

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

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

Lucija Lulić

6879/BT

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biokemija 2

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

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

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

Lucija Lulić, 6879/BT

Sažetak: Scw4 je protein koji se u staničnoj stijenci kvasca *Saccharomyces cerevisiae* veže kovalentno i nekovalentno, ali nije poznato koji dio gena kodira za regiju koja mu omogućuje kovalentno povezivanje. Provedeno je ispitivanje načina vezanja u stijenku nakon delecije dijelova gena *SCW4* koji kodiraju za regije za koje se pretpostavlja da bi mogle omogućiti kovalentno povezivanje. U tu je svrhu kvasac uzgojen u selektivnoj YNB podlozi nakon čega su izolirane stijenke i njihovi proteini kuhanjem u SDS-u uz dodatak β -merkaptoetanolu odnosno tretmanom stijenki s 30 mM NaOH. Izolirani proteini su zatim analizirani SDS elektroforezom po Laemmli-u i metodom Western blot. Prema dobivenim rezultatima može se pretpostaviti da se Scw4 protein u staničnu stijenku kvasca veže kovalentno preko regije koja je prema broju i redoslijedu glutaminskih ostataka slična repetitivnoj sekvenci PIR proteina. Dobivene rezultate je potrebno potvrditi daljnjim istraživanjima.

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

Rad sadrži: 29 stranica, 8 slika, 4 tablice, 35 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

Pomoć pri izradi: Antonija Grbavac, dipl.ing.

Rad predan: srpanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department of Chemistry and biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Investigation of the binding of the Scw4 protein into the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Lucija Lulić, 6879/BT

Abstract: Scw4 is a protein which can be bound covalently and non-covalently into the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, but it is not known which region of protein allows its covalent linkage. The way of its binding was examined after deletion of *SCW4* gene segments encoding regions that could be responsible for covalent attachment of Scw4. For this purpose, the yeast was cultivated in a selective YNB medium and after that, the cell walls and proteins were isolated by boiling in SDS with β -mercaptoethanol or by treatment with a 30 mM NaOH. Isolated proteins were examined by SDS electrophoresis according to Laemmli and by Western blotting. According to the results, it can be assumed that the protein Scw4 is bound covalently via a region that has an arrangement and number of glutamine residues similar to that found in the repetitive sequence of PIR proteins that is responsible for its covalent binding. This results should be confirmed in further experiments.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall, Scw4, covalent binding

Thesis contains: 29 pages, 8 figures, 4 tables, 35 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph.D. Renata Teparić, associate professor

Technical support and assistance: Antonija Grbavac, dipl.ing.

Thesis delivered: July 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Građa stanične stijenke kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1.1. Polisaharidi stanične stijenke	3
2.1.2. Proteini stanične stijenke	5
2.1.2.1. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke	6
2.1.2.2. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke	7
2.2. Uloga Scw4 proteina u stanicama kvasca	9
2.3. Proteaze koje sudjeluju u procesiranju Scw4 proteina stanične stijenke	9
2.3.1. Uloga Kex2 proteaza u stanicama kvasca	10
2.3.2. Uloga japsinskih proteaza u stanicama kvasca	11
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.2. Sojevi kvasaca	13
3.1.3. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca	14
3.2. Metode	15
3.2.1. Izolacija staničnih stijenki kvasca	15
3.2.2. Izolacija nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke	15
3.2.3. Izolacija kovalentno vezanih proteina stanične stijenke	16
3.2.4. SDS-elektroforeza po Laemmli-u	16
3.2.5. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu i njihovo specifično obilježavanje	17
4. REZULTATI	18
4.1. Provjera načina vezanja mutiranih oblika Scw4 proteina u staničnoj stijenci kvasca uzgajanog pri pH4	20
4.2. Provjera načina vezanja mutiranih oblika Scw4 proteina u staničnoj stijenci kvasca uzgajanog pri pH7	21
5. RASPRAVA	22
6. ZAKLJUČCI	26
7. POPIS LITERATURE	27

1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* pripada carstvu *Fungi* s ostalim višestaničnim organizmima poput plijesni i viših gljiva. Njegov genom je prvi eukariotski sekvencionirani genom pa služi kao modelni organizam te se koristi za konstrukciju različitih mutanata koji se, osim u tradicionalne upotrebe u pekarstvu, pivarstvu te vinarstvu, upotrebljavaju i u razne biotehnoške, medicinske i druge svrhe. Osim toga, ima visoku učinkovitost fermentacije, brzog rasta i korištenja šećera, aktivan je u kiselom okruženju te je tolerantan na visoke koncentracije etanola i na niske koncentracije kisika. *Saccharomyces cerevisiae* ima staničnu stijenku građenu od dva funkcionalno i strukturno različita sloja. Stanična stijenka čini gotovo 30% suhe tvari stanice te kvascima omogućuje preživljavanje u stresnim uvjetima, daje mu čvrstoću i određuje oblik. Unutarnji sloj građen je od polimera β -1,3-glukana i β -1,6-glukana (polimeri glukoze) te hitina (polimer N-acetilglukozamina) koji osiguravaju osmotsku i mehaničku stabilnost (Mrša i sur.,1997). Vanjski je sloj uglavnom građen od manoproteina koji zauzimaju 35% suhe tvari stanične stijenke, a u stijenku se mogu vezati kovalentnim ili nekovalentnim interakcijama.

Scw4 je protein stanične stijenke koji se u stijenku veže i kovalentnim i nekovalentnim interakcijama, međutim, još uvijek nije poznato koji dio gena *SCW4* kodira za regiju koja mu omogućuje kovalentno povezivanje. Da bi se to moglo ispitati, u prijašnjem su radu, metodama „megapočetnice“ i „overlap extension“, pomoću PCR-a uvedene mutacije. Deletiran je dio gena *SCW4* koji kodira za prvih 176 aminokiselinskih ostataka na N-terminalnom dijelu proteina (tzv. $\Delta 176$ *SCW4*) odnosno dio gena koji kodira za 16 aminokiselinskih ostataka u središnjem dijelu proteina (tzv. ΔV *SCW4*) jer bi te regije, radi sličnosti s proučenim Pir4 proteinom, mogle biti zaslužne za kovalentno povezivanje.

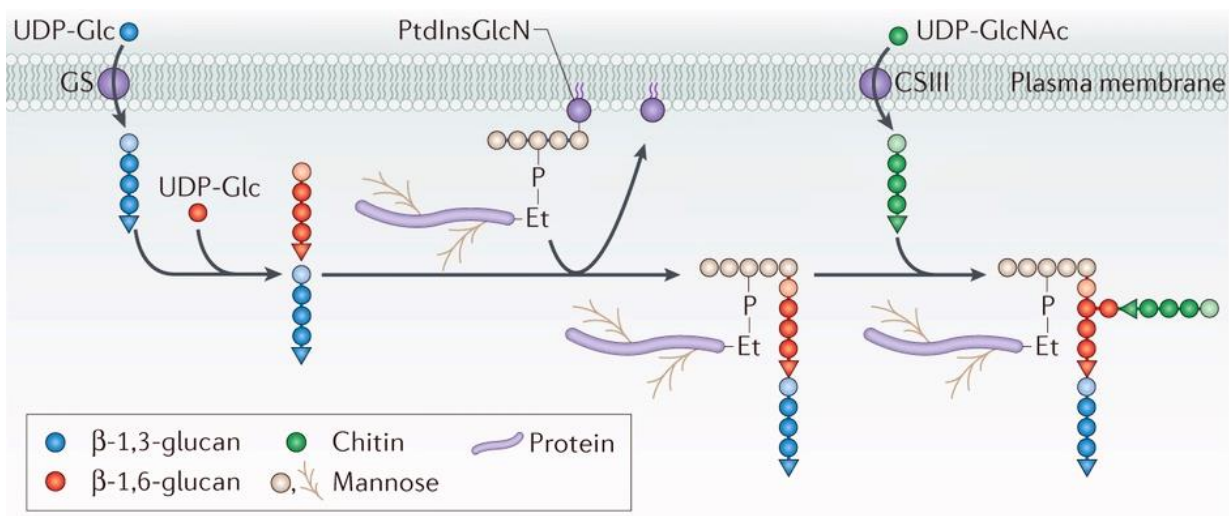
Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj prethodno unesenih mutacija na kovalentno povezivanje Scw4 proteina u staničnu stijenku kao i utjecaj pH na vezanje i procesiranje mutiranih oblika Scw4 proteina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Građa stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je kompleksna dinamična struktura čija je uloga određivanje oblika, osiguravanje čvrstoće stanice te preživljavanje stanica u stresnim uvjetima. Čine ju dva funkcionalno i strukturalno različita sloja od kojih je vanjski sloj građen od manoproteina (35%) čija uloga nije još potpuno razjašnjena, ali se pretpostavlja da sudjeluju u pregradnjama stijenke tijekom staničnog ciklusa, određuju površinska svojstva stanice kvasca te ograničavaju propusnost stijenke za molekule iz okoline. Osim toga, neki od manoproteina su i adhezini, proteini bitni za kontakt između stanica tijekom formiranja biofilma (Reynolds i Fink 2001.; Douglas i sur., 2007.).

