

Predviđanje karakterističnih regija, mjesta posttranslacijskih preinaka i trodimenzionalnih struktura yapsinskih proteaza kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Gulan, Petra

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:159:987601>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Petra Gulan

7404/BT

Predviđanje karakterističnih regija, mjesta posttranslacijskih preinaka i trodimenzionalnih struktura yapsinskih proteaza kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

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

Predviđanje karakterističnih regija, mjesta posttranslacijskih preinaka i trodimenzionalnih struktura yapsinskih proteaza kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Petra Gulan, 0058210658

Sažetak: Yapsini kvasca *Saccharomyces cerevisiae* čine posebnu skupinu aspartatnih proteaza koja je usidrena u staničnu membranu ili stijenku preko GPI sidra. Uloge yapsina zasad su slabo istražene, ali je poznato da su važni za održavanje integriteta stanične stijenke. U ovome su radu korištene računalne metode kojima su na temelju aminokiselinskih sekvenci yapsina predviđene njihove karakteristične regije, mjesta posttranslacijskih preinaka i trodimenzionalne strukture. Predviđeni su položaji karakterističnih regija, kao što je signalni peptid, mjesto procesiranja, aktivno mjesto, mjesto vezanja GPI sidra i mjesta N-glikozilacije. Aminokiselinske sekvence yapsina su srađnjene kako bi se dobio uvid u očuvane regije. Filogenetskom analizom utvrđeno je kako Yps1-3 formiraju zasebnu granu filogenetskog stabla u odnosu na Yps6-7. Homolognim modeliranjem predviđene su trodimenzionalne strukture yapsina, koje karakterizira tzv. bilobalna struktura u kojoj su katalitički aspartatni ostatci različitih polutka orijentirani jedan prema drugome. Analize provedene u sklopu ovog rada olakšati će buduća *in vivo* istraživanja yapsina kvasca.

Ključne riječi: filogenetska analiza, homologno modeliranje, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, poravnanje, yapsini

Rad sadrži: 35 stranica, 13 slika, 7 tablica, 39 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: Doc. dr.sc. Igor Stuparević

Pomoć pri izradi: Ana Novačić, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 1. rujna 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

Prediction of characteristic regions, posttranslational modification sites and three-dimensional structures of *Saccharomyces cerevisiae* yapsin proteases

Petra Gulan, 0058210658

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* yapsins form a special group of aspartate proteases that are anchored to the cell membrane or cell wall through the GPI anchor. Roles of yapsins have been poorly explored, but they are known to be important for maintaining cell wall integrity. In this work, computational methods have been used to predict characteristic regions, sites of posttranslational modifications and three-dimensional structures of yapsins, based on their amino acid sequences. Positions of characteristic regions, such as signal peptide, processing sites, active site, GPI anchor binding site and N-glycosylation sites were predicted. The amino acid sequences of yapsins were aligned to get insight into conserved regions. Phylogenetic analysis determined that Yps1-3 form a separate branch of the phylogenetic tree in regard to Yps6-7. Homology modeling was used to predict three-dimensional structures of yapsins, which are characterized by the so-called bilobal structure in which each lobe contributes a catalytic aspartate residue. Analyses conducted in this work will facilitate future *in vivo* research of fungal yapsins.

Keywords: homology modeling, phylogenetic analysis, sequence alignment, yapsins, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 35 pages, 13 figures, 7 tables, 39 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: assistant prof. Igor Stuparević, PhD

Technical support and assistance: Ana Novačić, mag. ing. biotechn.

Defence date: September 1st 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. Sekretorni put kvasca <i>S. cerevisiae</i>	3
2.2.1. Usmjeravanje proteina u sekretorni put i njihov prolazak kroz endoplazmatski retikulum	4
2.2.2. Posttranslacijske modifikacije proteina sekretornog puta.....	5
2.3. Aspartatne proteaze	7
2.3.1. Yapsini	7
2.3.2. Ortolozni yapsina u kvascima roda <i>Candida</i>	9
3. MATERIJALI I METODE.....	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Aminokiselinske sekvence korištene u radu.....	10
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Računalni alati za predviđanje karakterističnih regija i mjesta posttranslacijskih preinaka te sravnjivanje proteinskih sekvenca	12
3.2.2. MEGA - program za izradu filogenetskog stabla	13
3.2.3. Računalni alati za homologno modeliranje	13
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	15
4.1. Predviđanje aktivnih mjesta, karakterističnih regija i mjesta posttranslacijskih preinaka yapsina kvasca <i>S. cerevisiae</i>	15
4.1.1. Predviđanje aktivnih mjesta	15
4.1.2. Predviđanje signalnog peptida	17
4.1.3. Predviđanje mjesta N-glikozilacije	19
4.1.4. Predviđanje mjesta vezanja GPI sidra	20
4.1.5. Predviđanje monobazičnih i dibazičnih mjesta procesiranja	22
4.1.6. Predviđanje disulfidnih mostova.....	23
4.1.7. Sravnjivanje proteinskih sekvenca yapsina i filogenetsko stablo	24
4.2. Homologno modeliranje strukture yapsina kvasca <i>S. cerevisiae</i>	26
4.2.1. Homologno modeliranje strukture yapsina Yps1-3.....	26
4.2.2. Homologno modeliranje strukture Yps6-7	29
5. ZAKLJUČCI	32
6. POPIS LITERATURE.....	33

1. UVOD

Mnogi proteini u stanicama kvasca sintetiziraju se u zimogenom obliku te je za njihovu aktivaciju potrebno procesiranje proteolitičkim enzimima. Jedna od skupina proteolitičkih enzima koji sudjeluju u zimogenoj aktivaciji su yapsini, koji pripadaju porodici aspartatnih proteaza. Za ovu skupinu enzima karakteristična su dva aspartatna ostatka u aktivnom mjestu enzima koji aktiviraju molekulu vode, omogućujući joj nukleofilni napad na peptidnu vezu. Yapsini čine posebnu skupinu aspartatnih proteaza jer, za razliku od većine aspartatnih proteaza koje cijepaju supstrate unutar hidrofobne regije, yapsini procesiraju supstrate iza mono- i dibazičnih mjesta. Ortolozi yapsina identificirani su u drugim kvascima, kao što su *Candida albicans*, *Saccharomyces pombe*, *Candida glabrata* i *Aspergillus oryzae*. Osim procesiranja propeptida, yapsini doprinose održavanju integriteta i remodeliranju stanične stijenke, budući da su ovi enzimi lokalizirani u staničnoj membrani ili stijenci kvasca, u koje se ugrađuju pomoću GPI sidra lokaliziranog na C-terminusu proteina. Također, yapsini sadrže očuvane karakteristične regije i mjesta procesiranja, kao što su signalni peptid, aktivno mjesto, mjesto procesiranja propeptida, mjesto vezanja GPI sidra, mjesta N-glikozilacije te cisteinske ostatke koji tvore disulfidne mostove. Cilj ovog rada bio je na temelju proteinskih sekvenci predvidjeti karakteristične regije, potencijalna mjesta posttranslacijskih preinaka i trodimenzionalne strukture yapsina. Pri tome su korištene računalne metode za predikciju, poravnanje sekvenci, filogenetsku analizu i homologno modeliranje trodimenzionalne strukture. Dobiveni rezultati za vrlo slabo istražene Yps6 i Yps7 uspoređeni su s rezultatima i dosadašnjim saznanjima za Yps1-3 koji su detaljnije okarakterizirani *in vivo* i *in vitro*.

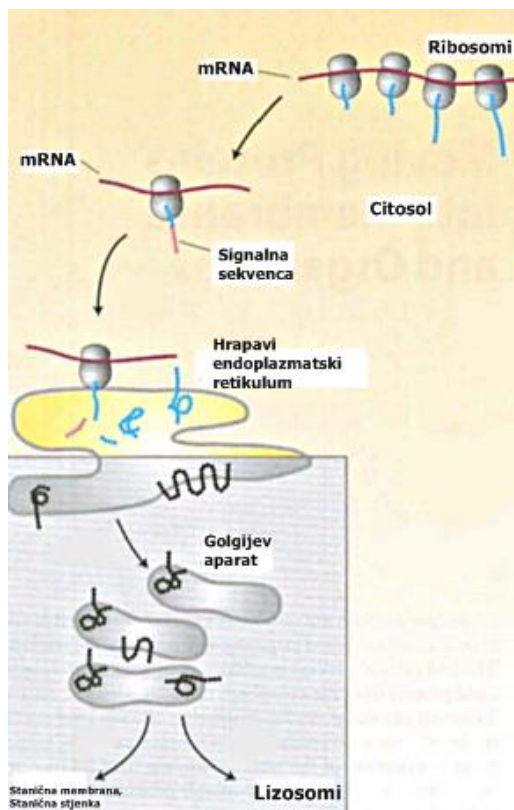
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* najvažniji je eukariotski modelni mikroorganizam u molekularnoj genetici te važan mikroorganizam koji se koristi u biotehnologiji, farmaceutskoj industriji te industriji hrane i pića. Pripada carstvu Fungi, ovalnog je oblika i veličine 5-10 μm u promjeru. Njegova česta primjena u znanstvenim istraživanjima proizlazi iz nepatogenosti, lakog i ekonomičnog uzgoja u laboratorijskim uvjetima te jednostavnog genetičkog manipuliranja. Stanice kvasca mogu biti u haploidnom ili diploidnom obliku, a dijele se pupanjem svakih 90 minuta u optimalnim uvjetima prilikom čega se, obzirom na veličinu pupa, može jednostavno odrediti stadij staničnog ciklusa (Duina i sur., 2014). Kvasac je prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvenciran, čime je definirana detaljna genska mapa koja sadrži 5885 gena (Goffeau i sur., 1996), koji su organizirani u 16 kromosoma u haploidnom, odnosno 32 kromosoma u diploidnom obliku. Haploidne stanice mogu postojati u dva tipa parenja, **a** ili α , dok su diploidne stanice a/α tipa parenja. Hoće li stanica biti **a** ili α tipa parenja ovisi o sekvenci unutar lokusa MAT na 3. kromosomu. Ako se u lokusu nalazi sekvenca MAT**a**, kvasac je **a** tipa parenja, a ako se nalazi sekvenca MAT α kvasac je α tipa parenja (Tamarin, 1999). Diploidna stanica, a/α tipa parenja, nastaje fuzijom haploidnih stanica suprotnog tipa parenja. Naime, stanica **a** tipa parenja proizvodi feromon a i na površini ima receptore za feromon α , a stanica α tipa parenja obrnuto. Vežanjem feromona suprotnog tipa parenja na receptore započinje izduživanje stanice prema izvoru feromona te u konačnici dolazi do fuzioniranja stanica (Tamarin, 1999). Takva diploidna stanica u stresnim okolišnim uvjetima, prvenstveno zbog nedostatka nutrijenata, može ući u mejozu. Mejozom nastaju 4 haploidne spore omotane ovojnicom - askusom, koje prilikom ponovne uspostave povoljnih uvjeta germiniraju u 2 **a** i 2 α vegetativne stanice (Herskowitz & Of, 1988). Najvažnija karakteristika kvasca *S. cerevisiae* za industriju hrane i pića je njegova mogućnost fermentacije šećera u alkohol i ugljikov dioksid. Upravo zbog široke primjene u industriji, metodama genetičkog inženjerstva konstruirani su različiti sojevi koji daju kvalitetnije proizvode i veće prinose. Kvasac je pogodan za genetičku manipulaciju zbog toga što je integracija željene rekombinantne DNA u genom olakšana zbog efikasne homologne rekombinacije.

2.2. Sekretorni put kvasca *S. cerevisiae*

Stanica kvasca sadrži do oko 6000 različitih proteina, od čega je jedan dio lokaliziran u citosolu, dok se drugi translocira u različite stanične organele ili se izlučuje izvan stanice (Lodish i sur., 2012). Jedan od načina na koji se proteini translociraju jest ulaskom u sekretorni put. Sekretorni put je kompleksan niz različitih procesa koji zahtijevaju proteinske produkte kodirane pomoću više stotina gena (Delic i sur., 2013), a uključuje transport proteina kroz endoplazmatski retikulum (ER) do finalne lokacije u ili izvan stanice (Slika 1). Na slici 1 prikazan je pojednostavljeni prikaz sekretornog puta koji započinje ulaskom proteina u hrapavi ER, tijekom ili neposredno nakon sinteze, zahvaljujući signalnoj ER sekvenci koja se nalazi na N-terminusu proteina. Nakon izlaska iz ER-a, proteini putem transportnih vezikula ulaze u Golgijev aparat, nakon čega se dalje mogu konačno lokalizirati u lizosome, plazmatsku membranu, staničnu stijenku ili u izvanstanični prostor. Prije nego dođu do krajnjeg odredišta, proteini podliježu različitim modifikacijama s ciljem smatanja u njihove native strukture i poboljšanja stabilnosti proteina koji su izloženi izvanstaničnom okruženju (Lodish i sur., 2012). Četiri glavne skupine modifikacija su kovalentno vezanje ugljikohidrata, formiranje disulfidnih mostova, pravilno smatanje u konačnu trodimenzionalnu strukturu te specifično proteolitičko cijepanje.



