

Ispitivanje utjecaja mutacija u ciljenoj regiji gena SCW4 na sposobnost kovalentnog vezanja proteina Scw4 u staničnu stijenku kvasca

Knežević, Tea

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:159:405492>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Prediplomski studij Prehrambene tehnologije

Tea Knežević

7355/PT

**Ispitivanje utjecaja mutacija u ciljanoj regiji gena *SCW4*
na sposobnost kovalentnog vezanja proteina Scw4 u
staničnu stijenku kvasca**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija 2

Mentor: prof.dr.sc. Renata Teparić

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Prediplomski sveučilišni studij Prehrambene tehnologije

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Ispitivanje utjecaja mutacija u ciljenoj regiji gena *SCW4* na sposobnost kovalentnog vezanja proteina Scw4 u staničnu stijenku kvasca

Tea Knežević, 58210294

Sažetak: Scw4 protein jedan je od najzastupljenijih proteina u staničnoj stijenci *Saccharomyces cerevisiae*. U staničnu stijenku veže se kovalentnim i nekovalentnim vezama, no sama priroda te kovalentne veze još uvijek nije poznata. Kako bi se otkrilo koja je regija odgovorna za njegovo kovalentno vezanje, provedeno je istraživanje u kojemu je mutacija uvedena u regiju koja je po svom aminokiselinskom slijedu slična onoj koja se nalazi u Pir proteinima, tzv. V regija. Kvasci su uzgojeni na selektivnim podlogama pri različitim pH vrijednostima, pH 4 i 7. Proteini stanične stijenke su zatim izolirani tretmanom stijenki vrućim SDS-om, odnosno 30 mM NaOH, čime su izolirani nekovalentno vezani odnosno kovalentno vezani proteini. Analiza proteinskih ekstrakata provedena je SDS gel elektroforezom i Western blotom. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je V regija odgovorna za stvaranje kovalentne veze proteina Scw4 sa glukansom stanične stijenke. U daljnjim istraživanjima potrebno je utvrditi preko koje se aminokiseline unutar te regije ostvaruje kovalentna veza.

Ključne riječi: japsinske proteaze, Kex2 proteaza, *Saccharomyces cerevisiae*, Scw4

Rad sadrži: 23 stranica, 6 slika, 3 tablice, 35 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: mag. ing. Mateja Lozančić

Datum obrane: 15.9.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate of Food Technology
Department of Chemistry and biochemistry
Laboratory for Biochemistry
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Investigation of the effect of a mutation in the target region of the *SCW4* gene on the ability to covalently bind the Scw4 protein to the yeast cell wall

Tea Knežević, 58210294

Abstract: Scw4 protein is one of the most abundant proteins detected in the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Within the cell wall proteins can be linked by covalent or noncovalent bound, but the nature of this covalent bond is still unknown. In this research project, in order to discover the region responsible for covalent attachment of Scw4, a mutation was introduced in the so-called V region, that has an amino acid sequence similar to that found in the Pir proteins. As part of the project, yeast was cultivated on a selective medium under different pH conditions, namely pH 4 and 7. During isolation cell walls were treated with hot SDS and 30 mM NaOH. The analysis of isolated cell wall proteins was performed by SDS gel electrophoresis and Western blot analysis. The obtained results showed that the "V region" is responsible for the covalent bonding of Scw4. In the further research exact aminoacid responsible for Scw4 covalent bonding into the cell wall should be detected.

Keywords: Kex2 protease, *Saccharomyces cerevisiae*, Scw4, Yapsins

Thesis contains: 23 pages, 6 figures, 3 tables, 35 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Renata Teparić

Technical support and assistance: mag. ing. Mateja Lozančić

Defence date: 15.9.2020.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. Stanična stijenka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.3. Polisaharidi stanične stijenke.....	2
2.4. Proteini stanične stijenke	3
2.5. Scw4 protein.....	3
2.6. Proteolitički enzimi stanične stijenke kvasca	4
2.6.1. Kex2 proteaza.....	4
2.6.2. Japsinske proteaze	4
3. MATERIJALI I METODE	5
3.1. Materijali	5
3.1.1. Kemikalije	5
3.1.2. Laboratorijski sojevi mikroorganizama.....	6
3.1.3. Plazmidi	6
3.1.4. Hranjive podloge	8
3.2. Metode	9
3.2.1. Izolacija plazmida iz stanica <i>E. coli</i>	9
3.2.2. Određivanje koncentracije DNA.....	9
3.2.3. Restriksijska analiza gotovih plazmida	9
3.2.4. DNA elektroforeza	10
3.2.5. Transformacija kvasca LiAc metodom	10
3.2.6. Uzgoj kvasca uz indukciju GAL promotora	11
3.2.7. Izolacija stijenki i proteina stijenki kvasca <i>S. Cerevisiae</i>	11
3.2.8. SDS tretman stijenki	12
3.2.9. NaOH tretman stijenki.....	12
3.2.10. SDS PAGE elektroforeza	12
3.2.11. Western blot	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Rezultati	14
4.1.1. Restriksijska analiza i gel elektroforeza plazmidne DNA	14
4.1.2. Provjera načina vezanja proteina stanične stijenke kvasca uzgojenog u puferiranim podlogama	15

4.2. Rasprava	17
5. ZAKLJUČAK	20
6. LITERATURA	21

1. Uvod

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* modelni je organizam za istraživanja na eukariotima, no osim u znanosti svoju primjenu pronašao je i u industriji. Još poznat pod nazivom pekarski kvasac danas se koristi u mnogim granama industrije kao što su prehrambena i farmaceutska industrija. Iako je njegov genom u potpunosti sekvencioniran 1996. godine (Goffeau i sur., 1996), sam kvasca do danas nije u potpunosti istražen. Najmanje istraženi ekstracelularni organel je njegova stanična stijenka. Njena uloga je da održava osmotsku stabilnost i samu stanicu štiti od vanjskih mehaničkih oštećenja (Eamus i Jennings, 1986). Građena je od oko 85% polisaharida i 15% proteina (Nguyen i sur., 1998), ali taj postotak isto tako može varirati ovisno o uvjetima i načinu uzgoja kvasca. Polisaharidi tipično čine unutarnji dio stijenke, a najzastupljeniji su β -1,3-glukan, β -1,6-glukan i hitin, koji i služe za održavanje te osmotske stabilnosti. Vanjski dio stijenke čine manoproteini koji određuju njezinu poroznost. Proteine stanične stijenke dijelimo u dvije skupine, kovalentno vezane i nekovalentno vezane proteine. U kovalentno vezane proteine spadaju proteini Pir obitelji i GPI-sidreni proteini, koji se iz stijenke ekstrahiraju različitim glukanzama (Montijn i sur., 1994; Klis, 1994) ili korištenjem slabe lužine (Mrša i sur., 1997). Proteini Pir obitelji se direktno vežu na β -1,3-glukan preko svojih glutaminskih ostataka koje se nalaze unutar specifičnih ponavljajućih sekvenci (Ecker i sur., 2006), dok se GPI-sidreni proteini vežu na β -1,3-glukan preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog sidra (GPI) i β -1,6-glukana (Montijn i sur., 1994; Van der Vaart i sur., 1995; Kapteyn i sur., 1996). Nevalentno vezani proteini se vežu za β -1,3-glukan, te je njihova uloga u većini slučajeva enzimska, a ekstrahiraju se korištenjem vrućeg SDS-a (Valentin i sur., 1984; Cappellaro i sur., 1998). Scw4 protein jedan je od prvih proteina koji je detektiran u SDS ekstraktima, zbog čega se smatralo da se u staničnu stijenkku veže isključivo nekovalentno (Cappellaro i sur., 1998), no danas je poznato kako se osim nekovalentno u stijenkku veže i kovalentnim vezama (Teparić i sur., 2010). Ovaj rad posvećen je istraživanju prirode kovalentne veze koju tvori Scw4 protein, te je li za nju odgovorna jedna od regija sličnih repetitivnim regijama iz Pir proteina. Kako bi smo to provjerili uveli smo mutaciju u jednu od tih regija (tzv. "V regiju") i pomoću Western blot analize proteina ekstrahiranih iz stanične stijenke ispitali ima li uvedena mutacija utjecaja na način vezanja Scw4 proteina u stijenkku.