Unutarnji je sloj stanične stijenke građen od polisaharida β -1,3-glukana (50%) i β -1,6-glukana (5%) te hitina (1-2%) koji određuju oblik stanice te pružaju osmotsku i mehaničku stabilnost (Mrša i sur., 1997.).



Slika 1. Komponente stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

(<http://www.nature.com>, pristupljeno 12.05.2016.)

2.1.1. Polisaharidi stanične stijenke

Polisaharidi stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* su polimeri β -1,3-glukan, β -1,6-glukan (polimeri glukoze) i hitin (polimer N-acetilglukozamina) koji određuju oblik stanice i osiguravaju njenu mehaničku čvrstoću i osmotsku stabilnost, te manan (polimer manoze) koji čini ugljikohidratni dio manoproteina stijenke te ograničava njenu propusnost za molekule iz periplazmatskog prostora.

β -1,3-glukan

β -1,3-glukan je ravnolančani polimer glukoze koji nastaje povezivanjem oko 1500 glukoznih jedinica u lance. Sintetizira se prvi prilikom sinteze stanične stijenke nakon čega se, na formirani glukanski sloj, vežu β -1,6-glukan i hitin koji se (Cabib i sur., 2001; Roh i sur., 2002.). Lanci β -1,3-glukana formiraju strukturu uzvojnice čime se osigurava čvrstoća i osmotska stabilnost stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*. Reakciju provodi multienzimski kompleks β -1,3-glukan sintaza smješten u staničnoj membrani (Qadota, 1996.). Građen je od dvije katalitičke (Fks1p i Fks2p) te jedne regulatorne podjedinice (Rho1p GTPaza). β -1,3-glukan sintaza aktivira se pomoću senzornog proteina Wsc1p preko Rom2p proteina, a inhibira djelovanjem Lrg1p proteina iz grupe Rho1p proteina. (Watanabe i sur., 2002.).

β -1,3-glukan se u staničnoj stijenci kovalentno povezuje s β -1,6-glukanom i hitinom pri čemu je 40-50% hitina reducirajućim krajem povezano β -1,4 glikozidnom vezom s nereducirajućim krajem β -1,3-glukana (Lesage i Bussey, 2006.; Levin, 2011.).

β -1,6-glukan

β -1,6-glukan je razgranati polimer glukoze s mjestima grananja na prosječno svakoj petoj glukoznoj jedinici. Sintezu β -1,6-glukana provodi UDP-glukoza ovisni enzim β -1,6-glukan sintaza koja povezuje oko 130 monomernih jedinica glukoze (Orlean, 2012.). Poznato je da β -1,6-glukan stabilizira staničnu stijenu jer ima ulogu u povezivanju ostalih komponenti stijenke te da za biosintezu β -1,6-glukana kodira više od 20 gena iz *KRE* grupe uključujući i njihove homologe *SKNI* i *KNHI*.

Također je poznato i da na njegovu količinu u staničnoj stijenci utječu brojni proteini koji su smješteni u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevom tijelu i staničnoj membrani (Aimanianda i sur., 2009.), ali njegov biosintetski put, kao ni struktura, nisu još potpuno razjašnjeni.

Hitin

Hitin je linearni polimer N-acetilglukozamina koji nastaje povezivanjem oko 190 monomernih jedinica uz pomoć enzima hitin sintaze. U stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* prisutne su tri hitin sintaze - hitin sintaza I (Chs1), hitin sintaza II (Chs2) i hitin sintaza III (Chs3) koje potječu iz hrapavog endoplazmatskog retikuluma, ali se aktiviraju u staničnoj membrani.

Chs1, Chs2 i Chs3 proteini pripadaju GT2 grupi invertirajućih glikoziltransferaza koje kao donore monomernih jedinica koriste UDP-N-acetilglukozamin. Chs3 protein sintetizira hitin oko pupa, a nakon odvajanja stanica, ostaje na matičnoj stanici kao komponenta ožiljka. Chs2 i Chs3 proteini imaju važnu ulogu u primarnom formiranju pupa i citokinezi jer mutacije u oba gena na stanicu djeluju letalno (Shaw i sur. 1991).

Hitin ima strukturu sličnu α -celulozi i dolazi u obliku dva antiparalelna lanca povezana vodikovim vezama koji se nereducirajućim krajevima vežu za β -1,3-glukan i β -1,6-glukan. Amidne grupe su povezane vodikovim vezama što dodatno stabilizira kristalnu strukturu, a zajedno s hidrofobnim jezgrama formiranim od acetamidometilnih grupa sprječavaju ulazak vode i topljenje tih kristala (Lipke i Ovalle, 1998.). Sinteza hitina i ugradnja u staničnu stijenu odvija se odmah nakon citokineze što rezultira razinom hitina od 2% u bočnim zidovima stijenke i ožiljcima stanice majke (Shaw i sur., 1991.).

Manan

Manan je razgranati polisaharid manoze koji čini ugljikohidratni dio manoproteina smještenih u vanjskom sloju stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Manoproteini se međusobno razlikuju po tipu glikozilacije pa tako mogu imati N-glikozilirane asparaginske ostatake ili O-glikozilirane serinske i/ili treoninske ostatake. Oba tipa glikozilacije su neophodna za rast stanica kvasca jer poremećaji u procesima glikozilacije djeluju letalno na stanicu.

2.1.2. Proteini stanične stijenke

Manoproteini stanične stijenke zauzimaju 35% suhe tvari stijenke, ali njihova uloga još nije potpuno razjašnjena. Do sada je otkriveno više od 30 proteina za koje je pokazano da njihovo pojedinačno uklanjanje iz stanične stijenke nema velik utjecaj na osmotsku stabilnost niti promjenu oblika stanica. Poznato je da određuju površinska svojstva stanice i ograničavaju transport okolišnih molekula iz periplazmatskog prostora u stanicu te da među njima postoje razlike u povezivanju s glukanskim slojem stanične stijenke (De Nobel i sur., 1990.)

Analizom manoproteina ustanovljene su razlike u njihovom povezivanju na glukanski sloj stanične stijenke pa se prema tome dijele u dvije skupine. Prvu skupinu čine nekovalentno vezani proteini koji se iz stijenke izoliraju kuhanjem u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptetoetanolu. Drugu skupinu, kovalentno vezane proteine, čine proteini koji se preko glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) ostatka vežu za β -1,6-glukan, a izoliraju se tretmanom β -1,6-glukanazama ili β -1,3-glukanazama te proteini obitelji PIR (Proteins with Internal Repeats) koji se izoliraju tretmanom s NaOH (Mrša i sur., 1997.).

2.1.2.1. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenske

Nekovalentno vezani proteini pretežno su O-glikozilirani (Cappellaro i sur., 1998.) te čine 80% manoproteina stanične stijenske. Ravnomjerno su raspoređeni u staničnoj stijenci i sadrže veliki udio homologije s enzimima transglikozidazama radi čega se smatra da imaju ulogu u pregradnji β -glukana u staničnoj stijenci tijekom životnih procesa koji podrazumijevaju promijene stanične stijenske kao što su rast, pupanje, parenje i sporulacija (Teparić i sur., 2010.). Njihova fiziološka uloga nije u potpunosti razjašnjena iako je do sada izolirano i djelomično karakterizirano desetak nekovalentno vezanih proteina.