Slika 1. Sekretorni put. (Molecular Cell Biology, Lodish i sur., 2012)

2.2.1. Usmjeravanje proteina u sekretorni put i njihov prolazak kroz endoplazmatski retikulum

U sekretorni put ući će svi proteini koji imaju signalni peptid, odnosno hidrofobnu N-terminalnu signalnu sekvencu koja se sastoji od 16-30 aminokiselinskih ostataka. Iako signalni peptid ne posjeduje strogo određen motiv, sve signalne sekvence različitih sekretornih proteina imaju jednu ili više pozitivno nabijenih aminokiselinskih grupa nakon čega slijede hidrofobne aminokiselinske grupe (Lodish i sur., 2012). Signalni peptid većine sekretornih proteina odcjepljuje se već kotranslacijski te nije prisutan u zrelom obliku proteina. Hidrofobna srž signalnog peptida esencijalna je za njegovu funkciju. Ako se deletiraju hidrofobni aminokiselinski ostaci ili se uvede mutacija prije pozitivno nabijenih ostataka, dolazi do gubitka funkcije signalnog peptida i takvi proteini ostaju u citosolu (Lodish i sur., 2012). Nasuprot tomu, metodama genetičkom inženjerstva se često na N-terminalnom dijelu gena insertiraju sekvence koje kodiraju za signalni peptid kako bi željeni protein bio izlučen iz stanice, u svrhu lakšeg izdvajanja i pročišćavanja. Bitno je napomenuti kako nisu svi proteini koji sadrže signalni peptid izlučeni iz stanice, već postojanje signalnog peptida indicira samo da protein ulazi u sekretorni put, odnosno prolazi kroz ER.

Endoplazmatski retikulum (ER) je velika organela koja se nastavlja na jezgrinu membranu, a sadrži plosnate šupljine i cisterne kroz koje se transportiraju različite molekule. Prvi korak sekretornog puta jest transfer proteina kroz ER membranu. Translokacija proteina može se provesti na dva načina. Prvi način je kotranslacijski, pri čemu su translacija i translokacija izravno povezane, a drugi posttranslacijski, pri čemu se translocira prethodno sintetiziran protein (Zimmermann i sur., 2011). U kvascu *S. cerevisiae* način na koji se proteini translociraju ovisi o hidrofobnosti signalnog peptida, koja utječe na vezanje na dio koji prepoznaje signalni kompleks - SRP (Delic i sur., 2013). SRP je citosolni ribonukleoproteinski kompleks koji veže signalni peptid zajedno s 60S podjedinicom ribosoma. Kotranslacijska translokacija započinje vezanjem signalnog peptida i 60S podjedinice ribosoma na SRP, koji potom vezanjem na SRP receptor usmjerava protein u translokon lokaliziran u membrani ER-a (Sec61 kompleks) (Lodish i sur., 2012). 60S ribosomalna podjedinica orijentirana je tako da rastući lanac nikad nije okrenut prema citoplazmi. SRP i SRP receptor hidroliziraju dvije molekule GTP-a, što uzrokuje disocijaciju SRP-a, a protein se nastavlja translirati kroz translokon, dok konačno ne dođe do lumena ER-a gdje transmembranski protein signalna peptidaza prepoznaje signalni peptid i odcjepljuje ga. Nakon završene translacije, ribosom se otpušta s membrane, translokon zatvara, a protein smata u nativnu konformaciju (Lodish i sur., 2012). U posttranslacijskoj translokaciji, već sintetiziran protein usmjerava se prema ER

membrane interakcijom signalnog peptide s translokomom. Translatirani protein ne smije biti u već smotanoj konformaciji kako ne bi došlo do agregacije umjesto translokacije, a to se postiže na način da se šaperoni iz porodice proteina HSP70, Ssa1 i Ydj1, vežu na protein i stabiliziraju ga (Delic i sur., 2013). Nesmotani polipeptidni lanac translocira se kroz translokon uz pomoć dodatnog proteina BiP, koji katalizira hidrolizu ATP-a. Kada protein dospije u lumen ER-a, signalni peptid također se odcjepljuje sa signalnom peptidazom.

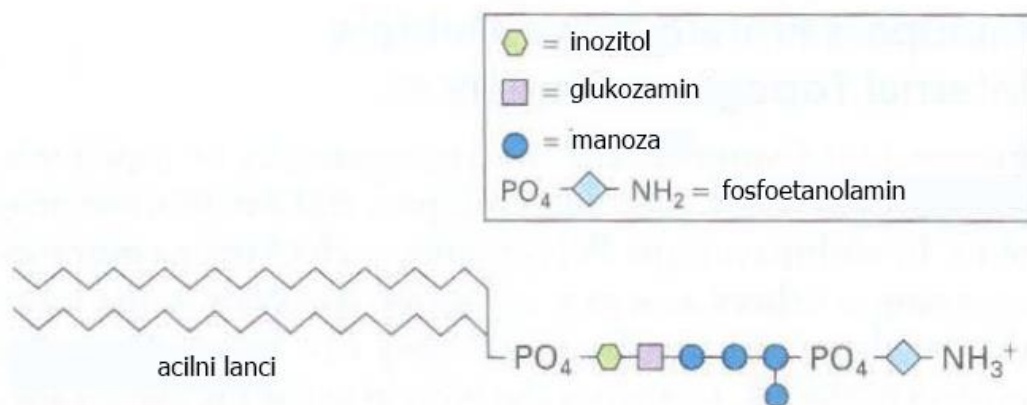
2.2.2. Posttranslacijske modifikacije proteina sekretornog puta

U svrhu smatanja u nativnu konformaciju i strukturno najstabilniji oblik, sekretorni proteini nakon ulaska u ER podliježu različitim modifikacijama, prilikom čega dolazi do cijepanja ili stvaranja novih kovalentnih veza. Modifikacije, kao što je glikozilacija, omogućuju stanici stvaranje velikog broja kemijski različitih molekula na staničnoj površini koje sudjeluju u specifičnim međustaničnim interakcijama (Lodish i sur., 2012). Proteini koji se glikoziliraju tj. modificiraju dodatkom ugljikohidratnog lanca (glikana) zovu se glikoproteini, a obzirom na to je li ugljikohidratni lanac dodan na hidroksilnu grupu serinskog ili treoninskog aminokiselinskog ostatka ili na amidnu grupu asparaginskog ostatka razlikujemo O- odnosno N-glikozilaciju. Biosinteza N-vezanih oligosaharida započinje u hrapavom ER-u, dodatkom oligosaharidnog prekursora koji sadrži 14 monomera; 3 glukoze, 9 manoze i dva N-acetilglukozamina (Lodish i sur., 2012). Sinteza prekursora odvija se na citoplazmatskoj strani membrane ER-a gdje se N-acetilglukozamin fosfat (GlcNAc-P) prenosi na prekursor dolikol fosfat (Dol-P) pomoću uridin-5'-difosfat-N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) (Lehle i sur., 2006). Ostali šećeri povezuju se glikozidnim vezama u nizu složenih reakcija prilikom čega nastaje kompleks N-vezanog glikana koji se različitim glikozidazama i glikozil-transferazama u ER-u i Golgijevom aparatu dodatno modificira. Za razliku od N-vezanih glikana, O-vezani glikani su u pravilu kraći te sadrže 1-4 šećerna ostatka (Lodish i sur., 2012). Postoje različiti O-vezani glikani, a u stanicama kvascima najzastupljenija je O-manozilacija, pri kojoj se prijenos prvog šećernog ostatka (manoze) odvija u ER-lumenu prilikom translokacije (Lehle i sur., 2006). Različitim oblicima glikozilacije jedan se protein pojavljuje u više gliko-oblika, što pridonosi povećanju omjera između broja različitih proteina i gena u stanici.

Jedna od posttranslacijskih modifikacija koja se događa u lumenu hrapavog ER-a, a doprinosi stabilizaciji tercijarne i kvaterne strukture proteina, je stvaranje disulfidnih mostova. Zbog toga u većini slučajeva citosolni proteini nemaju disulfidne mostove. Disulfidni mostovi nastaju između dva cisteinska aminokiselinska ostatka istog ili različitog polipeptidnog lanca

oksidacijom sulfhidrilnih skupina. Oksidacija se događa spontano samo u slučajevima kada je prisutan odgovarajući oksidans. Efikasnost formiranja disulfidnih mostova uvelike ovisi o enzimu proteinska disulfid izomeraza (PDI) (Lodish i sur., 2012).

Modifikacija kojoj podliježu proteini sekretornog puta nakon prolaska endoplazmatskog retikuluma, a čija je krajnja lokalizacija stanična stijenka ili stanična membrana, jest vezanje kompleksa glikofosfolipida, odnosno GPI (glikozilfosfatidilinozitol) sidra na C-terminus proteina. Molekula GPI sidra u kvascima sastoji se od hidrofobnog dijela, odnosno dva acilna lanca masnih kiselina, i polarnog, hidrofilnog dijela koji sadrži ugljikohidrate i fosfatne grupe (Slika 2). Ovakva struktura omogućuje integraciju u fosfolipidni sloj membrana. Da bi se protein GPI-modificirao, mora sadržavati GPI signal. GPI signal se sastoji od signalnog aminokiselinskog ostatka (omega-mjesto, ω), polarne regije te hidrofobne regije koju čini više od 11 aminokiselinskih ostataka (Caro, 1997). Enzim GPI transamidaza prepoznaje i uklanja signal s C-terminalnog dijela proteina i zamjenjuje ga GPI sidrom (Lodish i sur., 2012), prilikom čega nastaje nova peptidna veza između karboksilne skupine proteina i amino skupine GPI sidra. Uloge GPI proteina su različite, ali još uvijek nisu u potpunosti istražene. Poznato je kako neki GPI-vezani proteini kataliziraju reakcije nužne u biosintezi i održavanju integriteta stanične stijenke, dok su neki strukturni elementi stanične stijenke ili posreduju u procesu adhezije stanica. Uz pomoć različitih bioinformatičkih alata kojima je *in silico* analiziran kvašćev genom, sastavljena je lista GPI proteina, međutim, samo za manjinu je postojanje GPI sidra potvrđeno eksperimentalno (Pittet & Conzelmann, 2007). Metode kojima je moguće dokazati postojanje GPI sidra jesu inkubacija membranske frakcije s bakterijskim PI-PLC, fosfoinozitud fosfolipazom C, pri čemu dolazi do disocijacije GPI-modificiranih proteina, označavanje komponenata GPI sidra npr. inozitola te uvođenje ciljane mutacije u pretpostavljenom ω mjestu (Pittet & Conzelmann, 2007).



Slika 2. Struktura GPI sidra (Molecular Cell Biology, Lodish i sur., 2012).

2.3. Aspartatne proteaze

Aspartatne proteaze dio su velike klase enzima hidrolaza, koje na različite načine kataliziraju hidrolizu kemijskih veza. Obzirom na tip supstrata na koje djeluju, pripadaju podskupini proteaza jer cijepaju peptidnu vezu. Iako im je uloga u stanici raznolika, motiv katalitičkog mjesta visoko je očuvan među svim aspartatnim proteazama, a uključuje slijed Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb, u kojemu je Xaa hidrofobni aminokiselinski ostatak, a Xbb serinski (S) ili treoninski ostatak (T). Mehanizam katalize odvija se koordinacijom molekule vode između dva aspartatna ostatka, prilikom čega jedan djeluje kao baza i aktivira molekulu vode koja napada karbonilni ugljik u peptidnoj vezi što rezultira stvaranjem intermedijera, tetraednog oksianiona, koji nije kovalentno vezan. Zbog toga se proteoliza odvija u jednom koraku, za razliku od katalize drugim proteazama. Naknadno deprotoniranje hidroksilne skupine katalitičkim aspartatnim ostatkom i istodobna aktivacija preostalog amina drugim protoniranim aspartatnim ostatkom, u konačnici dovodi do cijepanja peptidne veze (Suguna i sur., 1987). Najveću aktivnost pokazuju u području kiselog pH, a inhibiraju se pepstatinom. Obzirom na primarnu i tercijarnu strukturu, aspartatne proteaze klasificiraju se u 5 klanova: klan AA, klan AC, klan AD, klan AE i klan AF (N. D. Rawlings i sur, 2012). Klan AA najbolje je istražen, a članovi imaju bilobalnu strukturu u kojoj je jedna polutka evoluirala iz druge prilikom duplikacije gena. Najpoznatija podskupina klana AA je obitelj pepsina koja je sveprisutna u eukariotskim stanicama i obavlja mnoge stanične funkcije. Aspartatne proteaze sintetiziraju se u zimogenom obliku. Prosegment, vezan ionskim vezama na katalitički aspartatni ostatak preko lizinskog ostatka, procesira se proteazama ili acidifikacijom u kiselom mediju prilikom čega se aspartat protonira, a ionska veza puca (Tang i Wong, 1987).