2. Teorijski dio

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je organizam iz carstva gljiva. Danas služi kao modelni organizam za istraživanja bioloških procesa u eukariotima. Karakteristike koje ga čine povoljnijim modelnim organizmom su to što nije patogen, razmnožava se pupanjem (nespolno) i mejozom (spolno). Ima kratko generacijsko vrijeme, 90 minuta pri temperaturi od 28°C, genetički se lako manipulira te je u potpunosti poznata sekvenca njegovog genoma još od 1996. godine (Goffeau i sur., 1996).

2.2. Stanična stijenka *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je ekstracelularni organel koji omogućava održavanje unutarnjeg osmotskog tlaka, a ujedno štiti stanicu od vanjskih mehaničkih oštećenja (Eamus i Jennings, 1986). Iako ima čvrstu strukturu ujedno je i fleksibilna te podložna promjenama u obliku, kemijskom sastavu i fizičkim svojstvima (Teparić i Mrša, 2013). Tipični sastav stanične stijenke čini oko 85% polisaharida i 15% proteina (Nguyen i sur., 1998), koji može varirati ovisno o uvjetima rasta i razvoja kvasca. Polisaharidi, uglavnom razgranati β -1,3-glukan, kovalentno vezan za β -1,6-glukan i hitin, čine unutarnji dio stijenke. Vanjski sloj stijenke čine manoproteini koji su kovalentno ili ne kovalentno vezani za glukane u stijenci (Hartland i sur., 1994; Osumi, 1998; Osumi, 2012).

2.3. Polisaharidi stanične stijenke

Unutarnji sloj stanične stijenke sastavljen je od polisaharida, u koje spadaju β -1,3- glukan, β -1,6-glukan i hitin (Mrša i sur., 1997). Najzastupljeniji polisaharid je β -1,3-glukan, razgranata molekula sastavljena od oko 1500 glukoznih jedinica koja se svojim nereducirajućim krajem kovalentno povezuje sa reducirajućim krajem hitina i/ili β -1,6-glukana (Kollar i sur., 1995). Kraća, ali razgranatija molekula je β -1,6-glukan, koju čini oko 140 glukozidnih jedinica. Hitin je linearna molekula sastavljena od oko 110 jedinica N-acetilglukozamina, te joj koncentracija ovisi o uvjetima rasta kvasca (Kapteyn i sur., 1997). Tako u uvjetima osmotskog stresa koncentracija hitina može narasti čak i do 20% od ukupne količine polisaharida u stanici (Kapteyn i sur., 1997). Dok je poznato da glukani služe za održavanje osmotske stabilnosti

stanice, manan je vezan na proteine stijenke (manoproteini), čime regulira propusnost stijenke. Za razliku od ostalih polisaharida manan se nalazi na vanjskoj strani stanične stijenke. Manan se za proteine veže tijekom procesa glikozilacije proteina te tako stvara kemijski inertni vanjski štit koji definira poroznost stijenke (Teparić i Mrša, 2013).

2.4. Proteini stanične stijenke

Proteini čine vanjski sloj stanične stijenke kvasca zajedno sa mananom, s kojim tvore manoproteine. S obzirom na njihovo vezanje na stijenku dijelimo ih na kovalentno vezane, Ccw (**C**ovalently linked **c**ell **w**all proteins) i nekovalentno vezane, Scw (**S**oluble **c**ell **w**all proteins) proteine. Poznato je da se kovalentno vezani proteini ekstrahiraju iz stanične stijenke tretmanima različitim glukanzama (Montijn i sur., 1994; Klis, 1994) ili korištenjem slabe lužine (Mrša i sur., 1997), dok se nekovalentno vezani proteini oslobađaju korištenjem vrućeg SDS-a (Valentin i sur., 1984; Cappellaro i sur., 1998). U skupinu kovalentno vezanih proteina ubrajamo tako zvane proteine Pir obitelji (**P**roteins with **i**nternal **r**epeats), koji se direktno vežu na β -1,3-glukan preko svojih glutaminskih ostataka koje se nalaze unutar specifičnih ponavljajućih sekvenci (Ecker i sur., 2006). Fiziološka uloga većine Pir proteina u stanicama još nije poznata s obzirom da nisu esencijalni, no pokazano je da inaktivacija sva četiri proteina ove skupine dovodi do osmotske nestabilnosti i veće osjetljivosti stanice (Mrša i Tanner, 1999). Još jedna skupina proteina koji se kovalentno vežu u staničnu stijenku su GPI-sidreni proteini koji se vežu na β -1,3-glukan preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog sidra (GPI) i β -1,6-glukana (Montijn i sur., 1994; Van der Vaart i sur., 1995; Kapteyn i sur., 1996). Njihova uloga u stanicama isto tako je još uvijek velikim dijelom nepoznata, osim za one GPI proteine koji sudjeluju u procesima flokulacije i aglutinacije (Teparić i Mrša, 2013). Nekovalentno vezani proteini se vežu za β -1,3-glukan, te je njihova uloga je u većini slučajeva enzimska, najčešće su glikozidaze ili/i transglikozidaze, što ovisi o koncentraciji polisaharidnog supstrata (Mrša i sur., 1993; Goldman i sur., 1995).

2.5. Scw4 protein

Scw4 protein, zajedno sa svojim homologom Scw10, jedan je od prvih proteina detektiranih u SDS ekstraktu, zbog čega se smatralo da se u staničnu stijenku vežu isključivo nekovalentno (Cappellaro i sur., 1998). Kasnije je pokazano kako se mogu u stijenku vezati i kovalentno, kada su pronađeni među proteinima stijenke ekstrahiranim pomoću 30mM NaOH (Teparić i

sur., 2010). Scw4 protein nema strukturalne elemente kako bi kovalentnu vezu stvarao preko ostatka GPI sidra, a ujedno nema niti specifične ponavljajuće sekvence kao što je to u proteinima Pir obitelji, te je zbog toga potrebno daljnje istraživanje njegove kovalentne veze, ali i njegove uloge koja nam isto tako nije poznata. Scw4 protein u svojem kodu ima specifične sekvence koje su ciljni motiv za dvije skupine proteolitičkih enzima, Kex2 proteazu te japsinske proteaze (Cappellaro i sur., 1998; Mrša i sur., 1997).