Prvi izolirani i okarakterizirani protein ove skupine je Bgl2p protein koji, ovisno o koncentraciji supstrata, pokazuje i endoglukanaznu i transglikozidaznu aktivnost (Goldman i sur., 1995.). Osim toga Bgl2p protein sadrži i značajan udio homologije s nekovalentno vezanim proteinima Scw4, Scw10 i Scw11 radi čega se pretpostavlja da i oni imaju glukan-remodelirajuću aktivnost iako to nije dokazano *in vitro* (Teparić i sur., 2010.).

Nekovalentno vezani proteini se iz stanične stijenske mogu izolirati grijanjem na 95-110°C tijekom 5-10 minuta u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptotanolu (Mrša i sur., 1997.) ili podvrgavanjem stanica tretmanu s 2 mM ditiotreitolom na 4°C tijekom noći (Cappellaro i sur., 1998.) pri čemu dobiveni ekstrakt, osim nekovalentno vezanih proteina, sadrži i proteine koji su u staničnu stijensku vezani disulfidnim mostovima.

Tablica 1. Neki od nekovalentno vezanih proteina stanične stijenske

Scw-protein	Funkcija	veličina (kDa)
Scw2	Hitinaza	116
Scw3	Homolog glukanazama	95
Scw4	Homolog glukanazama	66
Scw6	Egzoglukanaza	44
Scw8	Nepoznata	41
Scw9	Endoglukanaza/transglukanaza	29
Scw10	Homolog glukanazama	66
Scw11	Homolog glukanazama	78

2.1.2.2. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke

Kovalentno vezane proteine stijenke čine proteini koji se preko glikozilfosfatidilinozitolnog ostatka vežu za β -1,6-glukan (GPI proteini) te PIR proteini (Proteins with Internal Repeats) koji se s β -1,3-glukanom povezuju preko specifičnog glutaminskog ostatka unutar karakteristične ponavljajuće sekvence (Ecker i sur., 2006.). GPI i PIR grupe proteina razlikuju se i po metodama izolacije jer se proteini GPI grupe izoliraju tretmanom β -1,6-glukanazama ili β -1,3-glukanazama, a proteini PIR grupe tretmanom stijenki uz pomoć NaOH (Mrša i sur., 1997.).

Tablica 2. Kovalentno vezani proteini

Protein	Veličina (kDa)	FUNKCIJA
Ccw7/Pir2/Hsp150	115	"Heat - shock" protein
Ccw5/Pir4/Ccw11	41	Nepoznata
Ccw6/Pir1	250	Nepoznata
Ccw8/Pir3	57	Nepoznata

GPI proteini

GPI proteini su O- i/ili N-glikozilirani proteini koji su uključeni u biosintezu i remodeliranje stanične stijenke te određuju površinsku hidrofobnost i antigenost stanice (Klis i sur., 2002.). Na N-terminalnom dijelu sadrže hidrofobnu signalnu sekvencu koja ih upućuje u endoplazmatski retikulum, a na C-terminalnom dijelu sadrže sekvencu koja se proteolitički uklanja te se na njeno mjesto, transamidacijom, veže GPI sidro. Vezanje GPI sidra se odvija na endoplazmatskom retikulumu nakon čega se proteini prenose u Golgijevo tijelo pa u staničnu membranu odakle se, reakcijom transglikozilacije, translociraju i vežu na β -1,6-glukan (Orlean, 2012.).

Proteine GPI skupine čine 5 proteina GAS obitelji koji imaju glukan-remodelirajuću aktivnost, egzoglukanaza Exg2 i transglikozidaze Crh1 i Utr2/Crh2 čija je funkcija stvaranje veze između β -1,3-glukana i hitina. U grupu GPI proteina se ubrajaju i aglutinini koji su najviše istraženi i sudjeluju u interakciji stanica u različitim uvjetima te proteini FLO obitelji odnosno flokulini koji služe za flokulaciju, a slični su lektinima i TIR obitelji čija uloga još nije poznata.

PIR proteini

PIR proteini su intenzivno su O-manozilirani kovalentno vezani proteini koji se iz stanične stijenke izoliraju β -eliminacijom pomoću NaOH. Imaju visok stupanj homologije, bogati su aminokiselinama serinom i treoninom te sadrže N-terminalnu signalnu sekvencu duljine 11 aminokiselina koja PIR proteine upućuje u sekretorni put. U genima koji kodiraju za PIR proteine nalazi se specifično restrikcijsko mjesto za procesiranje endoproteazom Kex2 (Mrša i sur., 1997.) te karakteristične ponavljajuće regije koje su odgovorne za kovalentno vezanje PIR proteina u staničnu stijenku (Slika 2.).

```
MQFKNVALAASVAALSATASAEGYTPGEPWSTLPTGSISCGAAEYTTTFGIQAVQAITSS  
KAKRDVISQIGDGQVQATSAATAQATDSQAQATTTATPTSSEKISSSASKTSTNATSSSC  
ATPSLKDSSCKNSGTLELTLKDGVLTDKGRIGSIVANRQFQFDGPPPQAGAIYAAGWSI  
TEDGYLALGDSDFYQCLSGNFYNLYDQNVAEQCSAIHLEAVSLVDC
```

Slika 2. Sekvenca Pir4 proteina. Istaknuta je karakteristična regija koja osigurava kovalentno povezivanje proteina u staničnoj stijenci kvasca

Ispitivanja ekspresije i svojstava PIR proteina (Pir1/Ccw6, Hsp150/Pir2/Ccw7, Pir3/Ccw8 i Cis3/Pir/Ccw) u različitim mutantima upućuju da je uloga PIR proteina održavanje integriteta stanice i stanične stijenke jer inaktivacijom gena za sva 4 PIR proteina dolazi do izmjene morfoloških svojstava stanične stijenke, nepravilnog oblika, rasta u nakupinama te povećanja osjetljivosti prema inhibitorima sinteze stanične stijenke (Mrša i sur., 1997.). Međutim, takav rezultat još nije potvrđen.

2.2. Uloga Scw4 proteina u stanicama kvasca

Scw4 protein jedan je od najzastupljenijih proteina stanične stijenke. Iako pokazuje visoku razinu homologije s glukanzama i nekovalentno vezanim proteinom Bgl2, još uvijek nije poznata njegova fiziološka uloga. U početku je bio identificiran i okarakteriziran kao nekovalentno vezani protein, ali se daljnjim analizama utvrdilo da se u staničnu stijenkicu veže i kovalentnim i nekovalentnim interakcijama. To je potvrđeno izolacijom proteina te SDS elektroforezom po Laemmli-u i Western blot metodom koja je pokazala da se Scw4 protein, osim otopinom SDS-a uz dodatak β -merkaptetanola, iz stanične stijenke može ekstrahirati kao i PIR proteini, tretmanom s NaOH (Teparić i sur., 2007.). Za razliku od PIR proteina, Scw4 protein ne sadrži specifičnu ponavljajuću sekvencu preko koje se PIR proteini kovalentno povezuju u stijenkicu pa još nije poznato koja regija proteina omogućuje njegovo kovalentno povezivanje u staničnu stijenkicu.

Scw4 protein u stanicama kvasca ima homologa, Scw10 protein, s kojim dijeli 63% identičnih aminokiselina te sekvencu za translociranje u endoplazmatski retikulum i mjesto za procesiranje Kex2 proteolitičkim enzimom. I Scw4 i Scw10 pokazuju sličnosti s enzimima glukanzama i transglikozidazama što je dokazano konstrukcijom mutanata. Kod mutanata kod kojih je deletiran ili *scw4* ili *scw10* nije došlo do značajnih promjena fenotipa u usporedbi s divljim tipom dok je kod dvostrukih *scw4scw10* mutanata uočen usporen rast, morfološke abnormalnosti te hiperosjetljivost na Calcoflour White (CFW), Congo Red (CR) i kofein u koncentracijama koje nisu imale značajan utjecaj na stanice kvasca divljeg tipa (Cappellaro i sur., 1998.). Osim toga, analize su pokazale i promjene prilikom parenja te da je udio glukana i hitina u stanicama dvostrukih mutanata (Šestak i sur., 2004.).