2.3.1. Yapsini

Yapsini su GPI-vezani proteini iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji pripadaju obitelji aspartatnih proteaza (Yps1-3 i Yps6-7), a nužni su za održavanje integriteta stanične stijenke i homeostaze glukana (Krysan i sur., 2005). Za razliku od ostalih aspartatnih proteaza koje većinom procesiraju supstrate u hidrofobnoj regiji, yapsini supstrate cijepaju iza dibazičnih, odnosno monobazičnih mjesta. Yps1 i Yps2 identificirani su kao supresori fenotipova uzrokovanih delecijom gena koji kodira za serinsku proteazu Kex2, lokaliziranu u Golgijevom aparatu, koja procesira sekretorne proteine kao što je pro- α -faktor ili egzoglukanazu Exg1 (Krysan i sur., 2005). Yapsini su proteini čija je uloga, lokalizacija i trodimenzionalna struktura u procesu istraživanja, a većina pretpostavljenih karakteristika yapsina eksperimentalno je dokazana *in vivo* samo za Yps1-3 (Ash i sur., 1995; Cawley i sur., 1995, 1998; Komano &

Fuller, 2016; Olsen & Loh, 2000). Očuvane regije koje su pronađene u yapsinima su signalni peptid, propeptid, katalitičko mjesto, "insertion loop", Ser/Thr bogata regija, mjesto vezanja GPI-sidra i mjesta N-glikozilacije (Gagnon-Arsenault i sur., 2006). Yapsini se, kao i svi proteolitički enzimi, sintetiziraju u zimogenom obliku, a njihova se aktivacija događa u dva proteolitička koraka koja uključuju intramolekulsko i intermolekulsko procesiranje. Postojanje više homologa yapsina u *S. cerevisiae* s preklapajućom, ali ne i identičnom specifičnošću za supstrate, upućuje na to da su različito regulirani tijekom staničnog ciklusa i različitim okolišnih uvjeta (Gagnon-Arsenault i sur., 2006). Osim gena *YPS1-3* i *YPS6-7*, koji kodiraju za funkcionalne proteine, u genomu kvasca postoji i pretpostavljeni pseudogen koji kodira za protein Yps5 od 165 aminokiselinskih ostataka koji se velikim dijelom preklapaju s N-terminalnim dijelom proteina Yps6, što upućuje na to da je gen *YPS5* vjerojatno nastao kao rezultat duplikacije te mutacija gena *YPS6*.

Ekspresija yapsina uvjetovana je vanjskim faktorima npr. temperaturom i različitim agensima koji utječu na integritet stanične stijenke, što upućuje na ulogu yapsina u održavanju homeostaze stanične stijenke. Dvostruki yapsinski mutant *yps1Δ yps2Δ* ima defekt rasta pri 37°C (Komano & Fuller, 1995), dok pojedinačni yapsinski delecijски mutanti ne pokazuju defekte rasta pri 37°C (Krysan i sur., 2005). U slučaju delecije svih pet gena koji kodiraju za yapsine (*5ypsΔ*) pri 37°C također dolazi do defekta rasta koji je moguće suprimirati osmotskom stabilizacijom medija za uzgoj (Krysan i sur., 2005). Za Yps1, Yps3 i Yps6 pokazana je povećana ekspresija za vrijeme stresa i remodeliranja stanične stijenke (Causton i sur., 2001; García i sur., 2004), a kvantitativnim imunoblotom pokazana je 12 puta veća ekspresija Yps1 prilikom povećanja temperature s 24°C na 37°C (Ash i sur., 1995). Krysan i suradnici istraživali su kako yapsinski delecijски mutanti rastu u prisustvu četiri agensa koji destabiliziraju i interferiraju prilikom sinteze stanične stijenke: Calcofluor White, boja koja se veže na i destabilizira polimere hitina; Congo Red, boja koja interferira s hitinom i β -glukanom; kafein, spoj koji inducira stanični stres; i kaspofungin, inhibitor 1,3- β -glukan sintaze. Primjerice, soj *5ypsΔ* osjetljiv je na sva četiri agensa, dok pojedinačni delecijски mutanti pokazuju različitu osjetljivost na Calcofluor White, Congo Red, kafein i kaspofungin. Soj u kojem je deletiran gen *YPS7* pokazuje jedinstvenu visoku osjetljivost na Calcofluor White, što indicira da njegova uloga u održavanju integriteta stanične stijenke ovisi o hitinu. Višestruki yapsinski mutanti osjetljiviji su od pojedinačnih delecijских mutanata, što upućuje na to da im se uloge preklapaju, unatoč tome što se neki od njih ekspimiraju u različitim staničnim uvjetima. Yapsinski mutanti pokazuju defekte u ugradnji glukana u staničnu stijenku, ali ne i u njegovoj sintezi. Količina 1,3- i 1,6- β -glukana u staničnoj stijenci yapsinkih mutanata manja je u odnosu na količinu u divljem tipu te je kod njih smanjena bazalna aktivacija *PKC1-MPK1* puta –

najvažnijeg signalnog puta u održavanju integriteta stanične stijenke. Krysan i suradnici također su pokazali kako je ekspresija Yps1 regulirana upravo tim signalnim putem te kalcineurinom. Nadalje, prekomjerna ekspresija Yps1 suprimira preosjetljivost na kaspofungin, a homolozi Yps1 vrsti *Candida albicans* i *Candida glabrata* komplementiraju mutaciju *yps1Δ* u *S. cerevisiae* (Krysan i sur., 2005).

2.3.2. Ortolozi yapsina u kvascima roda *Candida*

Bioinformatičkim alatom NCBI-BLAST pronađeni su ortolozi yapsina u 16 različitih vrsta kvasaca koji pripadaju askomicetama, među kojima su i kvasci koji pripadaju rodu *Candida*: 11 gena (*YPS*) koji kodiraju za proteine slične yapsinima u kvascu *Candida glabrata* i 2 (*SAP9* i *SAP10*) u kvascu *Candida albicans* (Gagnon-Arsenault i sur., 2006). Više od polovice ljudske populacije u sklopu svoje mikrobiote kože, oralne šupljine i gastrointestinalnog trakta nosi ove vrste kvasca (Palareti i sur., 2016) koji uslijed narušavanja ravnoteže postaju patogeni. Velik problem predstavljaju i patogeni biofilmovi *Candida* koji mogu prekrivati površine implantiranih medicinskih pomagala ili epitelnih stanica sluznice, pri čemu su pojačano otporni na djelovanje antifungalnih sredstava i imunološkog odgovora domaćina (Ganguly & Mitchell, 2011). Jedan od čimbenika patogenosti su ekstracelularne endopeptidaze, od kojih su većina upravo aspartatne proteaze. Sap9 i Sap10 iz *C. albicans*, ortolozi Yps1 i Yps7 iz *S. cerevisiae*, degradiraju proteine koji sudjeluju u sintezi i remodeliranju stanične stijenke, kao što su hitin sintaza Ywp1 (engl. "yeast-form cell wall protein 1"), Als2 (eng."agglutinin-like sequence protein 2") i Rhd3 (engl. "protein repressed during hyphae development 3") (Palareti i sur., 2016). Sudjeluju u stvaranju patogenog biofilma jer utječu na svojstvo adhezivnosti stanične stijenke. Sap9 je odgovoran za reguliranje interakcije stanice s oralnim streptokokom, što je važno za formiranje mješovitih patogenih biofilmova (Dutton i sur., 2016) te degradira inhibitore proteaza. Genom *C. glabrata*, koji je sličniji genomu kvasca *S. cerevisiae* nego drugim vrstama roda *Candida*, sadrži barem 11 gena koji kodiraju za proteine koji pokazuju visoku podudarnost s yapsinima. Yapsini iz *C. glabrata*, osim Yps4 i Yps11, imaju signal za vezanje GPI sidra na C-terminusu što upućuje na kovalentno vezanje zrelih enzima na staničnu površinu (Palareti i sur., 2016). Uloga yapsina u *C. glabrata* je remodeliranje stanične stijenke te odgovor stanice u uvjetima stresa stanične stijenke. Mutant kojem je deletirano svih 11 gena pokazao je oslabljenu virulenciju zbog nemogućnosti preživljavanja antifungalnog odgovora makrofaga modelne životinje (Parra-Ortega i sur., 2009). Nadalje, *C. glabrata* yapsini, posebno Yps1, su esencijalni za preživljavanje u kiselom okolišu (Bairwa i sur., 2014) te remodeliranja stanične stijenke prilikom rasta na povišenim temperaturama. Poznato je da imaju ulogu u formiranju vakuole, ali nije detaljno istražena.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Aminokiselinske sekvence korištene u radu

SGD (engl. "The *Saccharomyces* Genome Database") <<https://www.yeastgenome.org/>> je baza podataka koja pruža uvid u sveobuhvatne biološke podatke o kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, kao i alate za pretraživanje i analizu tih podataka, omogućujući otkrivanje funkcionalnih odnosa između sekvence i genskog produkta u gljivama i višim eukariotima. U bazi podataka pronađene su aminokiselinske sekvence za proteine Yps1-3, Yps5-7, Pep4 i Bar1 u formatu FASTA koji su korišteni u daljnjim analizama, a prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Aminokiselinske sekvence za aspartatne proteaze

Protein	Aminokiselinska sekvenca
Yps1	MKLKTVRSVAVLSSLFASQVLGKIIPAANKRDDDSNSKFVKLPFHKLYGDSLENVGSDKKPEVRLKLRADGYEEII ITNQQSFYSVDLEVGTPPQNVTVLVDTGSSDLWIMGSDNPYCSSNSMGSSRRRVIDKRDDSSSGSLINDIN PFGWLTGTGSAIGPTATGLGGSGTATQVSPASEATMDCQYGTFTSTSGSSTFRSNNTYFSISYGDGTFASG TFGTDVLDLSDLNVTGLSFAVANETNSTMGVLGIGLPELEVITYSGSTASHSGKAYKYNFPIVLKNSGAIKSNT YSLYLNDSDAMHGTILFGAVDHISKYTGTYIPIVNTLSASGFSSPIQFDVTINGIGISDSGSSNKTLLTTKIPAL LDSGTTLYLPQTVVSMIATELGAQYSSRIGYVLDPCSDDSMIVDFGGFHINAPLSSFILSTGTTCLLGIPT SDDTGTILGDSFLTNAVYVYDLENLEISMAQARYNTTSENIEIITSSVPSAVKAPGYTNTWSTSASIVTGGNIFT VNSSQTASFSGNLTSTASATSTSSKRNVDHIVPSLPLTLISLLFAFI
Yps2	MKLSVLTFFVVDALLVCSIVDAGVTDFFPLSPNEVYVKMNFQKKYGGSSFENALDDTKGRTRLMTRDDDYELVE LTNQNSFYSVELDIGTPPQKVTVLVDTGSSDLWVTGSDNPYCSSTKTKDTTGSSFKQVNDALASVVESVFTEI SYDTTIVTSEATATFDSTASTSQLIDCATYGTFNSTKSSTFNSNTEFSIAYGDTTFASGTWGHDLQSLNDLNI TGLSFAVANETNSTVGLGIGLPGLESTYSGVLSVQKSYTYNNFPMVLKNSGVIKSTAYSFLANDSDSKHGT ILFGAVDHGKYAGDLYTIPIINTLQHRGYKDPYQVTLQGLGTSKGDKEDNLTLLTTKIPVLLDSGTTISYMP TELVKMLADQVGATYSSAYGYIMDCIKEMEEESSIIFDFGGFYLSNWLSDFQLVTDSDRSNICILGIAPQSDPTI ILGDNFLANTYVYDLDNMEISMAQANFSDGGEYIEIIESAVPSALKAPGYSSTWSTYESIVSGGNMFSTAANS SISYFASTSHSATSSSSSKGQKTQTSTTALSISKSTSSTSTGMLSPTSSSSTRKENGHNLPFFARFITAIF HHI
Yps3	MKLQAAVATLAVLTSPAFGRVLPDGKYVKIPFTKKKNGDNGELSKRSNGHEKFLANEQSFYSVELAIGTPSQ NLTVLLDTGSADLWVPGKGNPYCGSVMDCDQYGVFDKTKSSTFKANKSSPFYAAAYGDGTYAEGAFGQDKLKY NELDLSGLSFAVANESNSTFGVLGIGLSTLEVITYSGKVAIMDKRSYEDNFPLFLKHSGAIDATAYSLFLNDESQ SSGSILFGAVDHISKYEGQLYTIPLVNLKYSQGYQHPVAFDVTLQGLGLQTDKRNITLTTTKLPALLDSGTTLY LPSQAVALLAKSLNASYSKTLGYEYTCPSDNKTSVAFDFGGFRINAPLSDFTMQTSVGTCLVLAIIIPQAGNAT

