen od oko 190 monomernih jedinica povezanih pomoću enzima hitin sintaze. Struktura hitina slična je α -celulozi te dolazi u obliku dva antiparalelna lanca povezana vodikovim vezama koji se nereducirajućim krajevima vežu za β -1,3-glukan i β -1,6-glukan. Amidne grupe povezane su vodikovim vezama što dodatno stabilizira kristalnu strukturu, a zajedno s hidrofobnim jezgrama koje su formirane od acetamidometilnih grupa onemogućuju ulazak vode u stanicu i topljenje kristala (Lipke, Ovalle, 1998). Biosinteza i ugradnja hitina u staničnu stijenku odvija se neposredno nakon citokineze što rezultira razinom hitina od 2% u bočnim zidovima stijenke te ožiljcima stanice majke (Shaw i sur., 1991). U stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prisutne su tri hitin sintaze – hitin sintaza I (Chs1), hitin sintaza II (Chs2) i hitin sintaza III (Chs3). Iako potječu iz hrapavog endoplazmatskog retikuluma, hitin sintaze aktivne su u staničnoj membrani. Chs1, Chs2 i Chs3 proteini pripadaju skupini GT2 invertirajućih glikoziltransferaza koje koriste UDP-N-acetilglukozamin kao donore monomernih jedinica. Chs3 protein sintetizira hitin oko pupa, a nakon odvajanja stanica, ostaje na matičnoj stanici kao komponenta ožiljka.

Chs2 i Chs3 proteini imaju važnu ulogu u primarnom formiranju pupa i citokinezi jer mutacije u oba gena na stanicu djeluju letalno (Shaw i sur., 1991).

Manan je razgranati polisaharid koji čini ugljikohidratni dio manoproteina smještenih u vanjskom sloju stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Manoproteini se međusobno razlikuju prema tipu glikozilacije koja može biti N-glikozilacija asparaginskih ostataka ili O-glikozilacija serinskih ili treoninskih ostataka. Obje glikozilacije neophodne su

za rast stanica kvasca, a poremećaji u procesima glikozilacija djeluju letalno na stanicu (Lesage i Bussey, 2006).

2.2.2. Proteini stanične stijenke

Manoproteini stanične stijenke zauzimaju 35% suhe tvari stijenke, a do sada je otkriveno više od 30 proteina čija uloga još uvijek nije razjašnjena. Istraživanja pokazuju kako uklanjanje pojedinačnih proteina iz stanične stijenke ne dovodi do većih promjena osmotske stabilnosti niti do promjene oblika, no smatra se kako prisutnost manoproteina utječe na poroznost i transport molekula iz periplazmatskog prostora u stanicu (De Nobel i sur., 1990).

Manoproteini se razlikuju prema načinu vezanja na β -1,3 i β -1,6-glukan stanične stijenke te se stoga dijele u dvije skupine. Prvoj skupini pripadaju manoproteini koji se nekovalentno vežu u staničnu stijenku te se iz stanične stijenke izoliraju kuhanjem u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptetanola. Drugoj skupini pripadaju manoproteini koji se kovalentno vežu na glukanski sloj stanične stijenke. Skupini kovalentno vezanih proteina pripadaju proteini koji se na β -1,6-glukan vežu preko glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) ostatka koji se iz stanične stijenke izoliraju tretmanom sa glukanzama te proteini PIR porodice (Proteins with Internal Repeats) koji se iz stanične stijenke izoliraju tretmanom sa NaOH (Mrša i sur., 1997).

2.2.2.1. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke

Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke pretežno su O-glikozilirani (Cappellaro i sur., 1998) te sadrže veliki udio homologije sa enzimima transglikozidazama. Stoga se smatra kako nekovalentno vezani proteini imaju ulogu u pregradnji β -glukana u staničnoj stijenci tijekom promjena stanične stijenke koje uključuju rast, pupanje, parenje i sporulaciju (Teparić i sur., 2010). Protein Bg12 je prvi izolirani i okarakterizirani nekovalentno vezani protein. Ovisno o koncentraciji supstrata pokazuje endoglukanaznu i transglikozidaznu aktivnost (Goldman i sur., 1995). Protein Bg12 također sadrži značajan udio homologije s nekovalentno vezanim proteinima Scw4, Scw10 i Scw11 zbog čega se pretpostavlja da i oni imaju glukan-remodelirajuću aktivnost, no ona nije dokazana *in vitro* (Teparić i sur., 2010).

Nekovalentno vezani proteini se iz stanične stijenke izoliraju kuhanjem u otopini SDS-a s dodatkom β -merkaptetanola (Mrša i sur., 1997) ili tretiranjem stanica sa 2mM ditiotreitolum

na 4°C preko noći (Cappellaro i sur., 1998) pri čemu dobiveni ekstrakt sadrži nekovalentno vezane proteine te proteine koji su u staničnu stijenkku vezani disulfidnim mostovima.

2.2.2.2. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke

Kovalentno vezani proteini stanične stijenke dijele se na proteine koji se za β -1,6-glukan vežu preko glikozilfosfatidilinozitolonog ostatka (GPI proteini) te na PIR proteine (Proteins with Internal Repeats) koji se za β -1,3-glukan vežu preko specifičnog glutaminskog ostatka unutar karakteristične repetitivne sekvence (Ecker i sur., 2006). Proteini GPI skupine se iz stanične stijenke izoliraju tretmanom β -1,3-glukanazama ili β -1,6-glukanazama, dok se proteini iz PIR skupine proteina iz stanične stijenke izoliraju tretmanom stijenci sa NaOH (Mrša i sur., 1997).

GPI proteini

GPI proteini su O- i/ili N-glikozilirani proteini. Njihova funkcija nije u potpunosti poznata, no pretpostavlja se da sudjeluju u biosintezi i remodeliranju stanične stijenke, određuju površinsku hidrofobnost te antigenost (Klis i sur., 2002). Na N-terminalnom dijelu sadrže hidrofobnu signalnu sekvencu koja ih upućuje u endoplazmatski retikulum, dok na C-terminalnom dijelu sadrže sekvencu koja se uklanja te se transamidacijom na njeno mjesto veže GPI sidro. Vezanje GPI sidra odvija se na endoplazmatskom retikulumu, a nakon toga se proteini prenose u Golgijevo tijelo pa u staničnu membranu odakle se reakcijom transglikozilacije translociraju i vežu na β -1,6-glukan (Orlean, 2012).

Pet proteina iz GPI skupine članovi su GAS obitelji proteina koji imaju glukan-remodelirajuću aktivnost. Osim proteina GAS obitelji, GPI proteini su i egzoglukanaza Exg2 i transglikozidaze Crh1 i Utr2/Crh2 koji stvaraju vezu između β -1,3-glukana i hitina, aglutinini koji sudjeluju u interakciji stanica u različitim uvjetima, proteini FLO obitelji ili flokulini koji služe za flokulaciju i proteini TIR obitelji čija funkcija još nije utvrđena.