2.3. Proteaze koje sudjeluju u procesiranju Scw4 proteina stanične stijenke

Ekstrakcijom Scw4 proteina iz stanične stijenke divljeg tipa kvasca, dobivene se tri proteinske vrpce različitih veličina što upućuje na postojanje više mjesta za procesiranje proteolitičkim enzimima (neobjavljeni rezultati). Proteini koji sudjeluju u procesiranju Scw4 proteina su Kex2 i japsinske proteaze.

2.3.1. Uloga Kex2 proteaza u stanicama

Kex2 je specifična Ca^{2+} ovisna serinska endoproteaza molekulske mase 68 kDa. Integralni je membranski protein koji pripada obitelji prohormonskih i proproteinskih konvertaza sekretornog puta (Fuller i sur., 1989.). Biokemijski put Kex2 proteaze u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dobro je istražen, ali je poznato vrlo malo supstrata (Germain i sur., 1992.; Bader i sur., 2008.). Neki od poznatih supstrata Kex2 proteaze su prekursori killer toksina K1 i K2, prekursori feromona α -faktora kod *MAT α* stanica koji je neophodan kod parenja kvasca te proproteini i proteini koji imaju ulogu u održavanju i remodeliranju stanične stijenke. Te proproteine i proteine Kex2 proteaza aktivira tako što ih cijepa iza sekvenci Arg-Arg/X ili Lys-Arg/X. To je potvrđeno delecijom *KEX2* gena što je uzrokovalo razvijanje tzv. pleiotropnog fenotipa stanica mutanata (višestruki fenotipski učinci izazvani mutacijom jednog gena), a tako mutirane stanice ne mogu proteolizom aktivirati supstrate (Bader i sur., 2008.).

Istraživanja su pokazala da Kex2 sudjeluje i u fuzioniranju stanica prilikom parenja jer proteolizom aktivira protein ili stvara kompleks s feromonom reguliranim membranskim proteinom Prm1p (Heiman i sur., 2007.)

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

Zimogena forma Kex2 proteina aktivira se autoproteolitički odnosno cijepanjem N-terminalne sekvence nakon čega slijedi O- i N-glikozilacija te autoproteolitičko otcjepljenje pro-domene. Tako aktivirani protein se iz endoplazmatskog retikuluma potom translocira u Golgijevo tijelo gdje se progresivno glikozilira vezanjem molekula manoze α -1,3-glikozidnim vezama na postojeće O- i N-oligosaharidne lance (Wilcox i Fuller, 1991.).

Obzirom da u Scw4 proteinu postoje sekvence Arg-Arg/X ili Lys-Arg/X, pretpostavlja se da Kex2 proteaza sudjeluje i u njegovom procesiranju.

2.3.2. Uloga japsinskih proteaza u stanicama

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

Yps1, Yps2 i Yps3 proteini cijepaju proteine i peptide iza bazičnih aminokiselinskih ogranaka kao i Kex2 proteaza, ali japsini cijepaju proteine i na dibazičnim i na monobazičnim mjestima za razliku od Kex2. Radi toga, japsini prepoznaju i pojedinačne Arg i Lys ogranke.

Yps1 i Yps2 proteini identificirani su kao supresori nul-mutacija *KEX2* gena dok su Yps3 otkrili su Egel-Mitani i suradnici 1990. godine kada su tražili alternativu Kex2 proteinu koji nije bio efikasan u cijepanju proteina fuzioniranog za prekursor feromona α -faktora.

Japsini se, kao i ostali proteolitički enzimi, sintetiziraju kao projapsini odnosno u zimogenoj formi, koja se aktivira proteolizom karakteristične pro-regije na N-terminalnom dijelu sekvence u kiselom mediju pri $\text{pH} < 4$. U tim uvjetima dolazi do odbijanja pozitivnih naboja u pro-regiji, protoniranja ključnih aspartatnih ostataka u aktivnom mjestu pa time i pucanja ionskih interakcija i destabilizacije projapsina što u konačnici rezultira autoprotolizom te aktivacijom japsina.

Neki japsini ne provode autoproteolizu već se proteolitički cijepaju u prisustvu drugih proteolitičkih enzima, kao npr. β -sekretaza koja se aktivira djelovanjem furina (Bennett i sur., 2000.), međutim, aktivacija se provodi u istim uvjetima, pri $\text{pH} < 4$.

Pro-regija osigurava pravilno *in vivo* smatanje proteina te inhibira katalitičku domenu japsinskih proteaza čime je osigurana katalitička aktivnost tek nakon lokalizacije u staničnoj membrani ili stijenci (Van den Hazel i sur., 1993.). Osim pro-regije, japsinske proteaze sadrže katalitičku domenu koja može biti sastavljena od jednog ili dva dijela peptidnog lanca.

Yps1 protein između dijelova peptidnog lanca sadrži regiju u obliku petlje, tzv. „loop insertion“, koja podliježe proteolizi te time nastaju dva peptidna lanca međusobno povezana disulfidnim mostovima. Za razliku od Yps1, Yps3 ne sadrži petlju.

U aktivnom mjestu katalitičke domene svih japsinskih proteaza nalazi se konzervirana sekvenca, Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb, u kojoj se, između hidrofobnih ostataka (Xaa) i treonina te serina (Xbb), nalazi po jedan aspartatni animokiselinski ostatak ključan za njihovu aktivnost (Rawlings i Barrett, 2004.). U sekvenci japsina kvasca *Saccharomyces cerevisiae* također se nalazi i Ser/Thr bogata sekvenca koja je intenzivno O-glikozilirana, ali čija funkcija još uvijek nije poznata (Gagnon-Arsenault i sur., 2006.).

Njihova uloga još nije u potpunosti razjašnjena, ali je dosadašnjim ispitivanjima uočeno da sudjeluju u odgovoru stanice na stres uzrokovan promjenom temperature jer se ekspresija japsina povećala 12 puta prilikom povećanja temperature s 24°C na 37°C. Osim toga, otkriveno je i da *yps1Δyps2Δ* mutanti imaju izmijenjen udio polisaharida stanične stijenke što znači da japsini sudjeluju i u održavanju integriteta stanične stijenke.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- kvašćev ekstrakt i kvašćeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) – Biolife (Milano, Italija)
- histidin, uracil, leucin, triptofan, lizin – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- ECL-otopine za razvijanje blota – Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, USA)
- standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- amonijev persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, Triton X-100, β -merkaptotanol i N-dodecilsulfat (SDS) – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) – LKB Produkter AB (Bromma, Sweden)
- Ponceau S i polietilenglikol 4000 (PEG 4000) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- anti-HA-peroksidaza antitijela – Roche Diagnostics DmbH (Mannheim, Njemačka)

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

3.1.2. Sojevi kvasaca

U radu su korišteni laboratorijski sojevi kvasca prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Pregled korištenih laboratorijskih sojeva kvasca

Soj kvasca	Genotip
Y000 wt	Mat a, <i>his3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>met15</i> Δ , <i>ura3</i> Δ
Y000 + SCW4	Mat a, <i>his3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>met15</i> Δ , <i>ura3</i> Δ + pBG1805 SCW4-HA
Y000 + ΔV SCW4	Mat a, <i>his3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>met15</i> Δ , <i>ura3</i> Δ + ΔV pBG1805 SCW4-HA
Y000 + $\Delta 176$ SCW4	Mat a, <i>his3</i> Δ , <i>leu2</i> Δ , <i>met15</i> Δ , <i>ura3</i> Δ + $\Delta 176$ pBG1805 SCW4-HA

3.1.3. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca

Za submerzni uzgoj stanica kvasca korištena je selektivna YNB podloga. YNB podloga sastoji se od 6,7 g/L YNB (Yeast Nitrogen Base, bez aminokiselina), 2 g/L smjese aminokiselina, nukleotidnih baza i vitamina ("drop out") koja sadrži sve aminokiseline potrebne za rast kvasca osim onih preko kojih se vrši selekcija auksotrofnih sojeva te šećera ($\varphi = 0,02$) glukoze, rafinoze ili galaktoze (Sambrook i Russel, 2001.). Ovisno o auksotrofnosti soja u podlogu se dodaju histidin (80 mg/L), uracil (80 mg/L), triptofan (80 mg/L) i leucin (160 mg/L) sterilizirani autoklaviranjem.

Tablica 4. Smjesa aminokiselina, nukleotidnih baza i vitamina ("drop out"):

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

Krute hranjive podloge jednakog su sastava kao i tekuće, uz dodatak 15 g/L agara.