	AILGDSFLRNAYVVYDLNYSIAQAKYGTGKENVEVIKSTVPSAIRAPSYNNTWSNYASATSGGNIFFTVRT FNGTSTATTTRSTTTKKTNSTTTAKSTHKSQRALQRAATNSASSIRSTLGLLLVPSLLILSVFFS
Yps5	MLQFSILSLLSSLMCSLTVLGSSASSYVKFPVQKQFADIINIGTQDVSTVFKRNEVLNNTTVINGIGVYVVKMEIGT PPQTVYLQLDTGSSDMIVNNADIAYCKSMSDGSYASTDNYELTATFTGPRSTTTSPELITLSALIGVNSMQET HLLLRIITRLSSMTYTY
Yps6	MLQISILSLLSSLMCSLTVLGSSASSYVKFPVQKLADIINICTQDVSTVFKRNEVLNNTTVINGIGVYVVKMEIGT PQTLYLQLDTGSSDMIVNNADIAYCKSMSDGSYASTDNYELTATFNGLPSTTISSEAYNTLCSYWGTFDASN SSTFENNATFFNNTYGDGTYAGTYGTDVVSFENITLNDFTFGVSNITIGNPSGILGISLPIAEFTDGIEYALAL NRTPFYIDNFMELKNQKINKIAYSFLNPGDAHFGSILFGAVDKSKYTGQLYTLPMLQAFNTLGSNPGMIIT AQSVAILDSESGNKTVSDIQFPVMLDSGTTFSYLPTEIAEAIGKSFGEYSSDDQGYIFDCSKVNDTLLSVDFG GFNISANISNFVTSKDRCLNVKQSESTYMLGDAFLVDAYVVYDLENYEISIAQASFNQEEIEVISDTPVG ATPAPGYFSTWVYKPGSPIGTGDFINVSWSYSEFSQYKSLATAAQSDASSFSSSGGSSESTTKQNAGYK YRSSFSFLLSFISYFLL
Yps7	MTCLILWYLWLITFQLEFATASTANTTTAKSGTSSSTEPPFVLA VGKDGRGNYYVNSTFGTPGQRQRLV DIIQPYINLVSGTSESHNEYSGVYHKHPSYLMNDSTSSVPVSPGQIYEISFIDGRAVNCTLVTDMMNFTNVSSE NSSTALITDLMVTRDNVQFNSSLSISNVFFDIQSSNFKTSGLLGLSGKVTNPGNAIDSSQYTEQSYFLLK DADIIESSYSWLWAGDTSTYKTYRDPISNCGKLLGGVDPFLFTGTLGKFDLIPYVDPVSNVSVGYPIVPLGP IYIVNSGQSLNMTSKDFLSPALLDSTSSVSYLPTSTIIQIAVQIAATYVESLDRWLQCSIADMGVSLGFRLE LTIEIPLRDLSSSTYDTSTNSSMFFSSGQEAFLTYANTNTGVNILGEAFIKNIYMAMDLEDNTIAIAQAKKVE DDAVTEETNETTASTIIKKIKSGYIPYAKVMSSNTRNLTYPSYRSGYMFTVPGQLTAAYSNGVITGAGRSFY DTSRASTSARPSSTQFDSFSVSASEEWSNSTNRTSSASGAGVRLSSPYTFNKDPAGHVTRIASLLLLSIFLILV L
Pep4	MFSLKALLPLALLLVSANQVAAKVHKAKIYKHELSDMKEVTFEQHLAHLGQKYLTFEKANPEVVFREHPFF TEGGHDVPLTNYLNAQYYTDITLGTTPQNFVILDGSSNLWVPSNECGSLACFLHSHKYDHEASSYKANGTE FAIQYGTGSLEGYISQDLSIGDLTIPKQDFAEATSEPGLTFAFGKFDGILGLGYDTISVDKVVPPFYNAIQQDL LDEKRFAYLGDTSKDTENGGEATFGGIDESKFKGDITWLPVRRKAYWEVKFEGIGLGEYAELESHGAAIDT GTSLITLPSGLAEMINAEIGAKKGWTGQYTLDCNTRDNLPLIFNFNGYNFTIGPYDYTLEVSGSCISAITPMD FPEPVGLAIVGDAFLRKYYSIYDLGNNAVGLAKAI
Bar1	MSAINHLCLKLILASFAIINTITALTNDGTGHLEFLLQHEEEMYYATLTDIGTPSQSLTVLFDTGADFWVMDSS NPFCLPNSNTSSYSNATYNGEEVKPSIDCRSMSTYNEHRSSTYQYLENGRFYITYADGTAFADGSWGTETVSIN GIDIPNIQFGVAKYATTPVSGVLGIGFPRRESVKGYEGAPNEYYPNFPQILKSEKIIDVWAYSFLNPSDSTGSI VFGAIDESKFGDLFTFPMVNEYPTIVDAPATLAMTIQGLGAQNKSSCEHETFTTTKYPVLLDSGTSLLNAPKVI ADKMASFVNASYSEEEGIYILDPCVSVGDVEYNFDFGDLQISVPLSSLILSPETEGSYCGFAVQPTNDSMVLGD VFLSSAYVFDLDNYKISLAQANWNASEVSKKLVNIQTDGSISGAKIATAEPWSTNEPFTVTSDIYSSTGCKSR PFLQSSSTASSLIAETNVQSRNCSTKMPGTRSTTVLSKPTQNSAMHQSTGAVTQTSNETKLELSSTMANSGSVS LPTSNSIDKEFEHKSQTSDPSVAEHSTFNQTFVHETKYRPTHKTVITETVTKYSTVLINVCKPTY

3.2. Metode

3.2.1 Računalni alati za predviđanje karakterističnih regija i mjesta posttranslacijskih preinaka te sravnjivanje proteinskih sekvenca

3.2.1.1. Server SignalP 5.0.

Server SignalP 5.0. <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>> predviđa postojanje i mjesto cijepanja signalnog peptida u proteinima Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, eukariota i arheja. Server u aminokiselinskoj sekvenci proteina pronalazi odgovarajući motiv signalnog peptida, a kao rezultat daje mjesto s najvećom vjerojatnošću cijepanja signalnom peptidazom. Aminokiselinska sekvenca yapsina pronađena u SGD-u unesena je u server te je korištena opcija predviđanja signalnog peptida u eukariotima sa zadanim ulaznim parametrima. Rezultati su dobiveni kao grafički prikaz rednog broja aminokiselinskog ostatka i vjerojatnosti cijepanja peptidazom.

3.2.1.2. Server NetNGlyc 1.0

NetNGlyc server <<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>> predviđa mjesta N-glikozilacije u humanim proteinima, a zbog istog motiva glikozilacije kao i u stanicama kvasca može se primijeniti i na yapsinima. Server prepoznaje motiv Asn-Xaa-Ser/Thr (pri čemu Xaa u pravilu predstavlja bilo koji aminokiselinski ostatak), te daje sva potencijalna mjesta glikozilacije. U slučaju kada je Xaa prolinski aminokiselinski ostatak takav rezultat se zanemaruje jer je vrlo mala mogućnost da će doći do glikozilacije zbog konformacije prolinskog ostatka. Parametri koji opisuju kvalitetu mjesta zanemareni su zbog toga što se odnose samo na humane proteine, a kao rezultat uzeta je samo informacija o mogućim pozicijama glikozilacije.

3.2.1.3. Big-PI Fungal predictor

Big-PI Fungal predictor <http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html> alat je koji predviđa postojanje ω -mjesta, odnosno potencijalna mjesta vezanja GPI sidra u proteinima članova carstva Fungi na temelju proteinske sekvence. Kao rezultat daje jedno ili više mjesta na kojima je moguća GPI modifikacija s pripadajućim parametrima koji opisuju kvalitetu mjesta. U slučajevima kada je dobiveno više potencijalnih mjesta uzeto je ono s boljim parametrima.

3.2.1.4. MUSCLE

MUSCLE (engl. "Multiple Sequence Comparison By Log- Expectation") <<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>> je računalni program za generiranje poravnanja između tri ili više sekvenci koje se mogu unijeti u nukleotidnom ili aminokiselinskom obliku. Maksimalan broj sekvenci koje se mogu sravniti je 500. Korišteni su zadani ulazni parametri i sekvence u aminokiselinskom obliku. Program je korišten u svrhu poravnanja sekvenca aspartatnih proteaza prilikom izrade filogenetskog stabla te poravnanja yapsina radi jasnijeg uvida u očuvane regije.

3.2.2. MEGA - program za izradu filogenetskog stabla

MEGA (engl. "Molecular Evolutionary Genetics Analysis") <<https://www.megasoftware.net/>> je računalni program koji sadrži velik broj analitičkih metoda i alata korištenih u filogenomiji i filomedicini prvenstveno za konstrukciju filogenetskog stabla na temelju proteinskih ili DNA sekvenca. Za izradu filogenetskog stabla unesene su proteinske sekvence aspartatnih proteaza (Yps1-3, Yps6-7, Pep4, Bar1) u FASTA formatu koje su sravnjene prema MUSCLE algoritmu, a korištena je statistička metoda maksimalne parsinomije (engl. "Maximum Parsimony") kojom se konstruira filogenetsko stablo s najkraćim evolucijskim putem. Metoda je izabrana jer je prigodna za malen broj vrlo sličnih sekvenca, a negativne strane su dugotrajnost i visoka mogućnost pogreške kada se analiziraju udaljene vrste. Također je korištena opcija *Bootstrap* testa filogenije s brojem ponavljanja 500, koji je jedan od najčešće korištenih testova pouzdanosti izvedenog stabla. Stablo se iznova rekonstruira, a krajnji rezultat analize je filogenetsko stablo s pripadajućim BS (engl. "Bootstrap") brojem izraženim u postotcima koji označava koliko puta u konstrukciji stabla je dobiven isti rezultat za određenu granu. BS>70/80 smatra se pouzdanim.

3.2.3. Računalni alati za homologno modeliranje

3.2.3.1. SWISS-MODEL

SWISS-MODEL <<https://swissmodel.expasy.org/>> je bioinformatički web-server osmišljen za homologno modeliranje 3D proteinskih struktura. Modeli proteina za koje nije poznata 3D struktura, kao što su yapsini, napravljeni su na temelju predložaka proteina koji

su im najsličniji po primarnoj strukturi, a čija je kristalografska struktura poznata i dostupna u bazi podataka. U server su unesene proteinske sekvence yapsina s osnovnim ulaznim parametrima te su izabrane one čiji su parametri kvalitete bili najbolji. Rezultat, 3D struktura, dobivena je u PDB formatu, a parametri kvalitete na lokalnoj razini u obliku grafa.

3.2.3.2. Pymol

Pymol < <https://pymol.org/2/>> je program koji se koristi za vizualizaciju molekula, među kojima su i biološke makromolekule poput proteina. U program su unesene PDB datoteke trodimenzionalne strukture yapsina dobivene uz pomoć SWISS-MODEL servera te uspoređene s predlošcima na temelju kojih su napravljene. Pymol je korišten za pregledniju vizualizaciju strukture yapsina i njihovih katalitičkih mjesta te raspoznavanje dijelova yapsina koji odudaraju od predloška.

4. REZULTATI I RASPRAVA

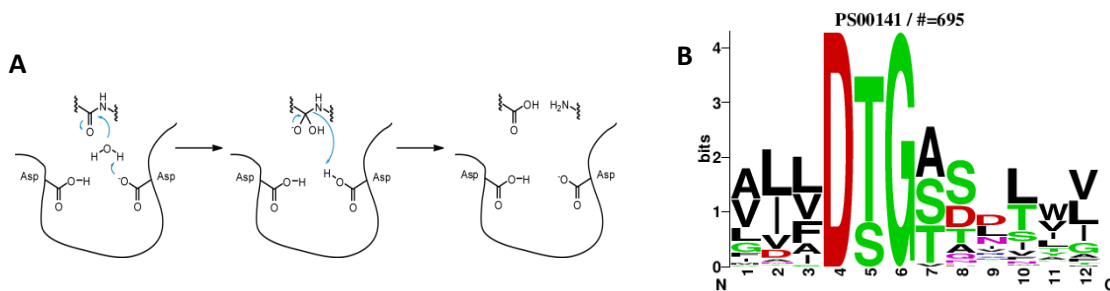
Yapsini su skupina slabo istraženih aspartatnih proteaza iz kvasca *S. cerevisiae* koja obuhvaća proteine Yps1-3 i Yps6-7, koji procesiraju supstrate iza mono- i dibazičnih mjesta. Karakteristika procesiranja supstrata iza mono- i dibazičnih mjesta yapsine čini posebnom skupinom aspartatnih proteaza, budući da su one uglavnom specifične za cijepanje unutar hidrofobnih regija. Ortolozi yapsina identificirani su u drugim kvascima, kao što su Sap8 i Sap9 iz *Candida albicans* (Monod i sur., 1998), Sp Yps1 iz *Saccharomyces pombe* (Ladds & Davey, 2000), Cg Yps1-11 iz *Candida glabrata* (Dujon i sur., 2004) i OpsB iz *Aspergillus oryzae* (Kunihiro i sur., 2002). Uloga yapsina u stanicama kvasca još uvijek nije u potpunosti definirana, ali je poznato kako sudjeluju u održavanju integriteta i remodeliranju stanične stijenke, ugradnji β -glukana u staničnu stijenku, te da se njihova ekspresija pojačava za vrijeme staničnog stresa (Krysan i sur., 2005). Pokazano je kako *in vitro* procesiraju različite humane prohormone, primjerice proinzulin, pro-opiomelanokortin (POMC) i adrenokortikotropni hormon (ACTH) (Cawley i sur., 1996), a neki od pronađenih prirodnih supstrata yapsina su Scw4 (Grbavac i sur., 2017) i Msb2 (Vadaie i sur., 2008). Cilj ovog rada bio je predvidjeti karakteristične regije, potencijalna mjesta posttranslacijskih modifikacija i trodimenzionalne strukture yapsina, te usporediti dobivene rezultate za vrlo slabo istražene Yps6 i Yps7 s rezultatima i dosadašnjim saznanjima za Yps1-3 koji su detaljnije okarakterizirani *in vivo* i *in vitro*.