PIR proteini (Proteins with Internal Repeats)

Proteini iz PIR porodice su kovalentno vezani i intenzivno O-manozilirani proteini. Iz stanične stijenke izoliraju se β -elminacijom pomoću NaOH. Imaju visok stupanj homologije, bogati su aminokiselinama serinom i treoninom te sadrže N-terminalnu signalnu sekvencu duljine 11 aminokiselina koja upućuje PIR proteine u sekretorni put. PIR porodica proteina je ime dobila po karakterističnim repetitivnim sekvencama odgovornim za kovalentno vezanje u staničnu stijenkku. Osim toga proteini iz PIR porodice sadrže i specifično restriksijsko mjesto za

procesiranje Kex2 endoproteazom (Mrša i sur., 1997). Istraživanja ekspresije i svojstava PIR proteina (Pir1/Ccw6, Hsp150/Pir2/Ccw7, Pir3/Ccw8 i Cis3/Pir4/Ccw5) u različitim mutantima pokazuju kako su PIR proteini odgovorni za održavanje integriteta stanice i stanične stijenke budući da disrupcijom sva 4 PIR proteina dolazi do promjene morfoloških svojstava stanične stijenke, nepravilnog oblika, rasta u agregatima te povećanja osjetljivosti prema inhibitorima sinteze stanične stijenke (Mrša i sur., 1997).

2.3. Protein Scw4

Protein Scw4 prvotno je detektiran u SDS ekstraktu nakon tretmana kuhanjem u SDS-u uz dodatak β -merkaptetanola (Cappellaro i sur., 1998) te je stoga svrstan u skupinu proteina koji se u staničnu stijenku vežu nekovalentno. Daljnjim istraživanjima utvrđeno je kako se protein Scw4 u staničnu stijenku osim nekovalentno može vezati i kovalentno (Teparić i sur., 2007). Kovalentna veza nestabilna je u bazičnim uvjetima stoga se Scw4 iz stanične stijenke može izolirati tretmanom sa 30 mM NaOH koji je karakterističan za izolaciju proteina PIR porodice. Za razliku od proteina PIR porodice, protein Scw4 ne sadrži karakteristične repetitivne regije preko kojih se proteini PIR porodice kovalentno povezuju u stijenku te nije poznato koja je regija odgovorna za kovalentno povezivanje proteina Scw4 u staničnu stijenku kvasca.

Protein Scw4 u stanicama kvasca ima homologa, Scw10 protein s kojim dijeli 63% identičnih aminokiselina, imaju jednaku molekulsku masu od 66kDa, sekvencu za translociranje u endoplazmatski retikulum i mjesto za procesiranje Kex2 proteolitičkim enzimom. Konstrukcijom mutanata u kojima je deletiran ili *SCW4* ili *SCW10* ne dolazi do značajnih promjena fenotipa u usporedbi sa divljim tipom, dok je kod dvostrukih *scw4scw10* mutanata uočen usporen rast, morfološke abnormalnosti te hiperosjetljivost na Calcoflour White (CFW), Congo Red (CR) i kofein u koncentracijama koje nisu imale značajan utjecaj na stanice divljeg tipa kvasca (Cappellaro i sur., 1998). Daljnja istraživanja pokazala su promjene prilikom parenja te znatno veći udio glukana i hitina u stanicama dvostrukih mutanata što upućuje na sličnost proteina Scw4 i Scw10 enzimima glukanazama i transglikozidazama (Šestak i sur., 2004).

2.4. Proteolitičko procesiranje Scw4 proteina

Ekstrakcijom proteina Scw4 iz stanične stijenke divljeg tipa kvasca, detektirane su tri proteinske vrpce različite veličine. Takav rezultat upućuje na postojanje više mjesta za procesiranje (Grbavac i sur., 2017). Enzimi koji sudjeluju u proteolitičkom procesiranju Scw4 proteina su Kex2 i japsinske proteaze.

2.4.1. Proteaza Kex2

Kex2 je specifična Ca^{2+} ovisna serinska endoproteaza molekulske mase 68 kDa. Integralni je membranski protein koji pripada obitelji prohormonskih i proproteinskih konvertaza sekretornog puta (Fuller i sur., 1989). Iako je biokemijski put Kex2 proteaze unutar stanica *Saccharomyces cerevisiae* dobro istražen, poznato je vrlo malo supstrata Kex2 proteaze (Germain i sur., 1992; Bader i sur., 2008). Neki od poznatih supstrata su prekursori feromona α -faktora kod *MATa* stanica neophodni pri parenju kvasaca, prekursori killer toksina K1 i K2 te proproteini i proteini koji sudjeluju u održavanju i remodeliranju stanične stijenke. Kex2 proteaza aktivira proproteine i proteine tako što ih cijepa iza sekvenci Arg-Arg/X ili Lys-Arg/X što je dokazano delecijom *KEX2* gena koja je rezultirala razvijanjem pleiotropnog fenotipa stanica mutanata. Takve mutirane stanice ne mogu proteolizom aktivirati supstrate (Bader i sur., 2008). Osim toga, istraživanja su pokazala kako Kex2 proteaza sudjeluje i u fuzioniranju stanica prilikom parenja pri čemu proteolizom aktivira protein ili stvara kompleks s feromonom reguliranim membranskim proteinom Prm1 (Heiman i sur., 2007).

Proteaza Kex2 sintetizira se u zimogenom obliku kao transmembranski protein tipa 1. Zimogeni oblik Kex2 proteaze sadrži N-terminalnu sekvencu koja ga usmjerava u endoplazmatski retikulum, visokonabijenu C-terminalnu citoplazmatsku regiju te pro-domenu duljine 89 aminokiselina koja omogućuje smatanje proteolitičke domene u aktivnu formu. Osim toga, zimogeni oblik sadrži i katalitičku domenu, konzerviranu P-domenu neophodnu za katalitičko djelovanje, O-glikoziliranu Ser-Thr bogatu transmembransku domenu te citosolni rep s „Trans Golgi Network“ (TGN) lokalizacijskim signalom (Wilcox i Fuller, 1991; Germain i sur., 1992).

Aktivacija zimogene forme Kex2 proteaze odvija se autoproteolitički odnosno cijepanjem N-terminalne sekvence nakon čega dolazi do O- i N-glikozilacije te autoproteolitičkog

otcjepijavanja pro-domene. Aktivirani protein se zatim translocira iz endoplazmatskog retikuluma u Golgijevo tijelo. U Golgijevom tijelu aktivirani protein se progresivno glikozilira vezanjem molekula manoze α -1,3-glikozidnim vezama na postojeće O- i N-oligosaharidne lance (Wilcox i Fuller, 1991).

Kex2 proteaza sudjeluje i u proteolitičkom cijepanju proteina Scw4.

2.4.2. Japsinske proteaze

Japsinske proteaze su proteini iz skupine glikozilfosfatidilinozitol (GPI) aspartatnih proteaza koji na C-terminalnom dijelu sekvence imaju signal za vezanje GPI-sidra koje omogućuje lokalizaciju u staničnoj membrani ili staničnoj stijenci. Prvotno su bile poznate samo proteaze Yps1 i Yps2 izolirane iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te pro-opiomelanokortin konvertirajući enzim (PCE) izoliran iz sekretornih granula srednjeg i stražnjeg režnja hipofize goveda. Kasnije je PCE preimenovan u japsin A te je postao prva japsinska proteaza sisavaca sa specifičnim afinitetom za cijepanje bazičnih ostataka prohormona čime je strukturno i funkcionalno sličan ostalim japsinima (Olsen i sur., 1998). Danas je poznato 5 homolognih japsinskih proteaza u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* : Yps1, Yps2, Yps3, Yps6 i Yps7 (Olsen i sur., 1999).