2.6. Proteolitički enzimi stanične stijenke kvasca

2.6.1. Kex2 proteaza

Kex2 proteaza je serinska proteaza koja se nalazi u tras-Golgijevom tijelu. Prepoznaje specifični motiv u proteinima koji su joj supstrati, ali joj aminokiselini sastav okoline tog motiva utječe na učinkovitost cijepanja peptidne veze na C-terminalnoj strani iza dviju bazičnih aminokiselina, najčešće Lys-Arg (Bader i sur., 2008). Osim Scw4 proteina i njegovog homologa Scw10, Kex2 proteaza procesira i druge proteine kao što su Scw11 te sva četiri proteina Pir obitelji, što upućuje na njegovu opću ulogu u formiranju stanične stijenke (Teparić i Mrša, 2013). Najveća koncentracija ovog proteina može se pronaći u stanici (97%), no mali postotak pronađen je i na njenoj površini (Wilcox i Fuller., 1991). Prvotno je njegova uloga bila opisana kao proteaza potrebna za procesiranje feromona α -faktora, killer toksina, zračnih hifa i zimogena sekretornih proteaza i lipaza (Pignede i sur., 2000).

2.6.2. Japsinske proteaze

Japsinske proteaze čine obitelj od pet GPI-sidrenih aspartatnih proteaza smještenih u plazma membrani (Yps1, Yps2, Yps3 i Yps6) te u staničnoj stijenci (Yps7) (Krysan i sur., 2005; Gagnon-Arsenault i sur., 2006). Prepoznaju jednaki aminokiselinski motiv kao i Kex2 proteaza, cijepajući peptidnu vezu na C-terminalnom kraju druge bazične aminokiseline (Olsen i sur., 1998; Komano i sur., 1999) ili iza pojedinačne bazične aminokiseline, Arg (Bourbonnais i sur., 1993; Bourbonnais i sur., 1994). U stanici se sintetiziraju u zimogenim oblicima koji se aktiviraju autokatalitički pri niskom pH ili pomoću Kex2 proteaze pri neutralnom pH (Grbavac i sur., 2017).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Agaroza – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Agar – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- Ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- D (+) galaktoza – Acros Organics (USA)
- D (+) glukoza bezvodna – Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- D (+) rafinoza pentahidrat – Acros Organics (USA)
- DNA Qubit 3,0 kit – Invitrogen, Life Technologies (USA)
- kvašćev ekstrakt – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- histidin, leucin, triptofan, uracil – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- polietilenglikol 4000 (PEG 4000) – Serva (Heidelber, Njemačka)
- restrikcijski enzim: SapI – New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
- standardi za DNA elektroforezu – Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- amonijev persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, Triton X-100, akrilamid, β-merkaptoetanol i Na-dodecilsulfat (SDS) – Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- BioRad Clarity Western otopine za razvijanje blota – Bio-Rad (USA)
- "Nucleo Spin®" Plasmid kit – Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)
- anti-HA peroksidaza antitijela – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Sve ostale kemikalije korištene tijekom eksperimentalnog rada nabavljene su od standardnih dobavljača i analitičke su čistoće.

3.1.2. Laboratorijski sojevi mikroorganizama

a) Bakterijski soj

Genotip korištenog bakterijskog soja *Escherichia coli* (Subcloning Efficiency DH5a Competent Cells, Thermo Fisher Scientific) za umnažanje plazmida:

F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ ⁻

b) Sojevi kvasca

Genotip korištenih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* :

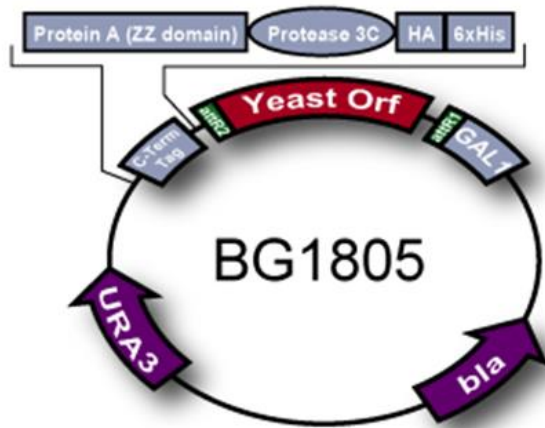
BY4741 wt (Mat a, *his3* Δ , *leu2* Δ , *met15* Δ , *ura3* Δ)

BY4741 *kex2* (Mat a, *his3* Δ , *leu2* Δ , *met15* Δ , *ura3* Δ , *kex2::kanMX*)

3.1.3. Plazmidi

a) pBG1805 SCW4

Komercijalni plazmid pBG1805 *SCW4* (HorizonTM; slika 1.) sadrži nativnu kopiju gena *SCW4*. Plazmid sadrži dva selektivna biljega, jedan za bakterijske stanice i jedan za kvaščeve stanice, čime je omogućena selekcija stanice sa plazmidom i onih bez njega. Selektivni marker za bakterijske stanice je gen *bla*, čijom sintezom nastaje enzim β -laktamaza koja cijepa β -laktamski prsten i omogućava porast stanica na hranjivim podlogama s ampicilinom (Amp^R). Kod kvaščevih stanica selektivni biljeg je gen *URA3* koji omogućava rast transformiranih stanica na hranjivoj podlozi bez uracila (YNB Ura⁻). Osim toga na plazmidu se nalazi gen *SCW4* koji na svom kraju ima niz od šest histidina (-His tag) i -HA sekvencu na koju se vežu specifična antitijela. Sam gen je pod kontrolom *GAL1* promotora, čime dolazi do ekspresije gena *SCW4* na hranjivim podlogama s galaktozom.



Slika 1. Plazmid pBG1805

b) pBG1805 SCW4 mutV

Plazmid pBG1805 *SCW4* mutV je plazmid kojemu je u *SCW4* genu jedna od regija sličnih repetitivnoj sekvenci u proteinima iz Pir obitelji mutirana. U konstrukt je regija koja kodira za slijed aminokiselina **Q₂₃₃A₂₃₄T₂₃₅P₂₃₆S₂₃₇Q₂₃₈V₂₃₉G₂₄₀Q₂₄₁** mutirana u ALVLGALLG (Slika 2.). Plazmidni konstrukt dobiven je PCR metodom korištenjem kita za uvođenje mutacije (Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit, New England BioLabs) te je umnožen u stanicama *E. coli*.

Scw4 (proteinska sekvenca):

```
MRLSNLIASASLLSAATLAAPANHEHKDKRAVTTTTVQKQTTIIVNGAASPVAALEENA
VVNSAPAAATSTTSSAASVATAAASSSENNSQVSAASPASSAATSTQSSSSQASSSS
SSGEDVSSFASGVRGITYTPYESSGACKSASEVASDLAQLTDFPVIRLYGTDCNQVENVF
KAKASNQKVFLGIYYVDQIQDGVNTIKSAVESYGSWDDVTTV SIGNALVNGNQATPSQVG
QYIDSGRSALKAAAGYTGPPVSVDTFIAVINNPCLDYSYMAVNAHAYFDKNTVAQDSGK
WLLEQIQRVWTACDGKKNVITESGWPSKGETYGVAVPSKENQKDAVSAITSSCGADTFL
FTAFNDYWKADGAYGVEKYWGILSNE*
```

mutV konstrukt – **QATPSQVGQ** mutiran u ALVLGALLG

Slika 2. Prikaz proteinske sekvence Scw4

c) pBG1805 SCW4 ΔV

Plazmid pBG1805*SCW4*ΔV je plazmid u kojemu je unutar gena *SCW4* deletiran dio sekvence **Q₂₃₃A₂₃₄T₂₃₅P₂₃₆S₂₃₇Q₂₃₈V₂₃₉G₂₄₀Q₂₄₁** (Slika 2.).