4.1. Predviđanje aktivnih mjesta, karakterističnih regija i mjesta posttranslacijskih preinaka yapsina kvasca *S. cerevisiae*

4.1.1. Predviđanje aktivnih mjesta

Yapsini pripadaju porodici aspartatnih proteaza u kojima dva aspartatna ostatka u aktivnom mjestu enzima aktiviraju molekulu vode, omogućujući joj nukleofilni napad na peptidnu vezu (Slika **3A**). Evolucijski očuvano aktivno mjesto aspartatnih proteaza čine dva aspartatna ostatka koji se tipično pojavljuju u motivu Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb, u kojemu je Xaa hidrofobni aminokiselinski ostatak, a Xbb serinski (S) ili treoninski ostatak (T) (N.D.Rawlings i sur, 2012). Na slici **3B** grafički je prikazano sravnjivanje takvog motiva koristeći bazu Prosite u cijeloj porodici aspartatnih proteaza (accession number PS00141 ASP_PROTEASE), na kojemu visina slova daje informaciju o stupnju očuvanosti prikazanih aminokiselinskih ostataka na određenom položaju u regiji. Samo jedno slovo na određenom položaju upućuje na to da se u svim sravnjenim sekvencama na tom mjestu uvijek nalazi

identični aminokiselinski ostatak, npr. u ovom slučaju aspartatni ostatak bitan za katalizu. Kada se dva ili više različitih aminokiselinskih ostataka mogu naći na istom položaju, učestalost njihovog pojavljivanja prikazana je visinom slova.



Slika 3. Katalitičko mjesto aspartatnih proteaza **A** Katalitički mehanizam cijepanja supstrata karakterističan za aspartatne proteaze (Wikipedia, Slobodna enciklopedija. [//bs.wikipedia.org/w/index.php?title=Aspartil_proteaza&oldid=3153088](https://bs.wikipedia.org/w/index.php?title=Aspartil_proteaza&oldid=3153088). Pristupljeno 15. lipnja 2020.) **B** Grafički prikaz motiva aktivnog mjesta aspartatnih proteaza (Prositate accession number PS00141)

Proteolitička aktivnost na monobazičnim i dibazičnim mjestima različitih supstrata pokazana je *in vivo* i *in vitro* za Yps1-3 (Cawley i sur., 1996; Komano i sur., 1999; Olsen i sur., 1999). Uspoređujući s motivom aktivnog mjesta aspartatnih proteaza, aktivna mjesta ovih yapsina u potpunosti odgovaraju uzorku Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb (Tablica 2). U proteinu Yps6 drugi aspartatni ostatak se također nalazi u takvom okruženju, dok se kod prvog umjesto prvog hidrofobnog aminokiselinskog ostatka pojavljuje polarni glutaminski ostatak. Protein Yps7 u prvom motivu aktivnog mjesta pokazuje znatnije odstupanje od očuvanog motiva katalitičkog mjesta aspartatnih proteaza jer nakon katalitičkog aspartatnog ostatka, umjesto spomenutih -Xbb-Gly-Xbb, slijede dva izoleucinska te glutaminski ostatak, dok u drugom motivu pokazuje visoku sličnost očuvanom motivu, osim što umjesto visoko očuvanog glicinskog ostatka sadrži treoninski. To navodi na zaključak da se katalitički mehanizam kojeg provode Yps6 i Yps7 potencijalno razlikuje od mehanizma proteolize koju provode drugi yapsini. U proteinu Yps5 postoji samo jedan motiv koji sadrži potencijalni katalitički aspartatni ostatak, a identičan je prvom motivu aktivnog mjesta u proteinu Yps6. Zbog toga što Yps5 sadrži samo jedan motiv aktivnog mjesta, pretpostavlja se da je gen *YPS5* pseudogen, odnosno da protein Yps5 nije aktivan (Olsen i sur., 1999).

Tablica 2. Motivi aktivnog mjesta u yapsinima. Očuvani aspartatni (D) ostatci bitni za katalizu označeni su masnim slovom.

Protein	1. motiv aktivnog mjesta		2. motiv aktivnog mjesta	
	Sekvenca	Položaj	Sekvenca	Položaj
Yps1	LVD D TGS	99-104	LL D SGT	369-374
Yps2	LVD D TGS	97-102	LL D SGT	358-363
Yps3	LL D TGS	79-84	LL D SGT	286-291
Yps5	QL D TGS	83-88	/	/
Yps6	QL D TGS	83-88	ML D SGT	322-327
Yps7	LVD I IQ	72-77	LL D STS	319-324

4.1.2. Predviđanje signalnog peptida

Obzirom da yapsini pripadaju proteinima sekretornog puta, koji se za vrijeme sinteze translociraju u lumen endoplazmatskog retikuluma (Gagnon-Arsenault i sur., 2006), na N-terminalnom kraju sadrže sekvencu koja kodira za signalni peptid. Signalni peptid nema striktni motiv, ali ono što je zajedničko signalnim sekvencama različitih proteina jest jedan ili više pozitivno nabijenih aminokiselinskih ostataka nakon kojih slijedi 6-12 hidrofobnih ostataka koji su esencijalni za translokaciju (Lodish i sur., 2012). Proteini sekretornog puta, odnosno zreli yapsini, neće sadržavati signalni peptid jer se odcijepi signalnom peptidazom tijekom translokacije. Korištenjem servera SignalP 5.0 u yapsinima je predviđena sekvenca signalnog peptida koji sudjeluje u translokaciji, odnosno mjesto cijepanja sa signalnom peptidazom.

Sama lokalizacija yapsina u staničnoj membrani ili stijenci te glikoziliranje upućuju na to da yapsini sadrže signalni peptid. Server u svim yapsinima pronalazi najvjerojatniji signalni peptid (Tablica 3). U proteinu Yps1 predviđeno mjesto cijepanja je između glicinskog i lizinskog ostatka na 21. i 22. mjestu sekvence proteina, što je u skladu s literaturnim podacima (Ash i sur., 1995). Signalni peptid u proteinu Yps2 odcjepljuje se nakon alaninskog ostatka na 22. mjestu (Komano & Fuller, 1995), što potvrđuje i server. Rezultati dobiveni analizom proteinske sekvence Yps6 i Yps7 prikazani su grafički na slici 4. U Yps6 predviđeno mjesto cijepanja je između 21. i 22. aminokiselinskog ostatka (VLG-SS) (Slika 4A), te je identično onome identificiranom za Yps5, a u Yps7 između 22. i 23. (ATA-ST) (Slika 4B).

sekvence (narančasta linija, other), odnosno da predstavlja položaj cijepanja signalnom peptidazom (zelena linija, CS = cut site).

4.1.3. Predviđanje mjesta N-glikozilacije

Glikozilacija je jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija proteina. N-glikozilacija podrazumijeva vezanje ugljikohidratnih lanaca na protein preko amidne grupe asparaginskog ostatka. Karakteristična je za proteine stanične membrane i stijenke te ima ulogu u konačnoj konformaciji i aktivnosti proteina u eukariota. NetNglyc server predviđa mjesta N-glikozilacije u humanim proteinima, a možemo ga primijeniti na yapsinima kvasca jer je motiv glikozilacije, Asn-Xaa-Ser/Thr (pri čemu Xaa u pravilu predstavlja bilo koji aminokiselinski ostatak osim prolinskog), isti u humanim stanicama i u stanicama kvasca.

Server NetNGlyc 1.0 je za Yps1-3 predvidio 10, 9 i 11 potencijalnih mjesta glikozilacije. Eksperimentalno je potvrđeno da su proteini Yps1-3 glikozilirani (Cawley i sur., 1995; Komano & Fuller, 1995; Olsen i sur., 1999), ali nisu provedena istraživanja koja bi potvrdila koja točno od potencijalnih mjesta su N-glikozilirana, već je visok stupanj N-glikozilacije pokazan kao veliki pomak u elektroforetskoj mobilnosti proteina prilikom tretmana endoglikozidazom H koja odcjepljuje N-vezane oligomanozne i hibridne šećerne lance. Primjerice, tretiranje Yps1 s endoglikozidazom H rezultira smanjenjem prividne molarne mase zrelog Yps1 za 70 kDa (Cawley i sur., 1995), a u slučaju Yps3 za preko 70 kDa (Olsen i sur., 1999), što upućuje na visok stupanj glikozilacije. Za protein Yps6 server je predvidio 13 potencijalnih mjesta N-glikozilacije (Slika **5A**), među kojima je i jedno mjesto gdje se nakon asparagina pojavljuje prolin. Ovo mjesto nije uzeto u obzir jer je u ovakvom motivu vrlo mala mogućnost glikozilacije zbog konformacije prolinskog ostatka. U proteinu Yps7 postoji 15 potencijalnih mjesta glikozilacije (Slika **5B**).

Tablica 4. Broj potencijalnih mjesta N-glikozilacije u yapsinima predviđenim serverom NetNGlyc 1.0.

Protein	Broj potencijalnih mjesta N-glikozilacije
Yps1	10
Yps2	9
Yps3	11
Yps5	1
Yps6	12 (13)
Yps7	15

A

		Position
Name: Yps6 Length: 537		
MQLISILSLLSSLMCSLTVLGGSSASSYVKFPVQKLADIINICTQDVSTVFKRNEVLN	80	57 NTTV
YLDQDTGSSDMIVNADIAYCKSMSDSDYASTDNYELTATFNGLPSTTISSEAYNTLCSYWGTFDAS	160	149 NSST
NNTYGDGTYAGTYGTDVVSFENITLNDFTFGVSN	240	156 NATF
QGKINKIAYSFLNGPDAHFGSILFGAVDKSKYTGQLYTLPLMQAFNTLGSNPGMIITAQSVAILDSESG	320	161 NNTY
VMLDSGTTFSYLPTEIAEAIGKSFDEYSSDDQGYIFDCSKVND	400	183 NITL
TYMLGDAFLVDAYVVYDLNENYISIAQASFNQEEIEVSDTVP	480	195 NDTI
FSQYKSLATAAQSDASSFSSSGGSSSESTTKKQ		200 NPSG
		225 NRTP
		311 NKTV
		363 NDTL
		375 NISA
		379 NISN
		472 NVSH

B

		Position
Name: Yps7 Length: 596		
MTCLILWYLLISTFQLEFATASTANTTTAKSGTSSSTEPPFVLA	80	26 NTTT
NLVSGTSESHNEYSYGVYHKHPSYLMNDSTSSVPVSPGQIYEIS	160	59 NSTP
RDNVQFNSGSLISNVSFFDIQSSNFKTSGLLGLSGKVTNPGNAID	240	106 NDST
DSTSSVSYLPTSTIIQIAVQIAATYVESLDRWLQCSIADMGVSLG	320	131 NCTL
EACFLTLYANTNTGYNILGEAFIKNIYMAMDLEDNTIAIAQAKK	400	140 NPTN
NTRNLTLYPSYRSGYMFVPGQLTAAYSNGVITGAGRSFYDTSRA	480	143 NVSS
GVRLLSSPYTFNKDPAGHVTRIASLLLLSIFSI	560	148 NSST
		175 NVSF
		308 NNTS
		391 NSSH
		455 NETT
		478 NSSN
		484 NLTL
		549 NSTN
		552 NRTS

Slika 5. Potencijalna mjesta N-glikozilacije predviđena uz pomoć NetNGlyc - 1.0 servera za proteine **A** Yps6 i **B** Yps7.

4.4.4. Predviđanje mjesta vezanja GPI sidra

Vrlo važno svojstvo yapsina jest modifikacija njihovog C-terminusa vezanjem GPI (glikozilfosfatidilinozitol) sidra, koje utječe na konačnu lokalizaciju proteina u staničnoj stijenci ili membrani, te je ujedno i jedan od kriterija na temelju kojih se proteini svrstavaju u obitelj

yapsina (Gagnon-Arsenault i sur., 2006). Dio GPI-modificiranih proteina translocira se reakcijom transglikolizacije sa plazmine membrane na β -1,6-glukan stanične stijenke (Groot i sur., 2005). Da bi se na protein vezalo GPI sidro, na C-terminalnom dijelu proteina treba postojati određeni motiv koji se sastoji od signalnog aminokiselinskog ostatka (omega-mjesto, ω), na kojeg će se sidro biti vezano, nakon kojeg slijede dva mala aminokiselinska ostatka, polarna regija te hidrofobna regija koju čini više od 11 aminokiselinskih ostataka (Caro, 1997). Korištenjem alata big-PI Fungal predictor na temelju tog motiva predviđena su ω -mjesto, odnosno potencijalna mjesta vezanja GPI sidra na yapsine.