Japsinske proteaze Yps1 i Yps2 identificirane su kao supresori nul-mutacija *KEX2* gena. Jednako kao Kex2 proteaza, japsinske proteaze Yps1, Yps2 i Yps3 cijepaju proteine i peptide iza bazičnih aminokiselinskih ostataka no za razliku od Kex2 proteaze, japsini cijepaju proteine i na dibazičnim i na monobazičnim mjestima. Stoga japsini prepoznaju i pojedinačne Arg i Lys ostatke (Bourbonnais i sur., 1993, 1994). Proteazu Yps3 otkrili su Egel-Mitani i suradnici 1990 godine kada su tražili alternativu za Kex2 proteazu koji nije bio efikasan u cijepanju proteina fuzioniranog za prekursor feromona α -faktora. Proteaza Yps1 sadrži regiju u obliku petlje između dijelova peptidnog lanca koja se proteolizira. Proteolizom petlje nastaju dva peptidna lanca koja su povezana disulfidnim mostovima.

Japsinske proteaze se kao i svi proteolitički enzimi sintetiziraju u zimogenoj formi u obliku projapsina. Projapsini se aktiviraju proteolizom karakteristične pro-regije na N-terminalnom dijelu sekvence u kiselom mediju pri $\text{pH} < 4$ pri čemu dolazi do odbijanja pozitivnih naboja u pro-regiji te protoniranja ključnih aspartatnih ostataka. Dolazi do pucanja ionskih interackija i destabilizacije projapsina što dovodi do autoproteolize i aktivacije japsina (Cawley i sur., 1998).

Japsinske proteaze sadrže karakterističnu pro-regiju te katalitičku domenu. Pro-regija osigurava pravilno smatanje proteina *in vivo* te inhibira katalitičku domenu čime je osigurana katalitička aktivnost japsina tek nakon lokalizacije u staničnoj membrani ili stijenci (Van den Hazel i sur., 1993). Katalitička domena je sastavljena od jednog ili dva dijela peptidnog lanca, a u njenom aktivnom mjestu kod svih japsinskih proteaza nalazi se karakteristična sekvenca Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb. Unutar karakteristične sekvence se između hidrofobnih ostataka Xaa i treonina te serina Xbb nalazi po jedan aspartatni ostatak ključan za njihovu aktivnost (Rawlings i Barrett, 2004). Unutar sekvence japsina kvasca *Saccharomyces cerevisiae* nalazi se Ser/Thr bogata, intenzivno O-glikozilirana regija čija funkcija još nije razjašnjena (Gagnon-Arsenault i sur., 2006).

Uloga japsinskih proteaza još uvijek nije razjašnjena no dosadašnjim istraživanjima otkriveno je kako se ekspresija japsina povećava 12 puta pri povećanju temperature sa 24°C na 37°C iz čega je zaključeno kako japsini sudjeluju u odgovoru stanice na stres uzrokovan promjenom temperature. Također je otkriveno kako je udio polisaharida stanične stijenske kod *yps1Δyps2Δ* izmijenjen iz čega je zaključeno kako japsini sudjeluju u održavanju integriteta stanične stijenske.

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 (SAD)
- D (+) galaktoza – Acros Organics (SAD)
- agar – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- kvaščev ekstrakt - Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- histidin, uracil, leucin, triptofan – Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- NucleoSpin® Plasmid kit - Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)
- restrikcijski enzim SacI - New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)
- standardi za DNA elektroforezu – Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- amonijev persulfat, N,N' –metilenbisakrilamid, Triton X-100, akrilamid, β-merkaptotanol i Na-dodecilsulfat (SDS) – Sigma-Aldrich (St.Louis, SAD)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- anti-HA peroksidaza antitijela - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- ECL otopine za razvijanje blota – Bio-Rad (SAD)

Ostale kemikalije korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od standardnih proizvođača te su analitičke čistoće.

3.1.2. Plazmidi

3.1.2.1. pBG1805 SCW4

Plazmid pBG1805 *SCW4* sadrži nativni gen za protein Scw4 , ishodište replikacije za samostalnu replikaciju unutar bakterijskih stanica, gen *bla* za selekciju bakterijskih stanica transformiranih ovim plazmidom na hranjivim podlogama koje sadrže ampicilin te gen *LEU2* koji služi kao auksotrofni marker za selekciju kvasaca transformiranih ovim plazmidom. Navedeni plazmid korišten je za transformaciju bakterije *Escherichia coli* u kojoj je plazmid umnožen te nakon toga izoliran. Umnoženim plazmidom transformirane su stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.2.2. pBG1805 SCW4mutP

Plazmid pBG1805 *SCW4mutP* sadrži mutirani gen za protein Scw4 u kojem je mutirana jedna od regija sličnih Pir repetitivnoj sekvenci, ishodište replikacije za samostalnu replikaciju unutar bakterijskih stanica, gen *bla* za selekciju bakterijskih stanica transformiranih ovim plazmidom na hranjivim podlogama koje sadrže ampicilin te gen *LEU2* koji služi kao auksotrofni marker za selekciju kvasaca transformiranih ovim plazmidom. Navedeni plazmid korišten je za transformaciju bakterije *Escherichia coli* u kojoj je plazmid umnožen te nakon toga izoliran. Umnoženim plazmidom transformirane su stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.3. Laboratorijski sojevi korištenih mikroorganizama

Soj bakterije

Genotip korištenog bakterijskog soja *Escherichia coli* (Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells, Thermo Fisher Scientific) za umnažanje plazmida:

F- Φ80lacZΔM15 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 genotipa: BY4741 wt (Mat a, *his3Δ*, *leu2Δ*, *met15Δ*, *ura3Δ*).

3.1.4. Hranjive podloge

Hranjiva podloga za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

E. coli uzgajana je na tekućoj i krutoj LB podlozi čiji je sastav opisan 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
kvašček ekstrakt	5	5
NaCl	5	5
agar	-	15

Hranjive podloge je nakon pripreme potrebno sterilizirati u autoklavu na temperaturi od 121°C te tlaku od 1 atm tijekom 20 minuta. U ohlađenu LB hranjivu podlogu za uzgoj stanica transformanata potrebno je sterilno dodati ampicilin u omjeru 1μL ampicilina na 1mL LB hranjive podloge.

Hranjiva podloga za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae uzgajan je submerzno u selektivnoj YNB podlozi čiji je sastav opisan u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav tekuće YNB hranjive podloge

	Koncentracija (g/L)
YNB-AA	6,7
„drop-out“	1,6
aminokiseline	prema auktotrofности

„Drop-out“ je smjesa aminokiselina, nukleotidnih baza i vitamina potrebnih za rast kvasaca čiji je sastav opisan u Tablici 3. Aminokiseline u podlogu dodajemo prije sterilizacije ovisno o auksotrofnosti soja u koncentracijama navedenim u Tablici 4.