3.1.4. Hranjive podloge

a) Hranjive podloge za uzgoj bakterija (LB):

Tablica 1. Sastojci hranjive podloge (na 200mL):

LB podloga	baktotripton	kvašičev ekstrakt	NaCl	Agar
Tekuća	2g	1g	1g	-
Kruta	2g	1g	1g	3g

Nakon što su svi sastojci podloge dobro otopljeni u vodi (Tablica 1.), hranjive podloge steriliziraju se u autoklavu (121°C, 20 min, 1 atm). Nakon sterilizacije u ohlađene podloge sterilno dodaje se ampicilin, koji se posebno sterilizira filtracijom. Ampicilin, koncentracije 100 mg mL⁻¹, dodajemo u omjeru 1 µl ampicilina : 1 ml hranjive podloge.

b) Hranjive podloge za uzgoj kvasaca (YNB):

Nakon što su svi sastojci pomiješani sa vodom (Tablica 2.), smjesa se sterilizira u autoklavu (121°C, 20 min, 1 atm). Sterilizirane otopine šećera (glukoza (50%), rafinoza (20%) ili galaktoza (20%)) se dodaju naknadno u tekuće podloge, neposredno prije naciepljivanja, u konačnoj koncentraciji od 2%, dok se u krute podloge šećeri dodaju prije sterilizacije. U sve podloge dodaje se u zadanom volumenu određena masa "drop-out", što je smjesa različitih vitamina i aminokiselina u koncentracijama potrebnim za rast kvasaca.

Tablica 2. Sastojci hranjive podloge (na 500 mL):

YNB podloga	YNB-AA/AS	"drop-out"	Aminokiseline			agar	glukoza
			Histidin (His)	Leucin (Leu)	Triptofan (Trp)		
Tekuća	3,35g	0,8g	0,04g	0,08g	0,04g	-	-
Kruta	3,35g	0,8g	0,04g	0,08g	0,04g	7,5g	10g

Tablica 3. Sastav "drop-outa":

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 kis.	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 kis.	2,0 g	L-valin	2,0 g
L-glicin	2,0 g	p-aminobenzojeva kis.	0,2 g
L-izoleucin	2,0 g	Inozitol	2,0 g

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija plazmida iz stanica *E. coli*

Iz trajne kulture stanice *E. coli* koje nose željeni plazmid nacjepljuju se na krutu LB hranjivu podlogu s ampicilinom te preko noći ostavljaju u inkubatoru na 37°C. Sljedeći dan porasle kolonije precjepljuju se na tekuću LB hranjivu podlogu sa ampicilinom te ponovno inkubiraju preko noći na tresilici, pri 37°C. Iz takve prekonodne kulture izoliraju se plazmidi koristeći "NucleoSpin® Plasmid" kit (Macherey-Nagel), prema uputama proizvođača. Izolirani plazmidi čuvaju se u zamrzivaču na -20°C.

3.2.2. Određivanje koncentracije DNA

Iz stanica *E. coli* izolirana je plazmidna DNA, čija se koncentracija određuje pomoću "Qubit 3,0" fluorometra prema uputama proizvođača (Invitrogen, Life Technologies).

3.2.3. Restriksijska analiza gotovih plazmida

Provjera ispravnosti plazmida pBG1805 *SCW4* mutV provodi se pomoću restriksijskog enzima SapI koji, u odnosu na plazmid sa nativnim *SCW4* genom, cijepa plazmid na jednom dodatnom mjestu unutar mutirane regije. Restriksijska smjesa (enzim, plazmid, odgovarajući pufer i

sterilna voda) inkubira se preko noći u termobloku na 37°C. Veličinu fragmenata dobivenih restrikcijom provjeravamo gel elektrofozom.

3.2.4. DNA elektroforeza

Produkti restrikcijske analize provjeravaju se DNA elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu pripremljenom s TAE puferom (40 mmol L⁻¹ TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol L⁻¹ EDTA). U uzorke plazmidne DNA i standarda dodaje se otopina boje (Gel Loading Dye, New England BioLabs), te se zatim unose u jažice u gelu. Elektroforeza se provodi pri naponu 5 V/cm gela u TAE puferu. Nakon završetka elektroforeze vizualizacija se vrši uranjanjem gela u otopinu etidij bromida (100 mg mL⁻¹). Etidij bromid interkalira u DNA te apsorbira UV svjetlost, a emitira svjetlost narančasto-crvene boje čime se vizualiziraju vrpce na gelu i snimaju pomoću Uvitec uređaja.

3.2.5. Transformacija kvasca LiAc metodom

Za transformaciju kvasca (Gietz i Schiestl, 1995) koriste se prekonoćne kulture kvasca *S. cerevisiae* (*wt* i *kex2*) uzgojene u odgovarajućem YNB mediju, koje se razrijede u svježem mediju na početni OD₆₀₀ 0,5. Nakon toga, kvasac se dalje uzgaja do OD₆₀₀ 2, tj. kroz dvije generacije. Nakon postignute željene optičke gustoće hranjiva podloga se odvoji od stanica centrifugiranjem 5 minuta na 6000 o/min te ispiru sa 15 mL sterilne vode. Odvojeni talog stanica resuspendira se u 3 mL 0,1 M LiAc i prenosi u eppendorf epruvetu. Suspenziju se ponovno centrifugira, ovaj put 30 sekundi na 8000 o/min, a na zaostali talog se sljedećim redosljedom dodaju: 240 µL 50%-tna otopina PEG-a, 36 µL 1M LiAc, 25 µL "carrier DNA" i 50 µL smjese odgovarajućeg plazmida i sterilne vode (konačna konc. DNA 1 µg). Treba napomenuti da se "carrier DNA" (lax DNA) prokuhava na 100°C, 10-15 minuta i hladi prije uporabe. Zatim smjesu vorteksiramo dok ne postane homogena, a nakon toga inkubiramo u termobloku 30 minuta na 30°C. Slijedi toplinski šok, tako što eppendorf epruvete inkubiramo na 42°C kroz 20 minuta. Nakon 20 minuta smjesa se centrifugira na 8000 o/min i uklanja se supernatant. Zaostali talog resuspendiramo u 1 mL sterilne vode te zatim 100 µL suspenzije nacjepljujemo na selektivnu krutu hranjivu podlogu (YNB Ura⁻). Ploču inkubiramo dva do tri dana u termostatu na 30°C, a zatim spremamo u hladnjak na +4°C.