Uspoređujući regiju na C-terminusu Yps1-3 dobivenu vlastitom analizom (Tablica 5) i literaturne podatke (Olsen i sur., 1999), koji su također dobiveni analiziranjem sekvenci yapsina, možemo potvrditi podudaranje.

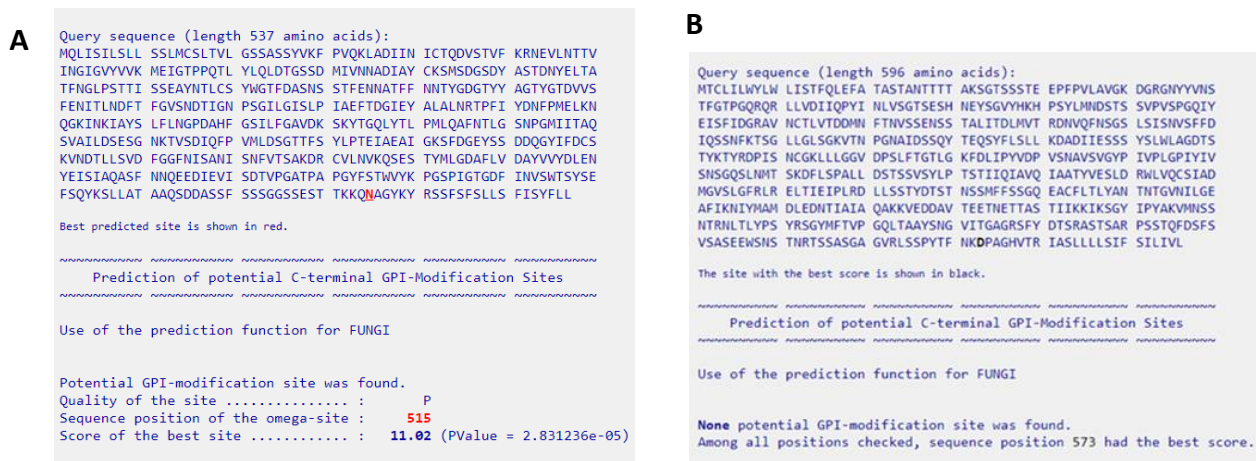
Tablica 5. mjesta GPI modifikacije u yapsinima predviđena uz pomoć alata big-PI Fungal predictor i postojanje dibazičnog mjesta u blizini ω -mjesta.

Protein	Položaj ω - mjesta	Sekvenca nakon omega-mjesta	Postojanje dibazičnog mjesta u blizini ω -mjesta
Yps1	548 N	VGDHIVPSLPLTLISLLFAFI	Da
Yps2	575 N	GGHNLNPPFFARFITAIFHHI	Da
Yps3	483 N	SASSIRSTLGLLLVPSSLILSVFFS	Da
Yps5	/	/	Ne
Yps6	515 N	AGYKY RSSFSFLLSFISYFLL	Da
Yps7	573 D	PAGHVTRIASLLLLSIFSILIVL	Ne

Postojanje GPI sidra u Yps1 eksperimentalno je potvrđeno označavanjem s radioaktivnim prekursorom GPI sidra (Ash i sur., 1995), a u Yps2 inkubacijom membranske frakcije s bakterijskim PI-PLC, fosfoinozid fosfolipazom C, pri čemu dolazi do disocijacije GPI-modificiranih proteina (Komano & Fuller, 1995). Alat predviđa vezanje GPI sidra i na Yps6 (Slika 6A), a na proteine Yps5 i Yps7 ne (Slika 6B, Tablica 5). Budući da je Yps5 kodiran mutiranim genom, nije očekivano postojanje ovakvog mjesta budući da je njegova sekvenca homologna samo N-terminalnom dijelu sekvence proteina Yps6. Iako alat nije potvrdio visoku šansu postojanja mjesta za vezanje GPI sidra u proteinu Yps7, dao nam je informaciju koje je

mjesto vrlo slično tome, odnosno koje je najvjerojatnije mjesto modifikacije ukoliko dolazi do nje (Slika **6B**).

Obzirom da su yapsini GPI-vezani proteini, njihova moguća lokalizacija je u plazmatskoj membrani ili staničnoj stijenci. Pretpostavlja se da dibazično mjesto u blizini ω -mjestu upućuje na lokalizaciju u membranu, a u protivnom u staničnu stijenu (Caro, 1997). Promatrajući proteinske sekvence možemo primijetiti da jedino Yps7 nema dibazično mjesto u blizini ω mjestu (Tablica **5**), odnosno da je sukladno tome njegova krajnja lokalizacija najvjerojatnije u staničnoj stijenci.



Slika 6. Rezultat analize položaja GPI modifikacije za proteine **A** Yps6 i **B** Yps7 dobiven uz pomoć alata big-PI Fungal predictor.

4.4.5. Predviđanje monobazičnih i dibazičnih mjesta procesiranja

Dosadašnja istraživanja o yapsinima ukazuju na to da se sintetiziraju u zimogenom obliku te da se njihova aktivacija odvija u dva proteolitička koraka (Gagnon-Arsenault i sur., 2006). Prvi korak procesiranja predstavlja odcjepljivanje signalnog peptida u endoplazmatskom retikulumu, a drugi cijepanje propeptida na N-terminusu nizvodno od signalnog peptida. Odcjepljivanje propeptida se događa uz pomoć endopeptidaze Kex2 ili autokatalitički, odnosno aktivnošću samih yapsina. Kex2 cijepa proteine nakon dibazičnog mjesta, dok su yapsini manje specifični te cijepaju iza dibazičnih i monobazičnih mjesta. N-terminalnim sekvenciranjem zrelih Yps1 i Yps3 pokazano je da su oba yapsina procesirana nakon dibazičnog mjesta ($K^{66}R^{67}$ u Yps1 i $K^{46}R^{47}$ u Yps3) (Gagnon-Arsenault i sur., 2006), a za Yps1 je dodatno pokazano da se ovaj korak može odvijati autokatalitički (Cawley i sur., 1998). Analizom proteinskih sekvenci možemo uočiti da u Yps2 i Yps6 također postoje dibazična mjesta na sličnim pozicijama ($K^{43}K^{44}$ i $K^{66}R^{67}$) koja se vrlo vjerojatno procesiraju na isti način, ali N-terminalno sekvenciranje zrelih Yps2 i Yps6 za sada još nije provedeno. U Yps7 nema

dibazičnog mjesta prije prvog katalitičkog aspartatnog ostatka (Tablica 6), ali ima 5 monobazičnih, što upućuje na to da se cijepanje potencijalnog propeptida može provesti isključivo djelovanjem yapsina, a ne proteaze Kex2. Intramolekulsko procesiranje unutar "insertion loopa", koje rezultira generiranjem proteina s dvije polutke spojene disulfidnim mostovima, eksperimentalno je dokazano za Yps1 (Cawley i sur., 1998).

Tablica 6. Broj monobazičnih i dibazičnih mjesta u yapsinima te postojanje dibazičnog mjesta na N-terminusu

Protein	Broj monobazičnih mjesta	Broj dibazičnih mjesta	Postojanje dibazičnog mjesta na N-terminusu
Yps1	11	5	Da
Yps2	25	3	Da
Yps3	27	6	Da
Yps5	5	1	Da
Yps6	16	2	Da
Yps7	31	2	Ne

4.4.6. Predviđanje disulfidnih mostova

Disulfidni mostovi nastaju između dva cisteinska aminokiselinska ostatka oksidacijom sulfhidrilnih skupina. Važni su jer sudjeluju u stabilizaciji tercijarne i kvarterne strukture proteina. U aspartatnim proteazama, poput pepsina A, tipično se nalaze 3 para cisteinskih ostataka koji tvore 3 disulfidne veze, dok su u većini kvašćevih aspartatnih proteaza, uključujući i yapsine, prisutni samo prvi i treći disulfidni par (Rawlings & Barrett, 2004). Analizom proteinskih sekvenci yapsina utvrđeno je da svi yapsini, osim Yps5, imaju 4 cisteinska ostatka koji mogu tvoriti dvije disulfidne veze (Tablica 7).

Tablica 7. Položaji cisteinskih ostataka u yapsinima.

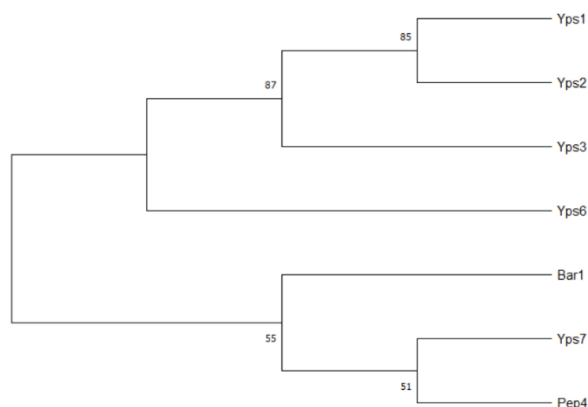
Protein	Položaji cisteinskih ostataka			
	1.	2.	3.	4.
Yps1	117	186	406	438
Yps2	115	173	395	432
Yps3	97	103	323	369
Yps5	15	101	/	/
Yps6	101	139	359	391
Yps7	132	253	356	403

4.4.7. Svrnjivanje proteinskih sekvenca yapsina i filogenetsko stablo

Poravnanje (engl. "alignment") sekvenci je metoda koja se koristi u bioinformatički prilikom istraživanja funkcionalno ili strukturno srodnih gena ili proteina, a uključuje poravnanje sekvenci DNA, RNA ili proteina u svrhu identificiranja sličnih regija. Program korišten za generiranje poravnanja proteinskih sekvenca Yps1-3 i Yps6-7 je MUSCLE. Obilježavanjem spomenutih karakterističnih regija u svrnutim sekvencama različitim bojama (Slika 7) potvrđujemo postojanje očuvanih regija u yapsinima. Na N-terminusu svih yapsina nalazi se signalni peptid, nakon čega slijedi propeptid te dibazično ili monobazično mjesto procesiranja. Katalitičko mjesto također je strogo očuvano, kao i cisteini te mjesta vezanja GPI sidra na C-terminusima yapsina. Sva mjesta N-glikozilacije nisu strogo očuvana, već postoji samo jedno mjesto očuvano u svim yapsinima i 4 mjesta koja su zajednička Yps1-3 i Yps6.

glikozilacije zelenom bojom. Asteriskom su označene pozicije s potpuno očuvanom aminokiselinskom skupinom, dvotočkom pozicije s grupama velike sličnosti, a točkom grupe koje ne pokazuju veliku sličnost

Na slici **8** prikazano je filogenetsko stablo napravljeno u programu MEGA X koristeći maximum parsimony metodu koja je prikladna za analizu malog broja sličnih sekvenci, a daje uvid u evolucijsku udaljenost među yapsinima i dvije aspartatne proteaze Pep4 i Bar1. Jednu veliku granu stabla čine Yps1-3 i Yps6, a drugu Yps7 s Pep4 i Bar1. Prva se grana dalje dijeli na granu koju čine Yps1 i Yps2, međusobno evolucijski najbliži yapsini budući da su geni *YPS1* i *YPS2* paralozi, i Yps3 te na drugu koju čini Yps6. Druga velika grana je sastavljena od Yps7 i Pep4 koji čine jednu i Bar1 koji čini drugu granu. Uzimajući u obzir da je rezultat pouzdan ako je $BS > 70/80$, možemo sa sigurnošću tvrditi samo da Yps1-3 formiraju zasebnu granu pri čemu su Yps1 i Yps2 najbliži, a Yps6 i Yps7 su odvojeni od njih.