Tablica 3. Sastav „drop-out“ smjese

adenin	3,0 g	L-metionin	2,0 g
L-arginin	2,0 g	L-fenilalanin	2,0 g
L-asparagin	2,0 g	L-prolin	2,0 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g	L-serin	6,0 g
L-cistein	2,0 g	L-treonin	2,0 g
L-glutamin	2,0 g	L-tirozin	2,0 g
L-glutaminska kiselina	2,0 g	L-valin	2,0 g
L-glicin	2,0 g	p-aminobenzojeva kiselina	0,2 g
L-izoleucin	2,0 g	inozitol	2,0 g

Tablica 4. Koncentracija aminokiselina koje se u podloge dodaju prema auksotrofnosti

Aminokiselina	Koncentracija u hranjivoj podlozi (g/L)
Histidin	0,08
Uracil	0,08
Leucin	0,16
Triptofan	0,08

Sterilizirane otopine šećera glukoze, rafinoze ili galaktoze se u hranjivu podlogu dodaju naknadno, neposredno prije naciepljivanja u konačnoj koncentraciji 2%. YNB kruta hranjiva podloga dobiva se dodavanjem 15 g/L agara u tekuću hranjivu podlogu. Podloge je nakon pripreme potrebno sterilizirati u autoklavu pri temperaturi 121°C te tlaku od 1 atm u trajanju 20 minuta.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija plazmida iz bakterijskih stanica

Bakterijske stanice *E. coli* koje sadrže željene plazmide uzgojene su preko noći u LB tekućoj hranjivoj podlozi sa ampicilinom pri 37°C. Plazmidi su iz bakterijskih stanica izolirani pomoću NucleoSpin® Plasmid kita prema uputama proizvođača (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

3.2.2. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija plazmidne DNA dobivene izolacijom iz bakterijskih stanica određena je pomoću Qubit 3.0 fluorometra (Invitrogen, Life Technologies, SAD) prema uputama proizvođača.

3.2.3. Restriksijska analiza izoliranih plazmida

Ispravnost konstruiranih plazmida prethodno izoliranih iz bakterijskih stanica provjerena je restrikcijom plazmida pBG1805 *SCW4* i pBG1805 *SCW4mutP* sa restrikcijskim enzimom SapI. Restrikcija je provedena prema uputama proizvođača restrikcijskog enzima (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD).

3.2.4. DNA elektroforeza

DNA gel elektroforeza plazmida pBG1805 *SCW4* i pBG1805 *SCW4mutP* pocijepanih restrikcijskim enzimom SapI provedena je u 1% agaroznom gelu. Gel za elektroforezu pripremljen je otapanjem agaroze u TAE puferu (40 mmol L⁻¹ Tris-Hac pH=8; 1 mmol L⁻¹ EDTA) uz zagrijavanje do vrenja nakon čega se hladi na 60°C te izlijeva u kalup sa češljicom. Uzorci se pomiješaju s 1x TAE puferom i bojom za elektroforezu te nanesu u jažice. Elektroforeza se provodi pri naponu od 80V. Nakon završetka elektroforeze, DNA vrpce se vizualiziraju uranjanjem u vodenu otopinu etidij bromida (100 mg mL⁻¹) te izlaganjem UV svjetlu transiluminatora.

3.2.5. Transformacija kvasca LiAc metodom

Jednu koloniju kvasca prenesemo sa čvrste hranjive podloge u 10 mL kompletne tekuće hranjive podloge te uzgajamo preko noći na rotacijskoj tresilici pri temperaturi 28°C. Ujutro

se suspenzija kvasca razrijedi te uzgaja u 5 mL podloge do logaritamske faze rasta. Nakon što je kvasac postigao barem 2 generacije i ušao u logaritamsku fazu rasta, suspenzija kvasca se centrifugira 5 minuta na 3000 o/min te se sterilno ukloni podlogu. Talog kvasca se resuspendira u 5 mL sterilne destilirane vode i ponovno centrifugira 5 minuta na 3000 o/min kako bi uklonili ostatke hranjive podloge. Talog stanica se resuspendira u 1 mL 0,1 M LiAc, prenese u sterilnu eppendorf epruvetu i centrifugira 30 sekundi na 8000 o/min dok se supernatant sterilno ukloni pipetiranjem. U slojevima na talog stanica dodaje se redom 240 μ L PEG-a (50% w/v), 36 μ L litijevog acetata (1M), 25 μ L jednolančane DNA („DNA carrier“) te 50 μ L smjese plazmida i sterilne vode. Transformacijsku smjesu se vorteksira oko 1 minutu dok ne postane homogena nakon čega se inkubira prvo u termobloku 30 minuta na 30°C, a zatim u termobloku 20 minuta na 42°C. Suspenzija se centrifugira 15 sekundi na 8000 o/min te uklonimo supernatant pipetiranjem, a talog stanica resuspendira se u 1 mL sterilne vode. Metodom „striking“ nacijepi se 100 μ L suspenzije na selektivne YNB Leu⁻ ploče koje se inkubiraju pri 30°C do porasta kolonija.

3.2.6. Uzgoj kvasca uz indukciju *GAL* promotora

Stanice kvasca uzgajaju se uz indukciju *GAL* promotora koji kontrolira gen *SCW4*. *GAL* promotor je reprimiran pri uzgoju kvasca na podlozi sa glukozom, a postaje aktivan pri uzgoju kvasca na podlozi sa galaktozom. Kvasac je potrebno prvo uzgojiti na selektivnoj podlozi s 2% glukoze do stacionarne faze rasta u 5 mL medija. Zatim se precijepi potrebni alikvot kvasca na 10 mL podloge sa 2% rafinoze početne OD₆₀₀ vrijednosti 0,1 te se inkubira na tresilici na 30°C do stacionarne faze rasta. Kultura se zatim razrijedi precjepivanjem alikvota kvasca u 10 mL podloge istog sastava tako da početna vrijednost OD₆₀₀ bude 0,5 te se inkubira na tresilici do porasta OD₆₀₀ vrijednosti na 1-1,5. Alikvot kvasca zatim se prebaci na podlogu sa 2% galaktoze, 0,1% rafinoze te odgovarajućim puferom do ukupnog volumena od 50 mL. Eksperiment je proveden u puferiranom mediju tako da početna vrijednost OD₆₀₀ za medij s dodatkom 10 mM fosfat-citratnog pufera pH=4 iznosi 0,1 dok početna vrijednost OD₆₀₀ za medij s dodatkom 10 mM fosfat-citratnog pufera pH=7 iznosi 0,4. Kultura kvasca uzgaja se preko noći u tresilici na temperaturi 30°C.

3.2.7. Izolacija stanične stijenke kvasca

Kvasac je prethodno uzgojen u 50 mL YNB Leu⁻ podloge u Erlenmayerovoj tikvici do vrijednosti OD₆₀₀ otprilike 2. Suspenzija kvasca zatim je centrifugirana 5 minuta na 3000 rpm

zbog odjeljivanja stanica od hranjive podloge. Talog stanica se zatim ispiru dva puta sa 30 mL destilirane vode te dva puta sa 30 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 8 uz centrifugiranje između ispiranja. Talog stanica zatim se resuspendira sa približno 100 μ L istog pufera te prenese u kivete za razbijanje stanica u BeadBugTM uređaju. U resuspendirani talog u kivetama dodaju se staklene kuglice u volumenu oko 50% volumena suspenzije stanica. Razbijanje stanica vrši se u dva ciklusa u BeadBugTM uređaju pri brzini od 4000 rpm tijekom 3 minute uz inkubaciju stanica barem 1 minutu na ledu između dva ciklusa razbijanja stanica. Suspenzija razbijenih stanica prebaci se u eppendorf epruvete od 1,5 mL te centrifugira 1 minutu na 8000 rpm nakon čega se pipetiranjem izdvoji i odbaci supernatant koji sadrži intracelularne proteine. Talog stijenki kvašćevih stanica se ispiru četiri puta sa po 1 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 8.