Hranjive podloge i otopine šećera steriliziraju se u autoklavu pri temperaturi od 121°C i tlaku od 1 atm.

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija staničnih stijenki kvasca

Za izolaciju je bilo potrebno uzgojiti kvasac u 50 mL YNB Leu⁻ tekuće podloge do gustoće suspenzije od 2 OD₆₀₀ jedinice/mL.

Stanice kvasca se odvoje od podloge centrifugiranjem na 3000 rpm tijekom 5 minuta nakon čega se talog ispere na način da se resuspendira u 20 mL destilirane vode te ponovno centrifugira. Ispiranje taloga ponovi se još jednom u destiliranoj vodi i jednom u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 8. Talog se zatim resuspendira u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 8 koji je zaostao u Falcon kiveti nakon odjeljivanja supernatanta. Resuspendirane stanice se prebace u Eppendorf kivetu, doda im se 2/3 volumena staklenih kuglica i stanice se razbijaju vortexiranjem tijekom 5 minuta. Nakon toga suspenzija se hladi 1 minutu na ledu pa ponovno razbija vortexiranjem kroz 5 minuta. Staklene kuglice se odvoje od stanica na način da se vrućom iglom probije dno Eppendorf kivete koja se zatim postavi u novu kivete i centrifugira 1 minutu na 8000 rpm. Stijenke se odvoje od intracelularnog sadržaja centrifugiranjem na 8000 rpm tijekom 1 minute nakon čega se supernatant baci, a talog stijenki se 4 puta ispere u 50 mM K-fosfatnom puferu pH 8.

3.2.2. Izolacija nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Talog izoliranih stijenki se resuspendira u 1 ml Laemmli pufera (50 mM Tris-HCl pufera pH 6.8, 2 mM EDTA III, 2% SDS-a, 0,001% boje bromfenol plavo i 5% β-merkaptetanola.) i kuha 10 minuta u vrijućoj vodenoj kupelji. Nakon toga se stijenke odvajaju od SDS ekstrakta centrifugiranjem na 8000 rpm tijekom 1 minute. SDS ekstrakt se odvoji u novu Eppendorf kivetu jer sadrži nekovalentno vezane proteine, a talog stijenki se ponovno resuspendira u 1 mL Laemmli pufera i kuha 10 minuta u vrijućoj kupelji. Stijenke se odvoje centrifugiranjem, a talog se ispere 4 puta u 50 mM K-fosfatnom puferu te jednom u destiliranoj vodi.

3.2.3. Izolacija kovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Kovalentno vezani proteini stanične stijenke izoliraju se tretmanom s NaOH koji kida esterske veze između γ -karboksilne skupine specifičnog ostatka glutaminske kiseline unutar karakteristične ponavljajuće sekvence te hidroksilne grupe glukoze β -1,3-glukana.

Nakon tretmana SDS-om i ispiranja u puferu, stijenke se isperu u destiliranoj vodi te resuspendiraju u određenom volumenu 30 mM NaOH tako da u 100 μ L suspenzije optička gustoća stijenki bude oko 75 OD₆₀₀ jedinica/mL, a zatim se inkubiraju na +4°C preko noći. Suspenzija se zatim centrifugira, a supernatant koji sadrži ekstrahirane proteine se odvoji.

3.2.4. SDS-elektroforeza po Laemmli-u

Gel za razdvajanje proteina SDS elektroforezom po Laemmli-u sastoji se od dva dijela, gela za sabijanje (gornji gel) i gela za separaciju (donji gel). 10%-tni gel za separaciju sadrži 10% akrilamida, 0,3% N, N' - metilenbisakrilamida, 0,1% SDS-a, 0,05% TEMED (katalizator polimerizacije) i 5% amonij-persulfata (APS, inicijator polimerizacije) u 5 M Tris-HCl puferu pH 8,8. Na pripremljenu otopinu se u tankom sloju nanese izopropanol koji sprječava oksidaciju pa ima važnu ulogu u polimerizaciji gelova za SDS elektroforezu jer je kisik prirodni inhibitor polimerizacije gela. Nakon što donji gel polimerizira, sav se izopropanol ukloni pomoću filter papira kako bi proteini mogli putovati iz gela za sabijanje u gel za separaciju. Zatim se na gel za razdvajanje nanosi gel za sabijanje koji se sastoji od 5% akrilamida, 0,12% N, N' - metilenbisakrilamida, 0,1% SDS-a, 0,075% N, N, N', N'- tetrametiletildiamina (TEMED) i 7,5% amonij-persulfata u 0,5 M Tris-HCl puferu pH 6,8.

Uzorci za SDS-elektroforezu proteina pripremljeni su dodatkom 5 μ L pufera za uzorke za elektroforezu po Laemmli-u u 20 μ L SDS odnosno NaOH ekstakta. Pufer za uzorke sastoji se od 50 mM Tris-HCl pufera pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2% SDS-a, 10% glicerola, 0,001% boje bromfenol plavo i 5% β -merkaptioetanol.

Elektroforeza je provedena u 25 mM Tris-glicin puferu pH 6,8 s 0,1% SDS-a pri naponu od 180 V.

3.2.5. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu i njihovo specifično obilježavanje

Nakon provedene SDS-elektroforeze po Laemmli-u, proteini se iz poliakrilamidnog gela prenose na nitroceluloznu membranu metodom Western blot koja obuhvaća elektroforetski prijenos razdvojenih proteina na membranu te detekciju obilježenih proteina HA-antitijelima.

Po završetku elektroforeze, gel se stavi u „sendvič“ za blot koji se slaže pod vodom da između slojeva ne uđe zrak na način da se redom stave plastični okvir, spužva, filter papir, gel, nitrocelulozna membrana, filter papir, spužva, plastični okvir. Tako pripremljeni „sendvič“ se postavi u za to namijenjen uređaj (Sigma Aldrich) tako da je tijekom prijenosa gel okrenut prema negativnoj, a membrana prema pozitivnoj elektrodi kako bi negativno nabijeni proteini putovali iz gela i zadržavali se na membrani.

Prijenos na membranu provodi se u natrij karbonatnom puferu koji se sastoji od 10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃ i 20% metanola pri stalnoj jakosti struje od 400 mA tijekom 90 minuta. Nakon 90 minuta se nitroceluloza boja Ponceau S bojom koja sadrži 0,1% Ponceau S u 5%-tnoj octenoj kiselini. To bojanje dovodi do pojave vrpce standarda koji se označe tupom grafitnom olovkom te se nitrocelulozna membrana potpuno odboja ispiranjem destiliranom vodom. Nitrocelulozna membrana se inkubira na tresilici 60 minuta na sobnoj temperaturi u 10 mL tzv. pufera za blokiranje (50 mM TRIS-HCl pufer pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) sa 1% obranog mlijeka. Nakon blokiranja membrane, pufer za blokiranje se odlije, a nitroceluloza se ispire puferom za blokiranje 3 puta po 5-10 minuta na tresilici. Na tako pripremljenu nitroceluloznu membranu nanosi se 0,5 mL Western Blotting Luminol Reagent sistema za razvijanje koji se priprema na način da se otopine A i B pomiješaju u omjeru 1:1. Kemiluminiscencija proteina zabilježena je na RTG-filmu pri čemu je ekspozicija filma trajala tijekom noći.