3.2.6. Uzgoj kvasca uz indukciju *GAL* promotora

GAL promotor jaki je promotor pod čijom kontrolom se nalazi gen *SCW4*. Kako bi došlo do aktivacije promotora uzgoj kvasca mora se odvijati na hranjivoj podlozi na kojoj nema glukoze. Glukoza reprimira ekspresiju sa *GAL* promotora dok ju galaktoza pospješuje. Kvasac se ne može direktno iz podloge sa glukozom prebaciti na podlogu s galaktozom, već ga je prije prebacivanja u podlogu sa galaktozom potrebno uzgojiti na podlozi sa rafinozom. Postupak započinje uzimanjem jedne kolonije sa krute hranjive podloge i njenim prijenosom u 10 mL tekuće hranjive podloge u koju dodajemo 1 mL 20%-tne rafinoze (1 mL rafinoze + 9 mL YNB Ura⁻). Nacijepeljenu podlogu inkubiramo preko noći na tresilici na 30°C. Nakon prekonodne inkubacije izmjerimo OD₆₀₀ kulture, te određeni alikvot precjepujemo u istu količinu svježih tekuće hranjive podloge s rafinozom tako da početni OD₆₀₀ bude 0,5 i nastavljamo uzgoj do postizanja OD₆₀₀ 1-1,5. Nakon dostignutog porasta alikvot kulture precjepujemo u 50 mL hranjive podloge u koju dodajemo 5 mL galaktoze i 1 mL rafinoze (5 mL galaktoze + 1 mL rafinoze + 44 mL YNB) tako da je početni OD₆₀₀ 0,5. Takvu kulturu inkubiramo preko noći na tresilici na 30°C. Po potrebi se hranjiva podloga puferira u zadnjem koraku indukcije, tako da se uz galaktozu i rafinozu u hranjivu podlogu dodaje 5 mL 100 mM fosfat-citratnog pufera pH=4 ili pH=7.

3.2.7. Izolacija stijenki i proteina stijenki kvasca *S. cerevisiae*

Kvasac se iz prekonodno uzgajane kulture kvasca (50 mL podloge, OD₆₀₀ minimalno 2) izdvoji centrifugiranjem 5 minuta na 6000 o/min, te se nakon toga zaostali talog ispere dva puta sa destiliranom vodom te dva puta sa 50 mM K-fosfatnim puferom pH=8. Između svakog ispiranja potrebno je centrifugirati suspenziju i ukloniti izdvojeni supernatant. Poslije ispiranja, talog se prebacuje pomoću istog pufera u posebnu kivetu za razbijanje stanica i na takvu suspenziju treba dodati staklene kuglice u omjeru 1:1. Stanice se razbijaju u dva intervala na BeadBug TM uređaju pri brzini od 4000 rpm u trajanju od 3 minute, između razbijanja stanice hladimo u ledenoj kupelji. Nakon što su stanice razbijene potrebno je suspenziju i dalje držati na ledu kako bi se ograničila aktivnost proteaza. Staklene kuglice se odvajaju od stanica, a kako bi se uklonio intracelularni sadržaj suspenziju treba centrifugirati 1 minutu na 8000 rpm. Talog stijenki ispiramo četiri puta sa po 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH=8.

3.2.8. SDS tretman stijenki

Na talog stijenki dodaje se 1 mL Laemmli pufera (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 mM EDTA III; 2% SDS; 10% glicerol; 0,001% bromfenol plavo i 5% β -merkaptotetanol), talog se resuspendira i kuha u kipućoj vodenoj kupelji 10 minuta. Suspenziju nakon kuhanja centrifugiramo 3 minute na 8000 rpm. Svi nekovalentno vezani proteini stanične stijenke nalaze se u izdvojenom supernatantu te se spremaju u zamrzivač na -20°C . Zaostali talog ponovno se resuspendira u svježih 1 mL Laemmli pufera te još jednom kuha i centrifugira, uz odbacivanje supernatanta. Slijedi ispiranje taloga stijenki četiri puta sa po 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH=8.

3.2.9. NaOH tretman stijenki

Nakon ekstrakcije nekovalentno vezanih proteina iz stijenki SDS tretmanom i ispiranja stijenki 50 mM K-fosfatnim puferom pH=8, stijenke treba dodatno ispirati sa 1 mL destilirane vode. Stijenke se zatim resuspendiraju u 50 μL 30 mM NaOH te preko noći inkubiraju u hladnjaku na $+4^{\circ}\text{C}$. Poslije prekonoćne inkubacije suspenziju centrifugiramo 5 minuta na 8000 rpm. U supernatantu se nalaze ekstrahirani kovalentno vezani proteini stanične stijenke na koje dodajemo Laemmli pufer. Uzorak ostavljamo na sobnoj temperaturi 15-20 minuta te ga zatim spremamo u zamrzivač na -20°C .

3.2.10. SDS PAGE elektroforeza

Kovalentno i nekovalentno vezane proteine izdvojene postupcima izolacije proteina iz stanične stijenke stavljamo na elektroforezu. Prije nanošenja uzoraka u gel, u uzorke ekstrakata proteina treba dodati Laemmli pufer za uzorke. Uzorci i LMW standardi se nanose na poliakrilamidni gel, kojeg čine gel za razdvajanje (donji gel sa 12% akrilamida) i gel za sabijanje (gornji gel sa 5% akrilamida). Sastav gela za razdvajanje je sljedeći: 2,5 mL TRIS-HCl pufer (1,5 M, pH=8,8) , 3 mL 30% akrilamida, 2 mL destilirane vode, 5 μL N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) i 38 μL APS. Gel se pušta da polimerizira jedan sat, a kako ne bi došlo do kontakta sa zrakom na površinu gela se dodaje izopropanol, koji se nakon završetka polimerizacije uklanja. Sastav gela za sabijanje je sljedeći: 4,26 mL TRIS-HCl pufer (0,5 M, pH=6,8), 600 μL 30% akrilamida, 5 μL N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) i 45 μL APS-a. Elektroforeza se provodi u Sigma sustavu na 180 V, 150 mA, 90 minuta u puferu za elektroforezu (25 mM TRIS-glicin pufer pH 6.8, 0,1% SDS).