3.2.8. SDS tretman stijenki

Talog stijenki se resuspendira u 1 mL Laemmli pufera (50 mM Tris-HCl pufer pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2% SDS-a, 0,001% boje bromfenol plavo i 5% β -merkaptoetanol) te kuha u kipućoj vodenoj kupelji 10 minuta. Suspenzija se zatim centrifugira 3 minute na 8000 o/min te se pipetiranjem izdvoji supernatant koji sadrži nekovalentno vezane proteine stanične stijenke i spremi na -20°C. Zaostali talog se resuspendira u 1 mL Laemmli pufera te se ponovi kuhanje u kipućoj vodenoj kupelji 10 minuta. Nakon toga suspenzija se centrifugira 3 minute na 8000 o/min te se pipetiranjem izdvoji i odbaci supernatant. Talog se ispiru četiri puta sa po 1 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 8 uz centrifugiranje 3 minute na 8000 o/min između ispiranja.

3.2.9. NaOH tretman stijenki

Talog zaostao nakon SDS tretmana stijenki se ispiru sa 1 mL destilirane vode te centrifugira 3 minute na 8000 o/min. Supernatant se u potpunosti ukloni pipetiranjem. Stijenke se resuspendiraju u 30 mM NaOH u omjeru 50 μ L NaOH na 100 OD jedinica te se suspenzija stijenki u NaOH inkubira preko noći na +4°C. Nakon prekonoćne inkubacije, centrifugiranjem se izdvoji supernatant te mu se doda Laemmly pufer za uzorke tako da ukupno razrjeđenje pufera bude 5 puta. Supernatant pomiješan sa Laemmly puferom se zatim sprema na -20°C.

3.2.10. SDS PAGE elektroforeza

Proteini dobiveni SDS i NaOH tretmanom stijenki razdvajaju se na poliakrilamidnom gelu SDS elektroforezom prije koje se uzorci proteina denaturiraju tretiranjem Laemmly puferom za uzorke. Proteini dobiveni NaOH tretmanom staničnih stijenki već sadrže Laemmly pufer za uzorke dok je proteine dobivene SDS tretmanom potrebno pomiješati s 5x koncentriranim Laemmly puferom (50 mM Tris-HCl pufer pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2% SDS-a, 10% glicerola, 0,001% boje bromfenol plavo i 5% β -merkaptotetanol). Za provođenje elektroforeze korišten je SIGMA diskontinuirani sustav koji se sastoji od gornjeg gela za sabijanje pH 6,8 te donjeg gela za razdvajanje pH 8,8. Gel za sabijanje priprema se miješanjem 4,26 mL 0,5 M Tris-HCl pufera pH 6,8, 600 μ L 30%-tnog akrilamida, 5 μ L TEMED-a i 45 μ L APS-a. Gel za razdvajanje koji sadrži 12% akrilamida priprema se miješanjem 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl pufera pH 8,8, 3 mL 30%-tnog akrilamida, 2 mL destilirane vode, 5 μ L TEMED-a i 38 μ L APS-a. Na polimerizirani gel nanosi se smjesa LMW standarda (Low molecular weight) te uzorci proteina. Elektroforeza se provodi u 25 mM Tris-glicin puferu pH 6,8 sa 0,1% SDS-a pri naponu 180 V tijekom 90 minuta.

3.2.11. Western blot

Nakon završetka elektroforeze, razdvojeni proteini se prenose sa poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu metodom western blota kako bi se se provela detekcija proteina obilježenih –HA oznakom pomoću anti-HA antitijela.

Proteini se sa gela na nitroceluloznu membranu prenose „semi-dry“ transferom. Transfer se odvija u uređaju za transfer (Trans-Blot®Turbo™ Transfer System, BioRad) pri čemu se koristi Tris-glicinski pufer koji se priprema otapanjem 3,03 g TRIS-a i 14,4 g glicina u 200 mL metanola i 800 mL destilirane vode. Transfer se provodi pri 1,0 A i 25 V tijekom 20 minuta.

Nakon transfera proteina, nitrocelulozna membrana boja se bojom Ponceau S (0,1 g/100 mL 5%-tne HAc) dok se ne vizualiziraju vrpce LMW standarda. Grafitnom olovkom zabilježi se položaj vrpce standarda, a membrana se odboja ispiranjem destiliranom vodom. Odbojana membrana se zatim inkubira preko noći u smjesi 1% obranog mlijeka i 10 mL pufera za blokiranje (50 mM Tris-HCl pufer 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) na +4°C. Nakon prekonoćne inkubacije, smjesa pufera za blokiranje i obranog mlijeka se odlije te se membrana inkubira 90 minuta na tresilici u smjesi novih 5 mL pufera za blokiranje i anti-HA antitijela pri čemu se na SDS membranu dodaje 4 μ L antitijela, a na NaOH membranu se dodaje 10 μ L antitijela. Nakon vezanja antitijela, provodi se ispiranje nitrocelulozne

membrane tri puta po 10 minuta u 10 mL pufera za blokiranje. Isprana membrana posuši se staničevinom na području standarda te se kemiluminiscentnom olovkom (WesternSure Pen) označe standardi te se membrana inkubira 5 minuta u reagensima za razvijanje blota (800 μ L peroksidaze i 800 μ L luminola, BioRad, SAD). Proteinske vrpce na membrani vizualiziraju se pomoću C-digit skenera (C-DiGit [®] Blot Scanner – LI-COR Biosciences).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanični eukariotski organizam iz carstva Fungi. Kratko generacijsko vrijeme, jeftin uzgoj, jednostavna genetička manipulacija te sekvencionirani genom čine ga idealnim modelnim organizmom za proučavanje biokemijskih puteva u eukariotskim stanicama. *Saccharomyces cerevisiae* ima staničnu stijenku koja je građena od unutarnjeg i vanjskog sloja. Unutarnji polisaharidni sloj izgrađen je od β -1,3 i β -1,6 glukana te hitina koji osiguravaju mehaničku i osmotsku stabilnost stanice dok je vanjski sloj izgrađen od manoproteina čija uloga nije u potpunosti razjašnjena, ali se smatra kako utječu na poroznost te transport molekula iz periplazmatskog prostora u stanicu (Grbavac i sur., 2017). Stanična stijenka osigurava čvrstoću stanice potrebnu za opiranje jakom osmotskom pritisku, ali je u isto vrijeme dinamična struktura koja osigurava fleksibilnost potrebnu za promjene tijekom rasta i sporulacije stanica (Teparić i sur., 2007). Proteini se u staničnu stijenku mogu vezati kovalentno i nekovalentno. Kovalentno vezani proteini se u staničnu stijenku mogu vezati za β -1,3 glukan preko ostatka glikozilfosfatidil-inozitolnog sidra (GPI sidra) i β -1,6 glukana, a izoliraju se tretmanom sa β -glukanazama. Skupini kovalentno vezanih proteina pripadaju i proteini iz PIR porodice proteina koji su specifični po ponavljajućem slijedu aminokiselina koji sadržava glutaminske ostatke ključne za kovalentno povezivanje sa β -1,3 glukonom u staničnoj stijenci (Ecker i sur., 2006). Pir proteini se iz stanične stijenke mogu izolirati tretmanom sa 30mM natrijevim hidroksidom ili tretmanom sa glukanazama. Neovalentno vezani proteini se u staničnu stijenku vežu nekovalentnim interakcijama s β -1,3 glukonom, a mogu se izolirati iz stanične stijenke kuhanjem u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptioetanolu (Grbavac i sur., 2017). Protein Scw4 prvotno je izoliran u SDS ekstraktu te okarakteriziran kao neovalentno vezani protein stanične stijenke (Cappellaro i sur., 1998). Daljnjim istraživanjima, otkriveno je da izolacijom proteina iz stijenci mutanata u kojima je provedena disrupcija sva četiri PIR gena, u NaOH ekstraktu zaostaje proteinska vrpca od 67 kDa koja veličinom odgovara proteinu Scw4. Potvrda hipoteze kako se protein Scw4 u staničnu stijenku veže i kovalentnim i nekovalentnim interakcijama dobivena je istraživanjem u kojem je disrupiran *SCW4* gen u četverostrukom *pir* mutantu nakon čega u NaOH ekstraktu više nije bila prisutna vrpca od 67 kDa (Teparić i sur., 2010). Međutim, i dalje nije poznat mehanizam ni vrsta veze kao ni dio sekvence odgovoran za kovalentno povezivanje ovog proteina u staničnu stijenku. Izolacijom Scw4 proteina iz stanične stijenke divljeg tipa kvasca, dobivene su tri proteinske vrpce različite veličine prema čemu se zaključuje kako postoji više mjesta za proteolitičko cijepanje proteina Scw4. Od tri forme u kojima se može pojaviti protein Scw4 u staničnoj stijenci, najveća forma predstavlja neprocesirani protein Scw4, forma srednje veličine predstavlja protein