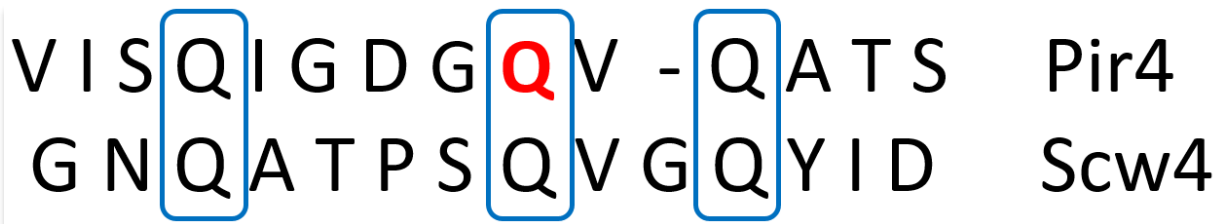
4.REZULTATI

Dosadašnjim proučavanjem sekvence Scw4 proteina kao i ispitivanjem njegove uloge i načina vezanja, otkrivena su mjesta za procesiranje Kex2 proteazom te japsinskim proteazama u proteinu Scw4 (Slika 3.)

```
MRLSNLIASA SLLSAATLAA PANHEHKDKR AVVTTTVQKQ TTIIVNGAAS
TPVAALEENA VVNSAPAAAT STTSSAASVA TAAASSSENN SQVSAASPA
SSSAATSTQS SSSSQASSSS SSGEDVSSFA SGVRGITYTP YESSGACKSA
SEVASDLAQL TDFPVIRLYG TDCNQVENVF KAKASNQKVF DGVNTIKSAV
ESYGSWDDVT TVSIGNELVN GNQATPSQVG QYIDSGRSAL KAAGYTGPVV
SVDTFIAVIN NPELCDYSY MAVNAHAYFD KNTVAQDSGK WLLEQIQRVW
TACDGKKNVV ITESGWPSKG ETYGVAVPSK ENQKDAVSAI TSSCGADTFE
FTAFNDYWKA DGAYGVEKYW GILSNE
```

Slika 3. Sekvenca Scw4 proteina. Plavom bojom prikazana je signalna sekvenca koja Scw4 protein upućuje u sekretorni put. Crvenom bojom prikazano je mjesto procesiranja **Kex2** proteazom, a narančastom bojom mjesto procesiranja **japsinskim proteazama**. Podcrtani dio sekvencije deletiran je u **Δ176Scw4 proteinu** dok je u **ΔVScw4** deletiran dio koji je označen zelenom bojom.

Osim toga, izolacijom Scw4 proteina iz stanične stijenke utvrđeno je da se u stijenkama veže i kovalentnim i nekovalentnim interakcijama jer je proteinska vrpca, koja molekularnom masom od 67 kDa odgovara Scw4 proteinu, bila vidljiva i nakon kuhanja stijenke u otopini SDS-a uz dodatak β-merkaptoetanolu i nakon tretmana stijenke s NaOH (Teparić i sur., 2010.). Iako je poznato da se može vezati kovalentno, još uvijek se postavljaju pitanja koji dio sekvence gena *SCW4* kodira za regiju koja Scw4 proteinu omogućuje kovalentno povezivanje, kakvom vrstom veze se veže te koji je mehanizam nastajanja te veze. Proučavanjem njegove proteinske sekvence, uočena je regija koja je po broju i rasporedu glutaminskih ostataka slična repetitivnoj sekvenci PIR proteina preko koje se PIR proteini u staničnu stijenkama vežu kovalentno. Radi ispitivanja načina vezanja Scw4 proteina su u prijašnjem istraživanju konstruirani sljedeći mutanti: genu *SCW4* je PCR metodom „megapočetnice“ i „overlap extension“ deletiran dio koji kodira za prvih 176 aminokiselina na N-terminalnom dijelu proteina odnosno dio koji kodira za 16 aminokiselina u središnjem dijelu proteina koje su slične repetitivnoj sekvenci PIR proteina (Slika 3. i Slika 4.). U ovom radu će se, prvotno dobivenim mutantima, ispitati način vezanja Scw4 proteina u staničnu stijenkama kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

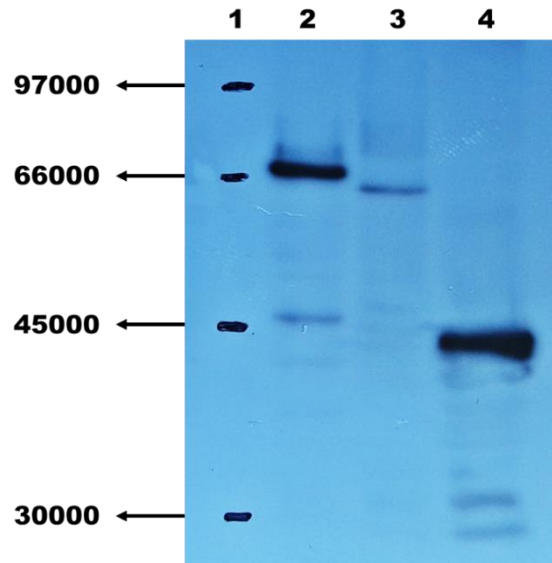


Slika 4. Usporedba dijelova proteinskih sekvenci Pir4 i Scw4 proteina.

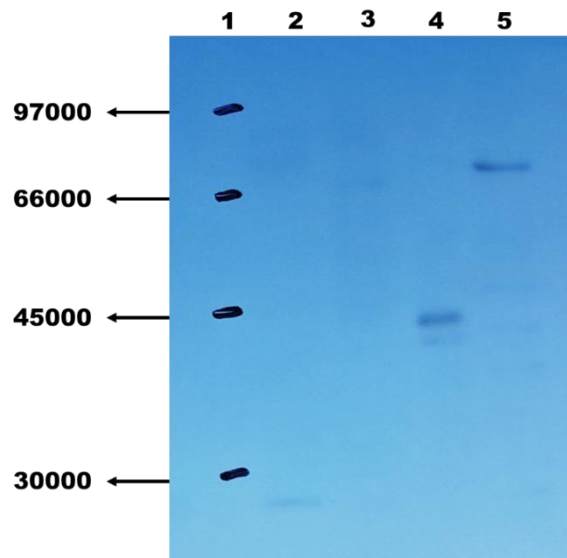
Plavim pravokutnicima označeni su glutaminski ostaci koji PIR proteinima osiguravaju kovalentno povezivanje u staničnu stijenku, a čiji je raspored sličan u Scw4 proteinu. Crvenom bojom označen je **ključni glutaminski ostatak** za kovalentno povezivanje PIR proteina.

U prethodnom istraživanju konstruirani su plazmidi koji su sadržavali prethodno navedene mutirane oblike gena *SCW4*. Tim plazmidima su transformirani kvasci koji su uzgajani prvo na krutoj, a zatim i u YNB selektivnim tekućim podlogama pri pH4 i pri pH7 do gustoće ~2 OD₆₀₀ jedinice/ml. Stijenke i proteini staničnih stijenki su izolirani kuhanjem u SDS-u uz dodatak β-merkaptetanola te tretmanom s NaOH nakon čega je provedena SDS gel elektroforeza. Izolirani su proteini zatim detektirani Western blot metodom kako je opisano u poglavlju „Materijali i metode“.

4.1. Provjera načina vezanja mutiranih oblika Scw4 proteina u staničnoj stijenci kvasca uzgajanog pri pH4

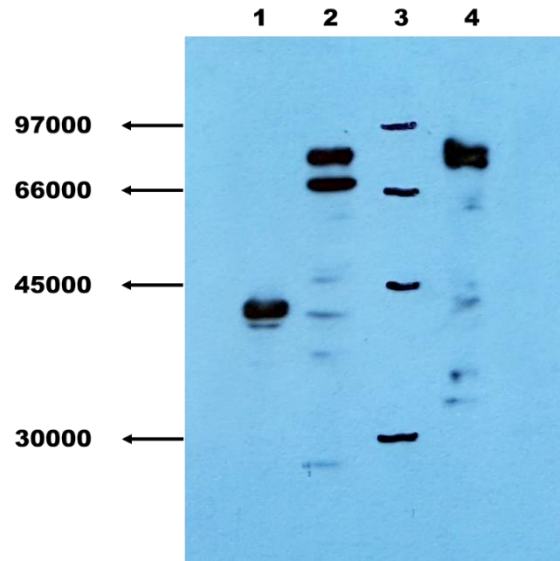


Slika 5. Provjera nekovalentnog vezanja nativnog i mutiranih oblika Scw4 proteina u staničnoj stijenci kvasca uzgajanog na pH4. Proteini u SDS ekstraktu su nakon izolacije iz stanične stijenke analizirani Western blot metodom pomoću antitijela na –HA oznaku. Linija: **1.** standardi; **2.** nativni Scw4; **3.** mutirani oblik ΔV Scw4; **4.** mutirani oblik $\Delta 176$ Scw4.