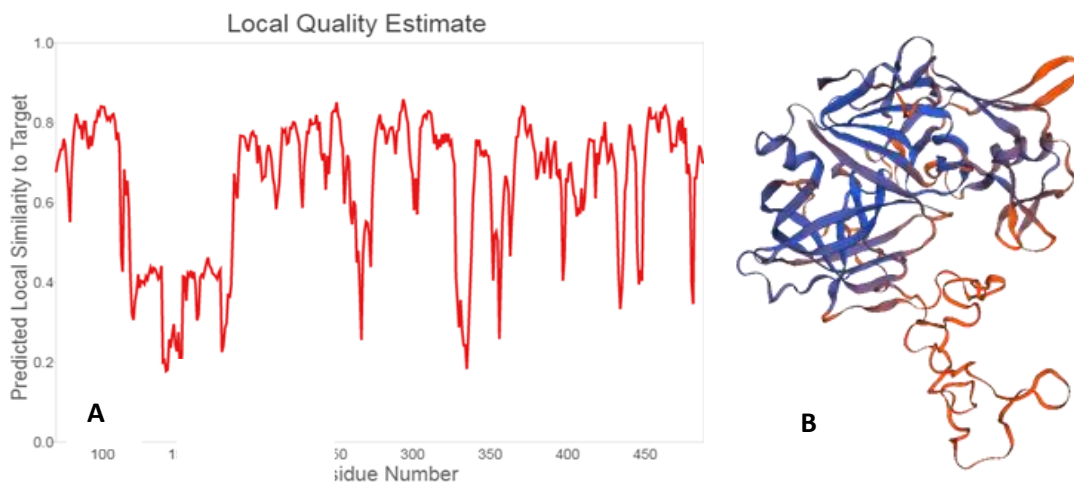
Slika 8. Filogenetsko stablo aspartatnih proteaza kvasca *S. cerevisiae* dobiveno korištenjem programa MEGA, s pripadajućim BS (Bootstrap) brojevima.

4.2 Homologno modeliranje strukture yapsina kvasca *S. cerevisiae*

4.2.1. Homologno modeliranje strukture yapsina Yps1-3

Homologno modeliranje proteina je metoda predviđanja tercijarne strukture proteina na temelju primarne strukture, obzirom na protein koji ima sličan slijed aminokiselina, a čija je tercijarna struktura eksperimentalno određena. Koristeći server SWISS-MODEL odabran je najbolji predložak (engl. "template") za homologno modeliranje, koji je u slučaju Yps1-3 bila aspartatna proteaza 1 (Sapp1) iz *Candida parapsilosis* u kompleksu s pepstatinom A (PDB ID 3fv3).

Na slici **9** prikazana je kvaliteta homolognog modeliranja strukture Yps1 uz korištenje odabranog predloška. Slika **9A** prikazuje lokalnu kvalitetu modela kroz aminokiselinsku sekvencu, pri čemu vrijednost niža od 0,6 predstavlja slabiju kvalitetu. Uspoređujući s prethodno opisanim karakterističnim regijama u yapsinima, možemo zaključiti da se najveće neslaganje s predloškom podudara s tzv. "insertion loopom" u Yps1. Isto je vidljivo i na slici **9B**, na kojoj su crvenom bojom označeni aminokiselinski ostaci loše lokalne kvalitete.

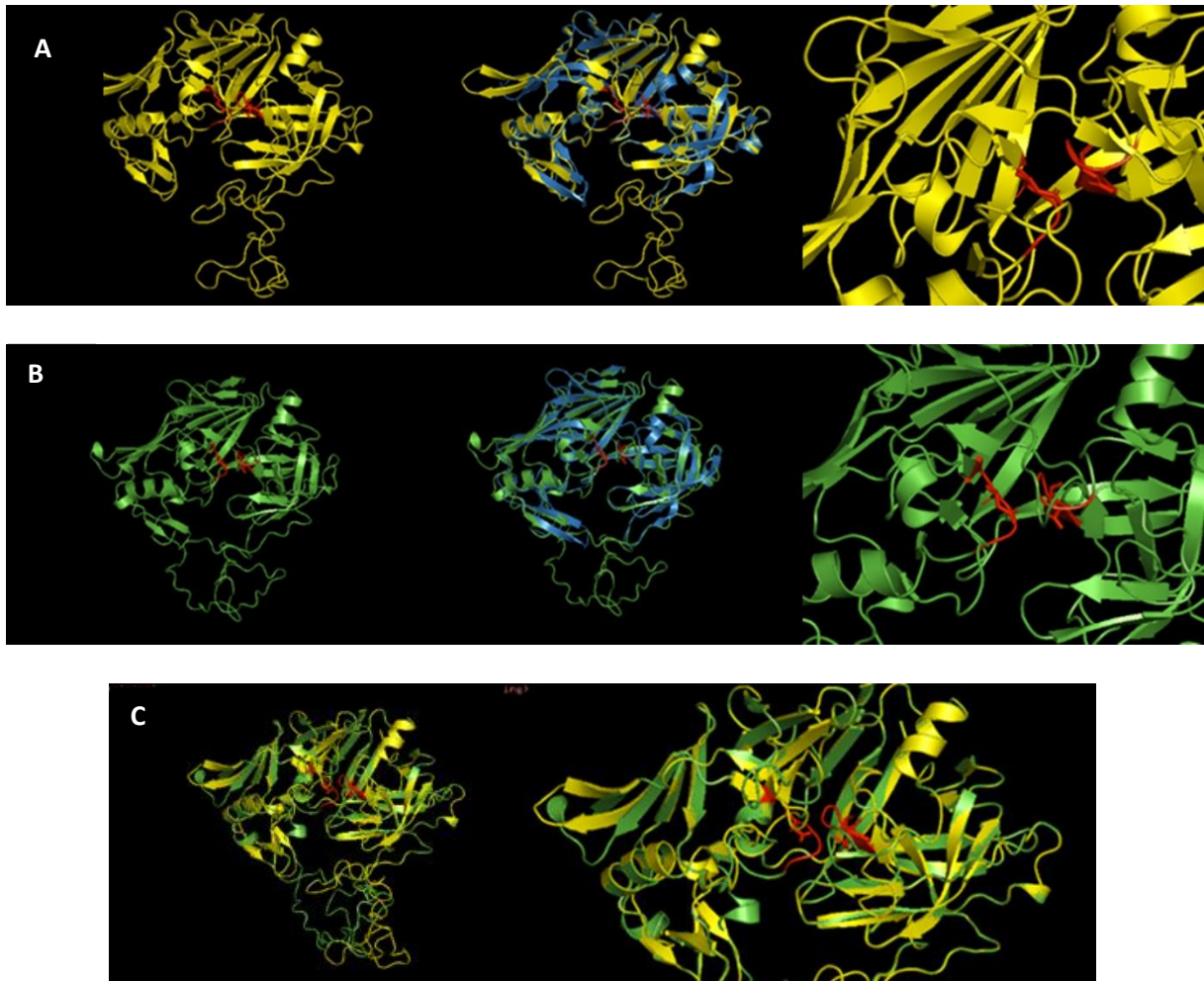


Slika 9. Rezultati dobiveni korištenjem servera SWISS-MODEL za Yps1. **A** Procjena kvalitete modela na razini pojedinog aminokiselinskog ostatka odnosno na lokalnoj razini **B** 3D model Yps1 konstruiran na temelju strukture 3fv3, pri čemu su crvenom bojom označena mjesta u proteinu koja nisu u skladu s predloškom.

Pymol je program koji se koristi za vizualizaciju molekula, među kojima su i biološke makromolekule poput proteina. Prethodno su uz pomoć servera SWISS-MODEL dobiveni 3D modeli proteina Yps1-3, koji su učitani u program Pymol (Slika **10**). Strukturno gledano, aspartatne proteaze su enzimi koji u svojoj građi imaju dvije polutke ("bilobalni" enzimi), od kojih svaka sadrži po jedan katalitički aspartatni ostatak, koji su orijentirani jedan prema drugome (Gagnon-Arsenault i sur., 2006), što je vidljivo na dobivenim 3D strukturama. Na 3D modelu nisu prikazane regije za koje je poznato da se posttranslacijski odcjepljuju, odnosno signalni peptid, propeptid i sekvenca koja se odcjepljuje nakon vezanja GPI sidra.

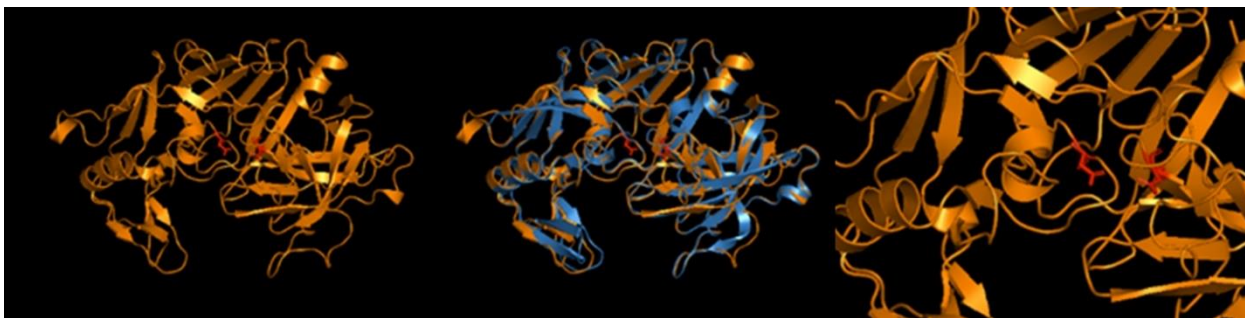
Na slikama **10A** i **10B** modeli Yps1 i Yps2 preklapljeni su s predloškom 3fv3 te je jasno vidljivo da regija koja najviše odskoče od modela aspartatne proteaze u oba yapsina je upravo "insertion loop" za kojeg se smatra da se proteolitički procesira (Gagnon-Arsenault i sur., 2006). Na slikama **10A** i **10B** također je vidljiva bilobalna struktura, gdje svakoj polutci pripada po jedan aspartatni ostatak koji je orijentiran prema drugome na način da zajedno čine

funkcionalno katalitičko mjesto u samom središtu proteina. Sličnost između Yps1 i Yps2 potvrđena je preklapanjem njihovih 3D modela što je prikazano na slici **10C**.



Slika 10. Trodimenzionalna struktura Yps1 i Yps2 vizualizirana u programu Pymol **A** model Yps1 (žuto), preklapljen s predloškom 3fv3 (plavo) i uvećano katalitičko mjesto **B** model Yps2 (zeleno), preklapljen s predloškom 3fv3 (plavo) i uvećano katalitičko mjesto **C** Preklapljeni modeli Yps1 (žuto) i Yps2 (zeleno). Katalitički aspartatni ostatci označeni su crvenom bojom.

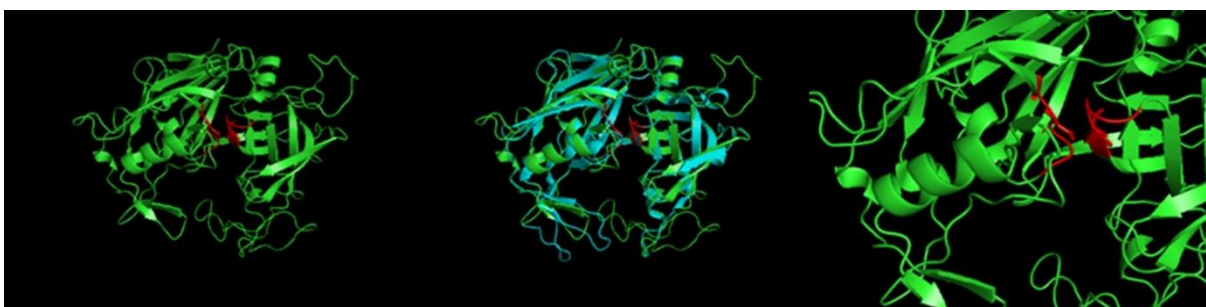
Zbog nepostojanja "insertion loopa", model Yps3 se razlikuje od Yps1 i Yps2. Yapsini koji nemaju "insertion loop" i/ili dibazično mjesto procesiranja vrlo vjerojatno ostaju u formi jednog polipeptidnog lanca (Gagnon-Arsenault i sur., 2006). Bez obzira na nedostatak spomenute regije, 3D model Yps3 (Slika **11**) ima karakterističnu strukturu aspartatne proteaze jer dobiveni model također omogućuje razlikovanje dvije polutke proteina od čega svaki ima po jedan katalitički aspartatni ostatak.



Slika 11. Model Yps3 (narančasto) preklopljen s predloškom 3fv3 (plavo) i uvećano katalitičko mjesto. Katalitički aspartatni ostatci označeni su crvenom bojom.

4.2.2. Homologno modeliranje strukture Yps6-7

Predložak koji pokazuje najveću sličnost s Yps6 i daje model najbolje kvalitete jest aspartatna proteaza 3 (Sap) iz *Candida albicans* (PDB ID 2h6s). Na slici **12** vidljivo je da osim "insertion loopa" postoje još neke manje regije koje odskoče od modela predloška. Uspoređujući s primarnom strukturom Yps6 može se zaključiti da ta mjesta pripadaju manje očuvanim regijama yapsina. Katalitičko mjesto i „bilobalna“ struktura odgovaraju modelima drugih yapsina (Slika **12**).



Slika 12. Model Yps6 (zeleno), preklopljen s predloškom 2h6s (plavo) i uvećano katalitičko mjesto. Katalitički aspartatni ostatci označeni su crvenom bojom.

Za Yps7 kao predložak je uzeta aspartatna proteaza 1 (Sap) iz *Candida albicans* (PDB ID 2qzw), koja daje najkvalitetniji model. Vrlo slično kao i u prehodnim modelima yapsina, od predloška najviše odskoče "insertion loop", a katalitičko mjesto se nalazi između dvije polutke (Slika **13**).