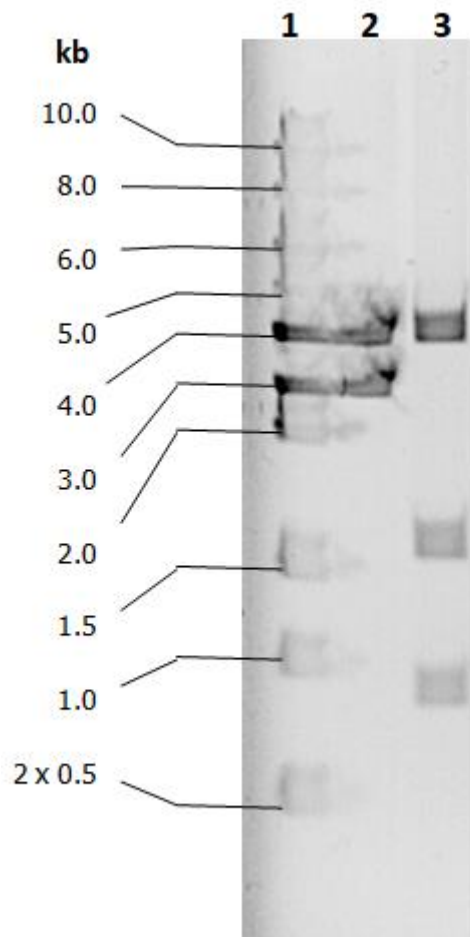
Scw4 procesiran Kex2 proteazom, a najmanja forma predstavlja protein Scw4 procesiran japsinskim proteazama. Forme proteina se razlikuju u načinu vezanja u staničnu stijenku pri čemu se neprocesirana, najveća forma u staničnu stijenku veže kovalentno dok se procesirane forme, srednja i najmanja, u staničnu stijenku vežu nekovalentno. Usporedbom sekvenci Scw4 proteina i Pir proteina, pronađene su sekvence u Scw4 proteinu koje su slične specifičnim ponavljajućim sekvencama Pir proteina odgovornim za kovalentno povezivanje. Stoga smo pretpostavili da bi te sekvence mogle biti odgovorne za kovalentno povezivanje proteina Scw4 u staničnu stijenku. Na temelju navedene pretpostavke, ispitan je način vezanja mutiranog proteina Scw4 u staničnu stijenku. U prethodnom istraživanju, metodom megapočetnice konstruiran je plazmid pBG1805 *SCW4* koji sadrži nativni gen te plazmid pBG1805 *SCW4mutP* koji sadržava mutaciju prve regije slične Pir repetitivnoj sekvenci (označena crveno na slici 1.). Regija je mutirana iz DQIQD u GALLG . Geni *SCW4* i *SCW4mutP* stavljeni su pod kontrolu GAL promotora kako bi se osigurala povećana ekspresija Scw4 proteina u stanicama kvasca na podlozi sa galaktozom, a nizvodno od gena *SCW4* nalazi se hemaglutininski nastavak koji omogućava detekciju –HA antitijelima metodom western blota. Prije transformacije kvasca konstruiranim plazmidom, u bakteriji *Escherichia coli* umnožen je plazmid sa mutiranim genom.

MRLSNLIASA	SLLSAATLAA	PANHEH	KDKR	AVVTTTV	OKQ	TTIIVNGAAS	TPVAALEENA
VVNSAPAAAT	STTSSAASVA	TAAASSENN	SQVSAAASPA	SSSAATSTQS	SSSSQASSSS		
SSGEDVSSFA	SGVRGITYTP	YESSGACKSA	SEVASDLAQL	TDFPVIRLYG	TDCNQVENVF		
KAKASNQKVF	LGIYYV	DQIQ	DGVNTIKSAV	ESYGSWDDVT	TVSIGNELVN	GNQATPSQVG	
QYIDSGRSAL	KAAGYTGPVV	SVDTFIAVIN	NPELCDYSY	MAVNAHAYFD	KNTVAQDSGK		
WLLEQIQRVW	TACDGKKNVV	ITESGWPSKG	ETYGVAVPSK	ENQKDAVSAI	TSSCGADTFL		
FTAFNDYWKA	DGAYGVEKYW	GILSNE*					

Slika 1. Plavom bojom prikazano je mjesto procesiranja Kex2 proteazom, a ljubičastom bojom prikazano je mjesto procesiranja japsinskim proteazama. Crvenom bojom prikazan je mutirani dio sekvencije koji je ispitan u ovom radu.

4.1. Restriksijska analiza plazmida pBG1805 *SCW4* i pBG1805 *SCW4mutP* s enzimom SapI

Nakon prekonoćnog uzgoja bakterijskih stanica *Escherichia coli* koje sadržavaju željene plazmide, plazmidi su iz bakterijskih stanica izolirani upotrebom NucleoSpin Plasmid kita prema uputama proizvođača (Macherey-Nagel) za izolaciju high copy plazmida. Zatim je određena koncentracija izoliranog plazmida pomoću Qubit 3,0 (Invitrogen, Life Technologies, USA) fluorometra prema uputama proizvođača te je provedena restrikcija plazmida sa restriksijskom endonukleazom SapI. Ispravnost plazmida provjerena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu nakon čega smo plazmidima transformirali stanice kvasca.



Slika 2. Restriksijska analiza konstruiranih plazmida. Uzorci : 1. standardi 1Kb DNA Ladder; 2. plazmid pBG1805 *SCW4* nakon restrikcije sa SapI; 3. Plazmid pBG1805 *SCW4mutP* nakon restrikcije sa SapI

Restrikcijском analizom utvrđena je ispravnost konstruiranih plazmida odnosno prisutnost uvedenih mutacija. Plazmid pBG1805 *SCW4* sadrži nativni gen za protein Scw4 te se na njemu nalaze dva restrikcijска mjesta za restrikcijски enzim SapI. Nakon provedene restrikcije i agarozne elektroforeze, na gelu su vizualizirane dvije vrpce koje veličinom odgovaraju očekivanim veličinama fragmenata koje iznose 4202 pb i 3499 pb. Plazmid pBG1805 *SCW4mutP* sadrži mutaciju u genu koji kodira za protein Scw4 te je njegovom konstrukcijom u plazmid uvedeno još jedno restrikcijско mjesto za enzim SapI. Stoga su nakon provedene restrikcije i agarozne elektroforeze, na gelu vizualizirane tri vrpce koje veličinom odgovaraju očekivanim veličinama fragmenata koje iznose 4227 pb, 2119 pb i 1380 pb.