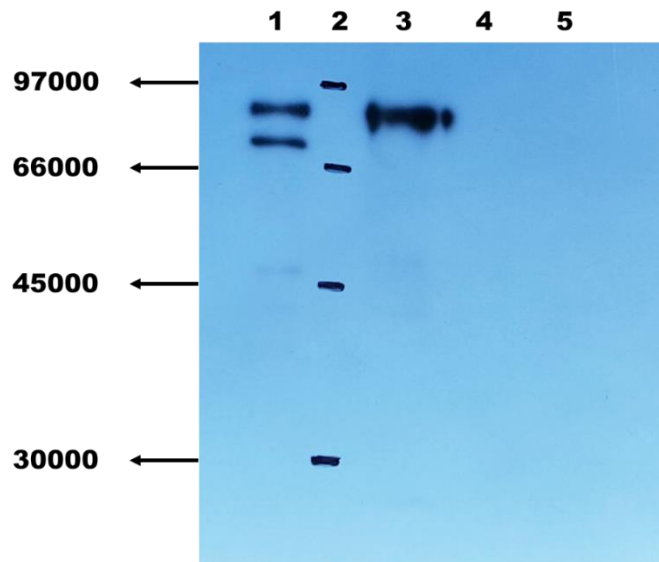


Slika 6. Provjera kovalentnog vezanja nativnog i mutiranih oblika Scw4 proteina u staničnoj stijenci kvasca uzgajanog na pH4. Proteini u NaOH ekstraktu su nakon izolacije iz stanične stijenke analizirani Western blot metodom pomoću antitijela na –HA oznaku. Linija: **1.** standardi; **2.** nativni Scw4; **3.** mutirani oblik ΔV Scw4; **4.** mutirani oblik $\Delta 176$ Scw4; **5.** kontrola - nativni Scw4 iz SDS ekstrakta.

4.2. Provjera načina vezanja mutiranih oblika Scw4 proteina u staničnoj stijenci kvasca uzgajanog pri pH7



Slika 7. Provjera nekovalentnog vezanja mutiranih oblika Scw4 proteina u staničnoj stijenci kvasca uzgajanog na pH7. Proteini u SDS-ekstraktu su nakon izolacije iz stanične stijenke analizirani Western blot metodom pomoću antitijela na -HA oznaku. Linija: 1. mutirani oblik $\Delta 176$ Scw4; 2. nativni Scw4; 3. standardi; 4. mutirani oblik ΔV Scw4.



Slika 8. Provjera kovalentnog vezanja mutiranih oblika Scw4 proteina u staničnoj stijenci kvasca uzgajanog na pH7. Proteini u NaOH ekstraktu su nakon izolacije iz stanične stijenke analizirani Western blot metodom pomoću antitijela na -HA oznaku.

Linija: 1. kontrola - nativni Scw4 iz SDS ekstrakta; 2. standardi; 3. nativni Scw4; 4. mutirani oblik ΔV Scw4; 5. mutirani oblik $\Delta 176$ Scw4.

5.RASPRAVA

Saccharomyces cerevisiae je kvasac iz carstva *Fungi* kojem pripadaju i višestanični organizmi poput viših gljiva te plijesni. To je robustan kvasac koji ima visoku učinkovitost fermentacije, brzog rasta i korištenja šećera. Osim toga, tolerantan je na visoke koncentracije etanola i niske razine kisika te je aktivan u kiselom okruženju. Radi navedenih obilježja, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* predstavlja idealan organizam za proučavanje različitih biokemijskih puteva unutar eukariotskih stanica. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* sadrži dvoslojnu staničnu stijenku koja čini gotovo 30% suhe tvari stanice, a omogućuje mu preživljavanje u stresnim uvjetima te mu daje čvrstoću i određuje oblik. Unutarnji je sloj građen od polisaharida β -1,3-glukana i β -1,6-glukana te hitina koji određuju osmotsku i mehaničku stabilnost stanice (Mrša i sur., 1997.). Vanjski sloj stanične stijenke građen je od manoproteina čija uloga nije još u potpunosti razjašnjena, ali se niti jedan od dosad analiziranih i identificiranih proteina pojedinačno nije pokazao esencijalnim za rast stanica. Pretpostavlja se da manoproteini sudjeluju u pregradnjama stijenke tijekom staničnog ciklusa, određuju površinska svojstva stanice kvasca te utječu na poroznost i transport molekula iz periplazmatskog prostora u stanicu (De Nobel i sur., 1990.). Poznato je i da se proteini stijenke s glukanskim slojem stanične stijenke vežu kovalentnim i nekovalentnim interakcijama pa se prema tome iz stijenke izoliraju različitim metodama. Grupu kovalentno vezanih proteina čine tzv. PIR (Proteins with Internal Repeats) proteini koji se iz stanične stijenke izoliraju inkubacijom stijenki u 30 mM NaOH na +4°C (Mrša i sur., 1997.) te tzv. GPI proteini koji se izoliraju djelovanjem enzima β -1,3- i β -1,6-glukanaza (Roy i sur., 1991.). PIR proteini se u staničnoj stijenci kvasca povezuju esterskom vezom između γ -karboksilne grupe glutaminske kiseline u ponavljajućem motivu proteina i hidroksilne skupine glukoze β -1,3-glukana (Ecker i sur., 2006). Ponavljajuće sekvence PIR proteina su locirane u N-terminalnom dijelu proteina, a kod različitih članova obitelji se ponavljaju od 1 do 10 puta. GPI grupu proteina čini dvanaest proteina koji se s β -1,6-glukanom stanične stijenke povezuju preko ostatka GPI (glikozilfosfatidil-inozitolnog) sidra.

Nekovalentno vezani proteini izoliraju se kuhanjem stijenki u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptioetanolu (Mrša i sur., 1997.) ili podvrgavanjem stanica tretmanu s 2 mM ditiotreitolum na 4°C tijekom noći (Cappellaro i sur., 1998.) pri čemu dobiveni ekstrakt, osim nekovalentno vezanih proteina, sadrži i proteine koji su u staničnoj stijenci vezani disulfidnim mostovima. Ti proteini pretežito imaju glikozidaznu ili transglikozidaznu aktivnost (Goldman i sur., 1995.).

Scw4 protein je protein koji je u početku bio detektiran te okarakteriziran kao nekovalentno vezani protein stanične stijenke, ali je, daljnjim istraživanjima, uočeno da nakon disrupcije sva 4 *PIR* gena, te izolacije proteina iz stijenki tako dobivenih mutanata, u NaOH ekstraktu zaostaje proteinska vrpca veličine 67 kDa koja odgovara veličini Scw4 proteina. Dobiveni je rezultat potaknuo daljnja ispitivanja vezanja Scw4 proteina u staničnu stijenku. U daljnjim je istraživanjima disruptiran *SCW4* gen u četverostrukom *pir* mutantu nakon čega u NaOH ekstraktu više nije bilo proteinske vrpce veličine 67 kDa. Time je potvrđeno da se Scw4 u staničnu stijenku veže na dva načina, i kovalentnim i nekovalentnim interakcijama (Teparić i sur., 2010.), ali još nije poznato kojom vrstom veze, kojim mehanizmom niti koji je dio sekvence proteina odgovoran za njegovo kovalentno povezivanje. Obzirom da je način kojim se kovalentno vezana frakcija Scw4 iz stijenke može izolirati jednak načinu izolacije PIR proteina, pretpostavlja se da je i način povezivanja sličan. Usporedbom sekvenci Scw4 i već karakteriziranog Pir4 proteina, pronađen je dio Scw4 proteina sličan karakterističnoj ponavljajućoj sekvenci koja omogućuje kovalentno povezivanje PIR proteina (Slika 4.) zbog čega smo pretpostavili da bi ta sekvenca mogla biti odgovorna za kovalentno povezivanje Scw4 proteina. Radi te su pretpostavke, u prethodnom istraživanju, konstruirani mutirani oblici gena *SCW4* u kojima je deletirana regija koja kodira za tu sekvencu (konstrukt $\Delta VScw4$) odnosno za 176 N-terminalnih aminokiselina (konstrukt $\Delta 176Scw4$). Dobivenim su konstruktima zatim transformirane stanice kvasca kako bi se, u ovom radu, detaljno ispitaio utjecaj unesenih mutacija na kovalentno vezanje proteina Scw4 u staničnu stijenku kao i utjecaj pH na vezanje i procesiranje mutiranih oblika Scw4 proteina. U tu je svrhu transformirani kvasac uzgajan na selektivnim YNB podlogama, pri pH 4 i pri pH7, a nakon uzgoja transformiranog kvasca uslijedilo je razbijanje stanica te izolacija stijenki i proteina staničnih stijenki. Nevalentno vezani proteini su izolirani kuhanjem stijenki u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptetanola pri čemu je provedena višestruka izolacija kuhanjem u velikom volumenu pufera te višestruko ispiranje stijenki u 50 mM K-fosfatnom puferu između kuhanja kao što je opisano u poglavlju „Materijali i metode“. Time je osigurano da su proteini koji su detektirani u NaOH ekstraktu zaista kovalentno vezani proteini, a ne zaostali nekovalentno vezani proteini. Nakon kuhanja su stijenke isprane u 50 mM K-fosfatnom puferu te u destiliranoj vodi, a zatim su preko noći bile tretirane 30 mM NaOH kako bi se izolirali i kovalentno vezani proteini kao što je opisano u poglavlju „Materijali i metode“. Izolirani proteini razdvojeni su SDS elektroforezom po Laemmli-u nakon čega su preneseni na nitroceluloznu membranu metodom Western blot te detektirani antitijelima na –HA oznaku.