Slika 13. Model Yps7 (žuto), preklapljen s predloškom 2qZw (ljubičasto) i uvećano katalitičko mjesto. Katalitički aspartatni ostatci označeni su crvenom bojom.

Na temelju filogenetske analize (Slika **8**) možemo zaključiti kako Yps1-3 formiraju jednu granu, a Yps6 i Yps7 su odvojeni od njih. U prilog ovoj pretpostavci idu i rezultati predviđanja aktivnih mjesta i homolognog modeliranja trodimenzionalne strukture. Aktivno mjesto u potpunosti je očuvano u Yps1-3, dok u Yps6-7 postoje odstupanja od motiva aktivnog mjesta aspartatnih proteaza. Prilikom homolognog modeliranja, kao predložak za Yps1-3 korištena je aspartatna proteaza 1 iz kvasca *Candida parapsilosis*, a za Yps6-7 aspartatna proteaza 3, odnosno 1, iz kvasca *Candida albicans*. Usprkos tome, kao rezultat modeliranja strukture svih yapsina dobiven je protein bilobalne strukture u kojem je katalitičko mjesto, sastavljeno od dva aspartatna ostatka, pozicionirano u sredini proteina gdje su aspartatni ostaci orijentirani jedan prema drugome. Također, u svim strukturama yapsina, osim Yps3, vidljiv je "insertion loop" koji se izdvaja kao nestrukturirana regija. Obzirom na rezultate, svi yapsini se vjerojatno modificiraju na oba kraja. Na N-terminalnom dijelu dolazi do cijepanja signalnog peptida koji ih upućuje u sekretorni put, dok na C-terminalnom dolazi do GPI-modifikacije odgovorne za lokalizaciju u staničnu membranu ili stijenku. Ipak, Yps7 pokazuje značajna odstupanja od drugih yapsina. Primjerice, Yps7 jedini je koji nema dibazično mjesto u blizini ω mjesta (Tablica **5**). Umjesto njega ima monobazično koje, za razliku od dibazičnog koje upućuje na lokalizaciju u membranu, vjerojatno upućuje na lokalizaciju u staničnu stijenku. Točnost tog podatka mogla bi biti od velike važnosti jer je u tom slučaju Yps7 izložen drugačijoj okolini i supstratima te bi moglo ukazivati na ulogu ovog proteina značajno različitu od ostalih yapsina. Nadalje, na N-terminalnom dijelu Yps7 nema dibazičnog mjesta, što znači da se eventualno procesiranje propeptida ne može odvijati peptidazom Kex2, već samim yapsinima. Također, na slici **8** vidljivo je kako je Yps7 evolucijski bliži aspartatnim proteazama Pep4 i Bar1 nego li ostalim yapsinima.

Činjenica da delecijom svih pet gena koji kodiraju za yapsine (*5ypsA*) pri 37°C dolazi do defekta rasta i građe stanične stijenke potvrđuje kako su yapsini od iznimne važnosti za održavanje homeostaze stanične stijenke te da yapsini u tom procesu imaju mnoge

preklapajuće uloge. Ortoloji yapsina u kvascima *Candida* jedni su od čimbenika patogenosti tog roda, što znači da bi otkrića vezana za yapsine pridonijela i u istraživanju liječenja bolesti uzrokovanih *Candidom*. Zanimljivo je da, osim u fungalnim stanicama, yapsini imaju potencijalne ortologe u humanim stanicama, npr. α -stanicama gušterače (Niamh X. Cawley i sur., 2011), što upućuje na mogućnost da aspartatne proteaze slične yapsinima potencijalno imaju specifične uloge i u endokrinim tkivima u procesiranju prohormona.

Bioinformatičke analize imaju bitnu ulogu u istraživanju strukture i funkcije proteina. Korištenim računalnim alatima omogućeno je postavljanje hipoteza samo na temelju proteinske sekvence, koje je kasnije moguće eksperimentalno potvrditi. Ovo istraživanje može olakšati buduća *in vivo* istraživanja Yps6-7 jer su predviđene karakteristične regije i potencijalna mjesta posttranslacijskih preinaka, te je pretpostavljena krajnja lokalizacija Yps6 u staničnoj membrani, a Yps7 u stijenci. Rezultati ovog rada također mogu poslužiti prilikom dodavanja proteinske oznake (engl. "tag"), točnije odabira optimalnog mjesta za dodavanje oznake u yapsinima, koje se provodi s ciljem izolacije i pročišćavanja te olakšane detekcije ovih proteina. Optimalna mjesta u tom kontekstu predstavljala bi slabo očuvane regije koje ne podliježu procesiranju ili modifikaciji te u kojima oznaka ne bi dovela do narušavanja trodimenzionalne strukture

5. ZAKLJUČCI

- 1.** Korištenjem računalnih alata uspješno su predviđene karakteristične regije i potencijalna mjesta posttranslacijskih preinaka yapsina kvasca *S. cerevisiae*. Aminokiselinske sekvence yapsina su sravnjene kako bi se dobio uvid u očuvane regije te je konstruirano filogenetsko stablo aspartatnih proteaza. Trodimenzionalne strukture yapsina predviđene su homolognim modeliranjem.
- 2.** Yps1-3 sadrže u potpunosti očuvano katalitičko mjesto, dok u Yps6 i Yps7 postoje odstupanja od očuvanog motiva katalitičkog mjesta aspartatnih proteaza.
- 3.** U svim yapsinima predviđen je signalni peptid i potencijalno mjesto GPI-modifikacije te svi sadrže velik broj mjesta koja mogu biti N-glikozilirana.
- 4.** Yps1-3 čine jednu granu filogenetskog stabla, a Yps6 i Yps7 su odvojeni od njih.
- 5.** U svim trodimenzionalnim modelima yapsina jasno je vidljiva "bilobalna" struktura te je u svima, osim Yps3, vidljivo postojanje "insertion loopa" kao nestrukturirane regije.
- 6.** Yps7 jedini je koji nema dibazično mjesto na N-terminalnom dijelu i u blizini ω -mjesta te je evolucijski bliži aspartatnim proteazama Pep4 i Bar1 nego ostalim yapsinima.

6. POPIS LITERATURE

- Ash, J., Dominguez, M., Bergeron, J.J.M., Thomas, D.Y., Bourbonnais, Y., (1995) The yeast proprotein convertase encoded by YAP3 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein that localizes to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **270**, 20847–20854.
- Bairwa, G., Rasheed, M., Taigwal, R., Sahoo, R., Kaur, R., (2014) GPI (glycosylphosphatidylinositol)-linked aspartyl proteases regulate vacuole homeostasis in *Candida glabrata*. *Biochem. J.* **458**, 323–334.
- Caro, L.H.P., (1997) In silico Identification of Plasma-Membrane and Cell Wall Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. **1489**, 1477–1489.
- Causton, H.C., Ren, B., Sang Seok Koh, Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Tong Ihn Lee, True, H.L., Lander, E.S., Young, R.A., (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 323–337.
- Cawley, N.X., Olsen, V., Zhang, C.F., Chen, H.C., Tan, M., Loh, Y.P., (1998) Activation and processing of non-anchored yapsin 1 (Ya3p). *J. Biol. Chem.* **273**, 584–591.
- Cawley, N.X., Chen, H.C., Beinfeld, M.C., Loh, Y.P., (1996) Specificity and kinetic studies on the cleavage of various prohormone mono- and paired-basic residue sites by yeast aspartic protease. *J. Biol. Chem.* **271**, 4168–4176.
- Cawley, N.X., Portela-Gomes, G., Lou, H., Loh, Y.P., (2011) Yapsin 1 immunoreactivity in α -cells of human pancreatic islets: Implications for the processing of human proglucagon by mammalian aspartic proteases. *J. Endocrinol.* **210**, 181–187.
- Cawley, N.X., Wong, M., Pu, L.P., Tam, W., Peng Loh, Y., (1995) Secretion of Yeast Aspartic Protease 3 Is Regulated by Its Carboxy-Terminal Tail: Characterization of Secreted YAP3p. *Biochemistry* **34**, 7430–7437.
- Delic, M., Valli, M., Graf, A.B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., Gasser, B., (2013) The secretory pathway: Exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 872–914.
- Duina, A.A., Miller, M.E., Keeney, J.B., (2014) Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* **197**, 33–48.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., ... Souciet, J.L., (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35–44.
- Dutton, L.C., Jenkinson, H.F., Lamont, R.J., Nobbs, A.H., (2016) Role of *Candida albicans* secreted aspartyl protease Sap9 in interkingdom biofilm formation. *Pathog. Dis.* **74**, 1–36.
- Gagnon-Arsenault, I., Tremblay, J., Bourbonnais, Y., (2006) Fungal yapsins and cell wall: A unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. In *FEMS Yeast Research*. pp. 966–978.
- Ganguly, S., Mitchell, A.P., (2011) Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 380–385.
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J.M., Francois, J., Nombela, C., Arroyo, J., (2004) The Global Transcriptional Response to Transient Cell Wall Damage in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Regulation by the Cell Integrity Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 15183–15195.

- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., (1996) Life with 6000 Genes conveniently among the different interna- Old Questions and New Answers The genome . At the beginning of the se- of its more complex relatives in the eukary- cerevisiae has been completely sequenced *Schizosaccharomyces pombe* indicate. *Science (80-.)*. **274**, 546–567.
- 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. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1864**, 507–515.
- Groot, P.W.J. De, Ram, A.F., Klis, F.M., (2005) Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **42**, 657–675.
- Herskowitz, I.R.A., Of, T., (1988) Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **52**, 536–553.
- Komano & Fuller, 1995, (2016) Shared Functions in vivo of a Glycosyl-Phosphatidylinositol-Linked Aspartyl Protease , Mkc7 , and the Proprotein Processing Protease Kex2 in Yeast Author (s): Hiroto Komano and Robert S . Fuller Source : Proceedings of the National Academy of Sciences o. **92**, 10752–10756.
- Komano, H., Rockwell, N., Wang, G.T., Krafft, G.A., Fuller, R.S., (1999) Purification and characterization of the yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored, monobasic-specific aspartyl protease yapsin 2 (Mkc7p). *J. Biol. Chem.* **274**, 24431–24437.
- Krysan, D.J., Ting, E.L., Abeijon, C., Kroos, L., Fuller, R.S., (2005) Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **4**, 1364–1374.
- Kunihiro, S., Kawanishi, Y., Sano, M., Naito, K., Matsuura, Y., Tateno, Y., Gojobori, T., Yamagata, Y., Abe, K., Machida, M., (2002) A polymerase chain reaction-based method for cloning novel members of a gene family using a combination of degenerate and inhibitory primers. *Gene* **289**, 177–184.
- Ladds, G., Davey, J., (2000) Identification of proteases with shared functions to the proprotein processing protease Krp1 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **38**, 839–853.
- Lehle, L., Strahl, S., Tanner, W., (2006) Protein glycosylation, conserved from yeast to man: A model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 6802–6818.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M. P. (2012) *Molecular Cell Biology*, 7.izd., W. H. Freeman and Company. 557-626.
- Monod, M., Hube, B., Hess, D., Sanglard, D., (1998) Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* **144**, 2731–2737.
- N.D.Rawlings, G.S. salvese., (2012) Handbook of Proteolytic Enzymes, VN.D.Rawlings, G. S. salvese. (2012). Handbook of Proteolytic Enzymes, Volume 1 (Google eBook) (p. 4094). <http://books.google.com/books?id=XBuHJLFRjRkC&pgis=1> olume 1 (Google eBook). , 4094.
- 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.,

Olsen, V., Loh, Y.P., (2000) In vivo processing of nonanchored yapsin 1 (Yap3p). *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 315–321.

Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., Tosetto, A., (2016) Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *Int. J. Lab. Hematol.* **38**, 42–49.

Parra-Ortega, B., Cruz-Torres, H., Villa-Tanaca, L., Hernández-Rodríguez, C., (2009) Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 505–512.

Pittet, M., Conzelmann, A., (2007) Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1771**, 405–420.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J., (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* **378**, 705–716.

Suguna, K., Padlan, E.A., Smith, C.W., Carlsson, W.D., Davies, D.R., (1987) Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: Implications for a mechanism of action (x-ray crystallography/rhizopuspepsin/substrate binding/catalysis). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7009–7013.

Tamarin, (1999) Principles of Genetics. 7th ed.,124

Tang, J., Wong, R.N.S., (1987) Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J. Cell. Biochem.* **33**, 53–63.

Vadaie, N., Dionne, H., Akajagbor, D.S., Nickerson, S.R., Krysan, D.J., Cullen, P.J., (2008) Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *J. Cell Biol.* **181**, 1073–1081.

Zimmermann, R., Eyrich, S., Ahmad, M., Helms, V., (2011) Biochimica et Biophysica Acta Protein translocation across the ER membrane ☆. *BBA - Biomembr.* **1808**, 912–924.

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.

P. Gulan

Petra Gulan