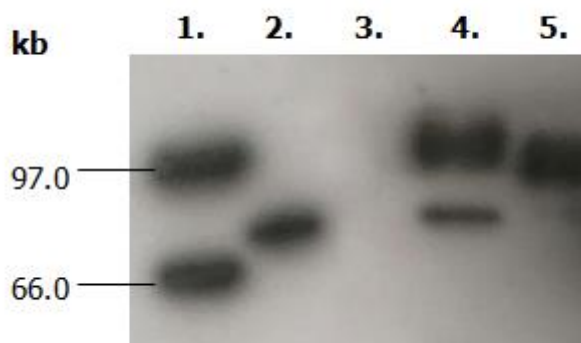
4.2. Transformacija kvasca LiAc metodom

Nakon provjere ispravnosti konstruiranih plazmida restrikcijском analizom, stanice kvasca su transformirane konstruiranim plazmidima LiAc metodom prema prethodno opisanom protokolu. Nakon što su stanice kvasca uzgojene do logaritamske faze, izdvojeno je 5 OD jedinica stanica koje su tretirane s 1 mL 0,1 M LiAc. Na talog tako tretiranih stanica, dodano je 50 µL otopine plazmida koja sadrži 1 µg konstruiranog plazmida. Nakon inkubacije transformacijske smjese 30 minuta na 30°C te toplinskog šoka 20 minuta na 42°C, stanice su resuspendirane u 1 mL sterilne vode. Metodom „streakanja“ naciјеpljeno je 100 µL suspenzije stanica na selektivnu čvrstu podlogu YNB Leu⁻ te su ploče inkubirane pri 30°C do porasta kolonija. Stanice kvasca divljeg tipa su auksotrofni mutanti za leucin te ne rastu na podlogama koje ne sadrže leucin. Stoga na YNB Leu⁻ podlozi rastu samo transformirane stanice kvasca odnosno one stanice koje su uspješno primile plazmid.

4.3. Provjera načina vezanja mutiranog Scw4 proteina u staničnu stijenku kvasca western blot metodom

Transformirane stanice kvasca uzgajane su na selektivnim YNB Leu⁻ podlogama, pri pH 4 i pH 7 uz indukciju *GAL* promotora kako bi se, osim utjecaja mutacija, ispitaо i utjecaj pH vrijednosti na vezanje u staničnu stijenku. Utjecaj pH vrijednosti na vezanje u staničnu stijenku očituje se aktivnošću enzima koji vrše proteolitičko procesiranje. Pri pH 4, aktivne su i Kex2 proteaza i japsinske proteaze te dolazi do proteolitičkog procesiranja čime nastaju manje, procesirane forme proteina koje se u staničnu stijenku vežu nekovalentno, dok je pri pH 7 slabija aktivnost i Kex2 i japsinskih proteaza, te u staničnoj stijenci prevladava veća,

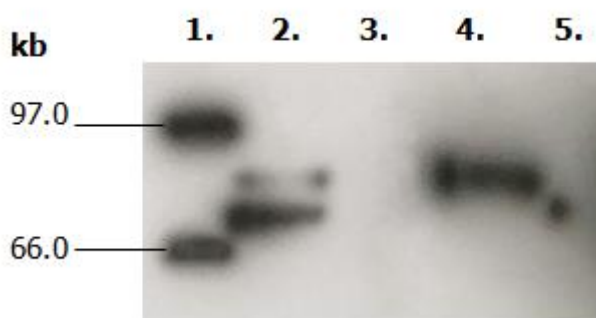
neprocirana forma Scw4 proteina (Grbavac i sur., 2017). Kvasce u konačnom uzgoju u podlozi s galaktozom uzgajamo do $OD_{600} \approx 2$ jedinice/ml, nakon čega prema prethodno opisanom protokolu izoliramo stijenke i proteine stijenki kvasca. Izolirane stijenke podvrgnute su tretmanu kuhanjem u SDS-u uz dodatak β -merkaptetanola čime je dobiven SDS ekstrakt koji sadržava nekovalentno vezane proteine stanične stijenke. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke sadržani su u NaOH ekstraktu koji je dobiven prekonoćnim tretmanom sa NaOH stijenki iz kojih su prethodno uklonjeni nekovalentno vezani proteini prema prethodno opisanom postupku u poglavlju „Metode i materijali“. Izolirani proteini razdvojeni su SDS elektroforezom te nakon toga preneseni na nitroceluloznu membranu metodom western blota na kojoj su detektirani –HA antitijelima (slika 3. i slika 4.).



Slika 3. Ispitivanje nekovalentnog vezanja nativnog i mutiranog oblika proteina Scw4 u staničnoj stijenci kvasca uzgojenog pri pH 4 i pH 7 Proteini stijenki izolirani u SDS ekstraktu detektirani su metodom Western blota pomoću –HA antitijela. Uzorci : 1. LMV standard; 2.nativni Scw4, pH=4; 3. mutirani oblik Scw4mutP, pH=4; 4. nativni Scw4, pH=7; 5.mutirani oblik Scw4mutP, pH=7

Western blot analizom SDS ekstrakta vidljive su vrpce proteina koji se u staničnu stijenku vežu nekovalentnim interakcijama. Pri tome nije vidljiva vrpca mutiranog proteina Scw4mutP izoliranog iz kvasca koji je uzgajan pri pH 4 što može biti rezultat niže koncentracije proteina u ekstraktu od očekivane koncentracije ili lošeg nanošenja uzorka na elektroforezu. S druge strane, vrpca istog proteina pri pH 7 jasno je vidljiva iz čega se može zaključiti kako je tijekom eksperimenta došlo do pogreške u radu pri čemu su proteini izgubljeni u koracima izolacije i pročišćavanja.

Proučavanjem dobivenih proteinskih vrpca u SDS ekstraktu, mogu se uočiti razlike u jakosti vrpce ovisno o pH vrijednosti pri kojoj je uzgajan kvasac iz kojeg su izolirani proteini. Pri pH vrijednosti 4, aktivni su proteolitički enzimi koji procesiraju proteine, Kex2 proteaza i japsinske proteaze, te u staničnoj stijenci prevladava najmanji, procesirani oblik Scw4 proteina koji se u staničnu stijenu veže nekovalentnim interakcijama (slika 3). Pri pH vrijednosti 7, slabija je aktivnost proteolitičkih enzima pa u staničnoj stijenci prevladava veći, neprocesirani oblik Scw4 proteina koji se u staničnu stijenu veže i kovalentno i nekovalentno (slika 3). Stoga je pri pH 4 u SDS ekstraktu jača donja proteinska vrpca koja prikazuje proteine procesirane Kex2 proteazom i japsinskim proteazama dok je pri pH 7 jača gornja proteinska vrpca koja prikazuje neprocesirani, veći oblik proteina Scw4. Daljnjom analizom proteinskih vrpca SDS ekstrakta uočena je malo povećana elektroforetska pokretljivost mutiranog oblika proteina u usporedbi s nativnim proteinom, pa se proteinska vrpca neprocesiranog oblika proteina nalazi malo niže u gelu nego kod nativnog oblika proteina. Prema tome, možemo zaključiti da je unešena mutacija uzrokovala povećanje elektroforetske pokretljivosti proteina u poliakrilamidnom gelu.