3.2.11. Western blot

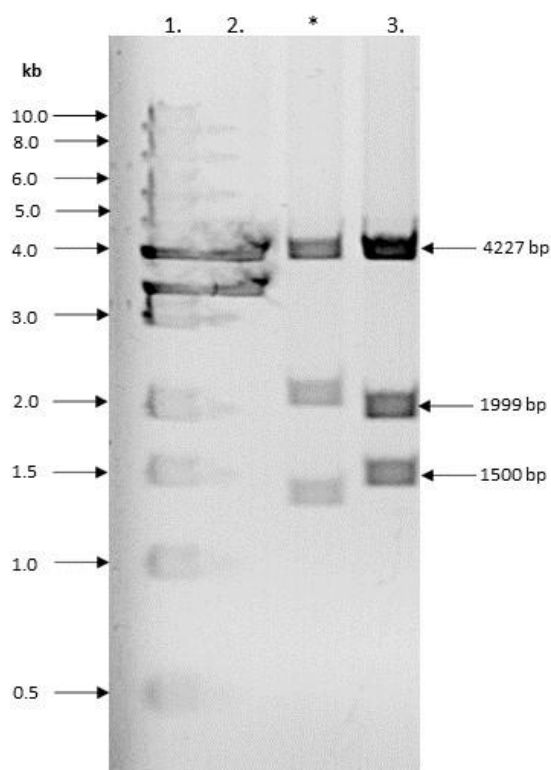
Nakon završene SDS elektroforeze, proteini sa gela se prenose na nitrocelulozu membranu koristeći "Semi-dry" transfer. U Trans-Blot® Turbo™ sustavu (BioRad) transfer se vrši koristeći elektrode različitih polova, čime se osigurava transfer proteina iz gela na membranu. Unutar kadice se slaže sustav od osam filter papira, prethodno namočenih u TRIS-glicinski pufer (25 mM TRIS, 200 mM glicin, 20% metanol), na koje treba postaviti nitroceluloznu membranu, gel i zatim još osam filterpapira namočenih puferom. Uređaj se nakon toga zatvara i pušta u rad na 25 minuta pri 25 V i 1 A. Nakon završetka transfera nitrocelulozna membrana se boja Ponceau S bojom (0,1g 100 mL⁻¹ 5%-tne Hac) do pojave proteinskih vrpca, nakon čega položaj LMW standarda označimo grafitnom olovkom. Nakon toga membranu potpuno odbojavamo ispiranjem destiliranom vodom. Slijedi preonoćna inkubacija membrane u 10 ml pufera za blokiranje (50 mM TRIS-HCl pufer pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1% obranog mlijeka u prahu) u hladnjaku na +4°C. Sljedeći dan na membranu stavljamo 5 mL pufera za blokiranje i 4 µL anti-HA antitijela za proteine ekstrahirane SDS-om (nekovalentno vezane u stijenku), odnosno 5 µL anti-HA antitijela za proteine ekstrahirane sa NaOH (kovalentno vezane). Membranu inkubiramo na teslici pri sobnoj temperaturi 90 minuta, zatim ispiramo tri puta sa po 10 mL blocking pufera po 10 minuta. Koristeći WesternSure Pen olovku za označavanje standarda označimo položaje standarda na membrani, a zatim na membranu dodajemo BioRad Clarity Western otopine za razvijanje blota u kojima inkubiramo membranu 5 minuta. C-digit skenerom snimimo položaj proteinskih vrpca na membrani, na koje su se vezala antitijela.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati

4.1.1. Restriksijska analiza i gel elektroforeza plazmidne DNA

Kako bi provjerili ispravnost plazmida pBG1805 *SCW4* i pBG1805 *SCW4* mutV proveli smo restriksijsku analizu koristeći enzim SapI. Provodimo gel elektroforezu restriksijske smjese kako bi provjerili veličine fragmenata dobivenih ovom digestijom. Ako je plazmid pBG1805 *SCW4* odgovarajućeg sastava očekujemo dva fragmenata veličine 4202 bp i 3499 bp. Kod plazmida pBG1805 *SCW4* mutV očekujemo tri fragmenata, 4227 bp, 1999 bp i 1500 bp, zbog još jednog dodatnog restriksijskog mjesta koje se nalazi unutar mutirane regije plazmida.



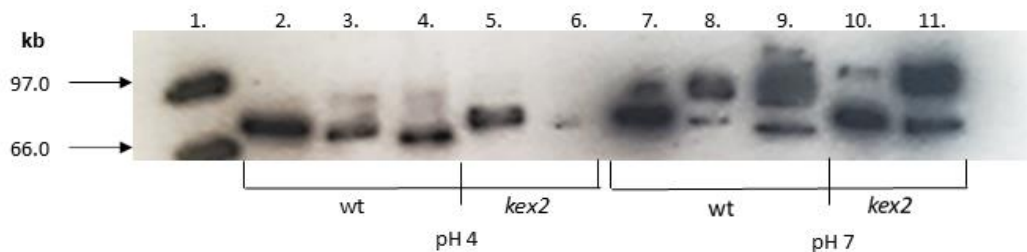
Slika 3. Restriksijska analiza pBG1805 SCW4 i pBG1805 SCW4 mutV. Uzorci: 1. standard DNA Ladder (1 kb), 2. plazmid pBG1805 *SCW4* pocijepan enzimom SapI, 3. plazmid pBG1805 *SCW4* mutV pocijepan enzimom SapI; * - uzorak koji nije obrađen u ovom radu.

Iz slike 3. gel elektroforeze možemo vidjeti da je restrikcija uspješno provedena, te da su konstrukti izolirani iz stanica *E. coli* odgovarajuće sastava. Kod plazmida pBG1805 *SCW4*

vidljiva su dva benda, odnosno kod plazmida pBG1805 *Scw4* mutV tri benda odgovarajućih veličina.

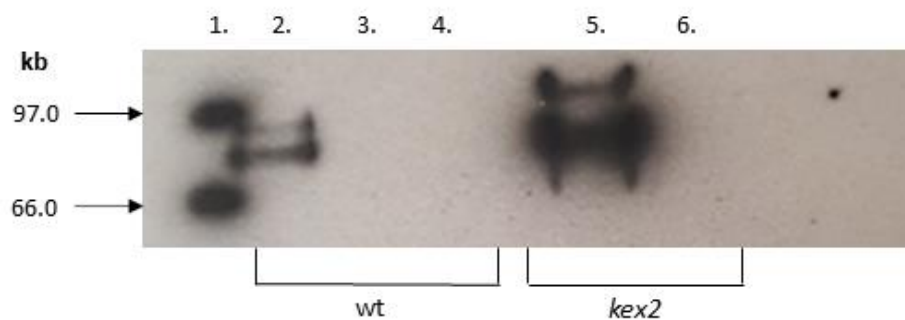
4.1.2. Provjera načina vezanja proteina stanične stijenke kvasca uzgojenog u puferiranim podlogama

Tranformirane kvaščeve stanice uzgajaju se u tekućim hranjivim podlogama (YNB Ura⁻) različitih pH vrijednosti, pH 4 i 7. Osim što se uzgajaju u puferiranim podlogama, uzgajaju se i u uvjetima indukcije *GAL* promotora, tj. u podlogama s galaktozom. Iz takvih kultura izoliraju se proteini stanične stijenke. Prema načinu vezanja proteine dijelimo u dvije skupine, kovalentno i nekovalentno vezane proteine. Izolirane proteine razdvajamo koristeći SDS elektroforezu i provodimo western blot analizu. Na blotu proteine detektiramo koristeći HA-antitijela koja se specifično vežu na HA-sekvencu koja se nalazi u proteinima. Uzgojem kvasaca na podlogama različitog pH očekujemo različitu procesiranost proteina s obzirom na aktivnosti proteolitičkih enzima.



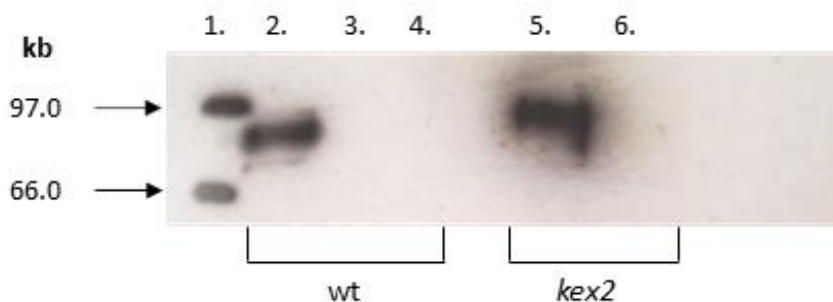
Slika 4. Provjera nekovalentnog vezanja nativnog i mutiranog oblika proteina Scw4 pri uzgoju na pH=4 i 7. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi, 2. nativni Scw4 u wt kvascu pri pH=4, 3. mutirani oblik Scw4 mutV u wt kvascu pri pH=4, 4. mutirani oblik Scw4 ΔV u wt kvascu pri pH=4, 5. nativni Scw4 u *kex2* kvascu pri pH=4, 6. mutirani oblik Scw4 mutV u *kex2* kvascu pri pH=4; 7. nativni Scw4 u wt kvascu pri pH=7, 8. mutirani oblik Scw4 mutV u wt kvascu pri pH=7, 9. mutirani oblik Scw4 ΔV u wt kvascu pri pH=7, 10. nativni Scw4 u *kex2* kvascu pri pH=7, 11. mutirani oblik Scw4 mutV u *kex2* kvascu pri pH=7.

Na slici 4. vidljivi su bendovi svih uzoraka, čime je pokazano da se nativni oblik Scw4, ali i mutirani oblici Scw4 proteina vežu u stijenkú nekovalentno. Pri pH=4 vidljivo je kako se proteini nalaze u potpuno procesiranoj formi, što možemo potvrditi veličinom njihovih fragmenata koja je 69 kDa. Takvu najmanju formu proteina očekujemo zbog aktivnosti proteolitičkih enzima, Kex2 i japsinskih proteaza, koji ih u potpunosti procesiraju. Na pH=7 kod svih uzoraka, wt i *kex2* mutanata, vidljiva su dva benda, što ukazuje na djelomično procesiranje proteina. Kod wt kvasca vidljivi su bendovi veličine 69 kDa te 74 kDa, dok su kod *kex2* mutanata vidljivi bendovi veličine 69 kDa i 76 kDa.



Slika 5. Provjera kovalentnog vezanja nativnog i mutiranog oblika proteina Scw4 pri uzgoju na pH=4. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi, 2. nativni Scw4 u wt kvascu, 3. mutirani oblik Scw4 mutV u wt kvascu, 4. mutirani oblik Scw4 ΔV u wt kvascu, 5. nativni oblik Scw4 u *kex2* kvascu, 6. mutirani oblik Scw4 mutV u *kex2* kvascu.

Iz dobivenih rezultata, slika 5., vidljivo je da dolazi do pojave bendova na membrani samo kod nativnih Scw4 proteina u wt kvascu i u *kex2* mutantu. Time je dokazano kako je mutirana regija V ustvari odgovorna za kovalentno vezanje Scw4 proteina.



Slika 6. Provjera kovalentnog vezanja nativnog i mutiranog oblika proteina Scw4 pri uzgoju na pH=7. Uzorci: 1. LMW proteinski standardi, 2. nativni Scw4 u wt kvascu, 3. mutirani oblik Scw4 mutV u wt kvascu, 4. mutirani oblik Scw4 ΔV u wt kvascu, 5. nativni oblik Scw4 u *kex2* kvascu, 6. mutirani oblik Scw4 mutV u *kex2* kvascu.

Iz slike 6. vidljivo je da dolazi do kovalentnog vezanja nativnog Scw4 proteina neovisno o tipu kvasca. Veličina fragmenta u divljem tipu kvasca je 74 kDa, dok je u *kex2* mutantu 76 kDa, što je ustvari djelomično procesirana, odnosno neprocesirana forma proteina. Takvu razliku u veličini fragmenata objašnjava aktivnost Kex2 proteaze, koja u divljem tipu kvasca djelomično procesira Scw4 protein, dok su japsinski proteini zbog visokog pH inaktivni (Grbavac i sur., 2017), a u *kex2* mutantu nije prisutna Kex2 proteaza te ne dolazi do procesiranja.

4.2. Rasprava

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* modelni je organizam za istraživanja na eukariotima. Iako je njegov genom u potpunosti sekvencioniran 1996. godine (Goffeau i sur., 1996), do danas sam kvasac nije u potpunosti istražen. Poznato je da mu staničnu stijenku tipično čini oko 85% polisaharida i 15% proteina (Nguyen i sur. 1998), no njihov postotak može varirati ovisno o uvjetima i načinu uzgoja kvasca. Najveći dio polisaharidnog dijela stijenke čini β -1,3-glukan (Fleet, 1991), te on zajedno sa hitinom i β -1,6-glukanom čini unutarnju polisaharidnu mrežu. Proteini koji su dio stanične stijenke nalaze se u njenom vanjskom sloju. Jedan od tih proteina je i Scw4. Prvotno je otkiven u SDS ekstraktima, te se zbog toga smatralo da se nekovalentno veže u staničnu stijenku (Cappellaro i sur., 1998), no kasnije je otkriven i u NaOH ekstraktima, što je ukazalo da se osim nekovalentno u stijenku može vezati i kovalentnim vezama (Yin i sur., 2005; Teparić i sur., 2010). Danas su poznate dvije skupine proteina koje se kovalentno vežu u staničnu stijenku. Prva su takozvani proteini Pir obitelji (**P**roteins with **i**nternal **r**epeats) koji su direktno vezani na β -1,3-glukan preko glutaminskih ostataka unutar specifičnih ponavljajućih sekvenci (Ecker i sur., 2006.), a druga skupina su GPI-sidreni proteini koji su vezani na β -1,3-glukan preko ostatka glikozilfosfatidilinozitol (GPI-glycosylphosphatidylinositol) sidra i β -1,6-glukana (Montijn i sur., 1994; Van der Vaart i sur., 1995; Kapteyn i sur., 1996). U staničnoj stijenci poznate su dvije proteaze koje procesiraju Scw4 protein, Kex2 i japsinske proteaze (Cappellaro i sur., 1998). Njihova uloga u stanici još nije u potpunosti razjašnjena, ali poznato je da prepoznaju motiv koji se sastoji od dviju bazičnih aminokiselina iza kojih cijepaju peptidnu vezu (Bader i sur., 2008; Olsen i sur., 1998;