Slika 4. Ispitivanje kovalentnog vezanja nativnog i mutiranog oblika proteina Scw4 u staničnoj stijenci kvasca uzgojenog pri pH 4 i pH 7 Proteini stijenci izolirani u NaOH ekstraktu metodom western blota pomoću –HA antitijela. Uzorci : 1. LMV standard; 2. nativni Scw4, pH=4; 3. mutirani oblik Scw4mutP, pH=4; 4. nativni Scw4, pH=7; 5. mutirani oblik Scw4mutP, pH=7

Rezultati western blot analize proteina u NaOH ekstraktu koji sadrži proteine vezane kovalentno u staničnu stijenu, ne pokazuju vidljivu vrpcu mutiranog proteina Scw4mutP pri uzgoju kvasca na pH 4 kao niti pri uzgoju kvasca na pH 7. U prijašnjim istraživanjima ustanovljeno je kako se nativni Scw4 protein može vezati kovalentno u staničnu stijenu te je pri tome na nitroceluloznoj membrani NaOH ekstrakta jasno vidljiva proteinska vrpca (Grbavac i sur., 2017). Prema tome možemo zaključiti kako je mutirana regija u sekvenci Scw4 proteina bitna za kovalentno vezanje Scw4 proteina u staničnu stijenu. U daljnjim istraživanjima, potrebno je istražiti koji pojedinačni aminokiselinski ostatak unutar mutirane regije sudjeluje u kovalentnom povezivanju.

Rezultat Western blot analize u NaOH ekstraktu nativnog Scw4 proteina izoliranog iz kvasca uzgojenog pri pH 4 pokazuje vidljivu vrpcu oblika proteina koji je procesiran japsinskim proteazama (najmanja forma) te slabu vrpcu oblika proteina koji je procesiran Kex2 proteazom (srednja forma) dok nije vidljiva vrpca neprocesiranog oblika proteina (najveća forma) koja se veže kovalentno i koja bi, prema prethodnim istraživanjima, trebala prevladavati (Grbavac i sur., 2017). Prema tome rezultati dobiveni za nativni Scw4 pri pH 4 ne slažu se sa prethodnim istraživanjima te bi ih trebalo ispitati u daljnjim istraživanjima.

5. ZAKLJUČCI

Restrikcijском analizom s restrikcijским enzimom SapI potvrđena je ispravnost konstruiranih plazmida pBG1805 *SCW4* i pBG1805 *SCW4mutP*.

Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* uspješno su transformirane izoliranim plazmidima, a transformanti su selekcionirani na YNB Leu⁻ čvrstoj podlozi.

Western blot analizom SDS ekstrakta potvrđena je ekspresija i vezanje u staničnu stijenku mutiranog oblika Scw4 proteina pri uzgoju kvasca pri pH 7, dok je pri uzgoju pri pH 4 došlo do pogreške u eksperimentu i gubitka proteina. Istom metodom potvrđena je ekspresija i vezanje u staničnu stijenku nativnog Scw4 proteina kod kojeg pri pH 4 prevladava procesirani oblik, dok pri pH 7 prevladava neprocesirani oblik.

Western blot analizom NaOH ekstrakta nije detektirano vezanje mutiranog Scw4 proteina u staničnu stijenku što znači da je mutirana regija odgovorna za kovalentno povezivanje proteina u staničnu stijenku.

6.LITERATURA

- Aimanada V., Clavaud C., Simenel C., Fontaine T., Delepierre M., Latgé J. (2009) Cell Wall β -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 13401 – 13412.
- Bader O., Kraukel Y., Hube B. (2008) Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiology* **8**: 116.
- Bourbonnais Y., Ash J., Daigle M., Thomas D.Y. (1993) Isolation and characterization of yeast *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in somatostatin expression: cloning and a functional role of a gene encoding an aspartyl protease in precursor processing at monobasic cleavage sites. *EMBO Journal* **12**: 285 – 294.
- Bourbonnais Y., Germain D., Ash J., Thomas D.Y. (1994) Cleavage of prosomstatins by the yeast Yap3 and Kex2 endopeptidase. *Biochimie* **96**: 226 – 233.
- 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.
- De Nobel J.G., Klis F.M., Priem J., Munnik T. (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 491 – 499.
- 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.
- Fuller R.S., Brake A., Thorner J. (1989) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca^{2+} -dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 1434 – 1438.
- Gagnon-Arsenault I., Tremblay J., Bourbonnais Y. (2006) Fungal yapsins and cell wall_ a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. *Federation of European Microbiological Societies* **6**: 966 – 978.
- Germain D., Dumas F., Vernet T., Bourbonnais Y., Thomas D.Y., Boileau G. (1992) The pro-region of the Kex2 endoprotease of *Saccharomyces cerevisiae* is removed by self-processing. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **299**: 283 – 286.
- 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.
- Grbavac A., Čanak I., Stuparević I., Teparić R., Mrša V. (2017) Proteolytic processing of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein Scw4 regulates its activity and influences its covalent binding to glucan. *Biochimica et Biophysica Acta* : 507 – 515.

- Heiman M.G., Engel A., Walter P. (2007) The Golgi-resident protease Kex2 acts in conjunction with Prm1 to facilitate cell fusion during yeast mating. *The Journal of Cell Biology* **176**: 209 – 222.
- Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **26**: 239 – 256.
- Lesage G., Bussey H. (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 317 – 43.
- Lipke P.N., Ovalle R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *The Journal of Bacteriology* **180**: 3735 – 3740.
- 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.
- Olsen V., Cawley N.X., Brandt J., Egel-Mitani M., Loh Y.P. (1999) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* yapsin 3, a new member of the yapsin family of aspartic proteases encoded by the YPS3 gene. *Biochemical Journal* **339**: 407 – 411.
- Orlean P. (2012) Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics* **192**: 775 – 818.
- Qadota H., Python C.P., Inoue S.B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., Watanabe T., Levin D.E., Ohya Y. (1996) Identification of yeast Rho1pGTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**: 279 – 81.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. (2004) Introduction : aspartic peptidases and their clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes* **2**: 3 - 12. Elsevier, London.
- Shaw J.A., Mol P., Bowers B., Silverman S.J., Valdivieso M.H., Durdn A., Cabib E. (1991) The Function of Chitin Synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *The Journal of Cell Biology* **114**: 111 – 123.
- Šestak S., Hagen I., Tanner W., Strahl S. (2004) Scw10, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology* **150**: 3197 – 320.
- 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.
- 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.

Van den Hazel H.B., Kielland-Brandt M.C., Winther J.C. (1993) The Propeptide Is Required for in Vivo Formation of Stable Active Yeast Proteinase A and Can Function Even When Not Covalently Linked to the Mature Region. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 18002 – 18007.

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.

Wilcox C.A., Fuller R.S. (1991) Posttranslational Processing of the Prohormone-cleaving Kex2 Protease in the *Saccharomyces cerevisiae* Secretory Pathway. *The Journal of Cell Biology* **115**: 297.

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.

Alma Matijević

Ime i prezime studenta