Komano i sur., 1999). Ovaj rad posvećen je ispitivanju načina kovalentnog vezanja proteina Scw4 u staničnu stijenu, to jest jesu li za takvo vezanje odgovorne sekvence slične onima koje se nalaze u Pir proteinima. U radu je korišten komercijalni plazmid, koji u svom sastavu ima nativni *SCW4* gen i plazmida sa mutiranim oblicima Scw4, dobiveni laboratorijski PCR postupkom. Osim *SCW4* gena u plazmidima se nalaze ishodište replikacije (*ori*), selektivni biljezi za bakterije (gen *bla*) i kvasce (gen *URA3*) i *GAL1* promotor. Veličina fragmenata komercijalnog i mutiranog plazmida, uzgojenih u stanicama *E. coli*, provjeravaju se gel elektroforezom. Prije toga je plazmide potrebno izolirati koristeći "NucleoSpin®-Plasmid" kit (Macherey-Nagel) i tretirati restrikcijskim enzimom SapI. Iz rezultata je vidljivo da oba plazmida odgovarajuće veličine i ispravni. Izoliranim plazmidima transformiraju se stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* divljeg tipa i *kex2* mutanata. Koristi se metoda LiAc (Gietz i Schiestl, 1995). Nakon transformacije stanice se nacjepljuju na selektivnu podlogu YNB Ura⁻. Na selektivnoj podlozi doći će do porasta samo onih transformanata koji sadrže plazmide zbog selektivnog biljega koji se nalazi u njihovom genomu. Ono što je bio daljnji cilj je aktivacija *GAL1* promotora kako bi došlo do sinteze Scw4 proteina koji je pod njegovom kontrolom. Transformirane kvasce najprije se uzgajalo u tekućoj hranjivoj podlozi YNB Ura⁻ u kojoj je dodana 20%-tna rafinoza, nakon čega se alikvot suspenzije stanica prebacuje u hranjivu podlogu u kojoj se nalazi 20%-tna galaktoza te puferi koji omogućuju rast pri različitim pH vrijednostima (pH=4 i pH=7). Slijedi prekonoćni uzgoj stanica iz kojih se zatim izoliraju proteini stanične stijene. Proteine izolirane vrućim SDS-om i 30mM NaOH razdvajamo elektroforezom u Sigma sustavu, 90 minuta na 180 V i zatim pomoću Trans-Blot® Turbo™ sustava (BioRad) vršimo transfer proteina iz gela na nitroceluloznu membranu. Gledajući blotove NaOH ekstrakata, u kojima se u stvari nalaze kovalentno vezani proteini stijene, bendovi su vidljivi samo kod uzoraka s nativnim oblikom Scw4 proteina u oba pH područja (slika 5. i slika 6.). To nas navodi na zaključak da je mutirana, odnosno deletirana regija V Scw4 proteina odgovorna za njegovo kovalentno vezanje. Nadalje na blotovima je vidljiva razlika u procesiranju nativnog oblika Scw4 proteina ovisno o pH vrijednostima. Na pH=4 bendovi su vidljivi samo u procesiranom obliku bez obzira na tip kvasca, što nam ukazuje da su za procesiranje Scw4 odgovorne japsinske proteaze (slika 5.). Uloga Kex2 proteaze u procesiranju Scw4 proteina vidljiva je pri pH=7 na blotu divljeg tipa kvasca, gdje su zbog visokog pH inaktivne japsinske proteaze (Grbavac i sur., 2017), a protein se zbog toga nalazi u djelomično procesiranoj formi (74 kDa). Pri pH=7 nativni oblik Scw4 proteina se u *kex2* mutantu nalazi u neprocesiranoj formi (76 kDa) zbog nedostatka Kex2 proteaza (slika 6.). Gledajući proteine u SDS ekstraktu, u stvari nekovalentno vezane proteine, možemo vidjeti da je došlo do vizualizacije proteina svih uzoraka na blotu, bez obzira na pH i tip kvasca (slika 4.). Na blotu možemo vidjeti da je

došlo do procesiranja proteina s obzirom na pH i tip kvasca u kojem su uzgojeni. Pri pH=4 proteini nativnog i mutiranog oblika se nalazi u procesiranoj formi (69 kDa) što je i očekivano zbog aktivnosti Kex2 i japsinskih proteaza, dok se pri pH=7 proteini iz divljeg tipa kvasca nalaze u procesiranoj formi, a iz *kex2* mutanta u neprocesiranoj (slika 4.).

5. Zaključak

Western blot analizom pokazano je da je tzv. V regija Scw4 proteina, koja je po aminokiselinskom slijedu slična repetitivnim regijama u Pir proteinima, odgovorna za kovalentno vezanje Scw4 proteina te je potrebna daljnja analiza te regije kako bi se otkrilo koje ili koja aminokiselina unutar te regije je odgovorna za vezanje.

6. Literatura

- Bader O., Krauke 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 – 131.
- 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. *Journal of Bacteriology* 180: 5030 – 5037.
- Eamus D. G., Jennings D. H. (1986) Water, turgor and osmotic potentials of fungi. U: Water, Fungi and Plants, Ayres P. G., Body L., ur., Cambridge University Press, Cambridge, str. 27-47.
- Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrša V., Tanner W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *Journal of Biological Chemistry* 281: 11523 – 11529.
- Gagnon-Arsenault I., Tremblay J., Bourbonnais Y. (2006) Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. *FEMS Yeast Research* 6: 966 – 978.
- Gietz R. D., Schiestl R. H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/ PEG method. *Nature Protocols* 2 (1): 31 - 34.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jaq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Phillipse P., Tettelin H., Oliver S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546 - 567.
- Goldman R. C., Sullivan P. A., Zakula D., Capoblanco 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.

- Hartland R. P., Vermuelen C. A., Klis F. M., Sietsma J. H., Wessels J. G. (1994) The linkage of (1-3)- β -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1591 – 1599.
- Kapteyn J. C., Montijn R. C., Vink E., de la Cruz J., Llobell A., Douwes J. E., Shimoi H., Lipke P. N., Klis F. M. (1996) Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiesterlinked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* 6: 337 – 345.
- Kapteyn J. C., Ram A. F., Groos E. M., Kollar R., Montijn R. C. (1997) Altered extent of cross-linking of β -1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β -1,3-glucan content. *Journal of Bacteriology* 179: 6279 – 6284.
- Klis F. M. (1994) Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10: 851 – 869.
- Kollar R., Petrakova E., Ashwell G., Robbins P. W., Cabib E. (1995) Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1 – 3)-glucan. *Journal of Biological Chemistry* 270: 1170 – 1178.
- Komano H., Rockwell N. C., Wang G. T., Krafft G. A., Fuller R. S. (1999) Purification and characterization of the yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored, mono-basic specific aspartyl protease yapsin 2 (Mkc7). *Journal of Biological Chemistry* 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.
- Montijn R. C., van Rinsum J., Van Schagen F. A. & Klis F. M. (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side-chain. *Journal of Biological Chemistry* 269: 19338 – 19342.
- Mrša V., Klebl F., Tanner W. (1993) Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo-b-1,3-glucanase. *Journal of Bacteriology* 175: 2102 – 2106.
- Mrša V., Tanner W. (1999) Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5, Ccw6, Ccw7 and Ccw8 (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* 15: 813–820.
- 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.
- Nguyen T. H., Fleet G. H., Rogers P. L. (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 206 – 212.
- Olsen V., Guruprasad K., Cawley N. X., Chen H. C., Blundell T. L., Loh Y. P. (1998) Cleavage efficiency of the novel aspartic protease yapsin 1 (Yap3p) enhanced for substrates with

arginine residues flanking the P1 site: correlation with electronegative active-site pockets predicted by molecular modeling. *Biochemistry* 37: 2768 – 2777.

- Osumi M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29: 207 – 233.
- Osumi M. (2012) Visualization of yeast cells by electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 61: 343 – 365.
- Pignede G., Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J. M. (2000) Characterization of extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology* 182: 2802 - 2810.
- SGD-The *Saccharomyces* Genome Database, <https://www.yeastgenome.org/> , Pristupljeno 24. srpnja 2020.
- Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2004) Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology* 150: 3145 - 3150.
- 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.
- Teparić R., Mrša V. (2013) Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. *Current Genetics* 59: 171 - 185.
- Valentin E., Herrero W., Pastor J. F. I., Sentandreu R. (1984) Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 130: 1419 – 1428.
- Van Der Vaart J. M., Caro L. H. P., Chapman J. W., Klis F. M., Verrips C. T. (1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 177: 3104 – 3110.
- Wilcox C. A., Fuller R. S. (1991) Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *Journal of Cell Biology* 115: 297 - 307.
- Yin Q. Y., de Groot P. W., Dekker H. L., de Jong L., Klis F. M., de Koster C. G. (2005) Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *Journal of Biological Chemistry* 280: 20894 – 20901.