Rezultati Western blot analize proteina u NaOH ekstraktu, izoliranih iz kvasaca uzgajanih pri pH4 (Slika 6.), pokazali su da proteinska vrpca postoji jedino u stijenci kvasca u kojem se eksprimira tzv. $\Delta 176\text{Scw4}$ dok vrpce nativnog Scw4 proteina i $\Delta V\text{Scw4}$ nema. Poznato je da se nativni Scw4 protein veže kovalentnim interakcijama te da sadrži mjesta za djelovanje proteolitičkog enzima Kex2 i japsinskih proteaza koji se aktiviraju pri pH4. Kako su proteaze aktivne, dolazi do procesiranja Scw4 proteina te u stijenci prevladava manja, procesirana forma proteina, koja se ne veže kovalentno. Stoga su rezultati dobiveni s nativnim oblikom Scw4 u skladu s prethodno dobivenim rezultatima te ih potvrđuju. Nadalje, i u SDS i u NaOH ekstraktima su vidljive i odgovarajuće razlike u molekulskoj masi nativnog i mutiranih oblika proteina. Molekulska masa proteina $\Delta V\text{Scw4}$ proteina je nešto manja od nativnog Scw4 što je očekivano jer je $\Delta V\text{Scw4}$ od nativnog oblika Scw4 proteina kraći za samo 16 aminokiselinskih ostataka. S druge strane, molekulska masa proteina $\Delta 176\text{Scw4}$ znatno je različita što je također u skladu s očekivanjima jer je $\Delta 176\text{Scw4}$ manji za 176 aminokiselina.

Rezultati Western blot analize proteina izoliranih iz kvasaca uzgajanih pri pH7 (Slika 7. i Slika 8.) razlikuju se od onih izoliranih iz kvasaca uzgajanih na pH4. U NaOH ekstraktu pri pH7 je vidljiva vrpca nativnog Scw4 proteina dok mutiranih oblika $\Delta 176\text{Scw4}$ i $\Delta V\text{Scw4}$ nema. Rezultati dobiveni za nativni oblik Scw4 proteina su u skladu s očekivanjima budući da pri pH7 Kex2 i japsinske proteaze nisu potpuno aktivne te zbog toga ne dolazi do potpunog procesiranja nativnog oblika Scw4 proteina pa je u NaOH ekstraktu vidljiva veća, neprocesirana forma. Analiza molekulskih masa nekovalentno vezanih proteina izoliranih iz kvasaca uzgajanih pri pH7 pokazala je rezultate jednake onima dobivenim pri pH4.

Usporedbom SDS ekstrakata nativnog oblika Scw4 proteina i mutiranog oblika $\Delta V\text{Scw4}$ proteina izoliranih iz kvasaca uzgajanih na različitim pH vrijednostima, vidljivo je da je intenzitet procesirane i neprocesirane vrpce na pH7 podjednak, dok na pH4 prevladava procesirana forma što je u skladu s očekivanjima radi djelovanja proteolitičkih enzima. Međutim, u ekstraktima proteina $\Delta 176\text{Scw4}$ prisutna je samo jedna vrpca kao rezultat delecije dijela gena koji kodira za N-terminalni dio proteina u kojem se nalaze mjesta za procesiranje proteolitičkim enzimima Kex2 i japsinskim proteazama.

Prema dobivenim se rezultatima može pretpostaviti da je za kovalentno povezivanje Scw4 proteina u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae* odgovorna regija koja je po broju i rasporedu glutaminskih ostataka slična regiji pronađenoj u Pir4 proteinu koja je zaslužna za njegovo kovalentno povezivanje. Nadalje, može se zaključiti da kovalentno vezanje ovisi o pH vrijednosti budući da su rezultati dobiveni za nativni oblik Scw4 i $\Delta 176$ Scw4 mutant različiti ovisno o pH pri kojem je uzgajan kvasac. U daljnjim istraživanjima potrebno je istražiti koja je aminokiselina iz ΔV dijela sekvence odgovorna za kovalentno vezanje te dodatno ispitati utjecaj pH na mehanizam vezanja.

6.ZAKLJUČCI

Oblici proteina Scw4 u kojima je deletirano prvih 176 aminokiselina na N-terminalnom kraju te 16 aminokiselina u središnjem dijelu proteina se uspješno eksprimiraju, transportiraju i vežu u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Mutirani oblici proteina Scw4 pokazuju očekivane razlike u molekulskoj masi u odnosu na nativni Scw4 protein.

Vrpca $\Delta VScw4$ proteina nije vidljiva u NaOH ekstraktu proteina stijenki, bez obzira na pH pri kojem je uzgajan kvasac, što znači da deletirana regija osigurava kovalentno povezivanje Scw4 proteina u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Vrpca $\Delta 176Scw4$ proteina je vidljiva u NaOH ekstraktu proteina stijenki kvasca uzgajanog pri pH4, dok je nakon uzgoja kvasca pri pH7 nije moguće detektirati. Na osnovu ovog rezultata se može pretpostaviti da pH osim na procesiranje Scw4 proteina na neki način utječe i na sam mehanizam kovalentnog vezanja ovog proteina u stijenku.

7.POPIS LITERATURE

1. **Aimanianda V., Clavaud C., Simenel C., Fontaine T., Delepierre M., Latgé J.** (2009.) Cell Wall β -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 13401-13412
2. **Bader O., Kraukel Y., Hube B.** (2008.) Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiology* **8**:116
3. **Bennett B.D., Denis P., Haniu M., Teplow D.B., Kahn S., Louis J.C., Citron M., Vassar R.** (2000.) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's β -secretase. *The Journal of Biological Chemistry*, **275** : 37712–37717
4. **Cabib E., Roh D.H., Schmidt M., Crotti L.B., Varma A.** (2001.) The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **276** : 19 679–19 682.
5. **Cappellaro C., Mrša V., Tanner W.** (1998.) New Potential Cell Wall Glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Involvement in Mating. *The Journal of Bacteriology*, **180** : 5030–5037
6. **De Nobel J.G., Klis F.M., Priem J., Munnik T.** (1990.) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 491–499
7. **Douglas L.M., Li L., Yang Y., Dranginis A.M.** (2007) Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryot. Cell* **6** : 2214–2221.
8. **Ecker M., Deutzmann R., Lehle L., Mrša V., Tanner W.** (2006.) Pir Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* Are Attached to β -1,3-Glucan by a New Protein-Carbohydrate Linkage. *The Journal of Biological Chemistry*, **281** : 11523-11529.
9. **Egel-Mitani M., Flygenring H.P., Hansen M.T.** (1990.) A novel aspartyl protease allowing KEX2-independent MF α propheromone processing in yeast. *Yeast*, **6** : 127-37
10. **Fuller R.S., Brake A., Thorner J.** (1989.) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86** : 1434-1438
11. **Gagnon-Arsenault I., Tremblay J., Bourbonnais Y.** (2006.) Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function, *Federation of European Microbiological Societies*, **6** : 966–978

12. **Germain D., Dumas F., Vernet T., Rourbonnais Y., Thomas D.Y., Boileau G.** (1992.) The pro-region of the Kex2 endoprotease of *Saccharomyces cerevisiae* is removed by self-processing. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **299** : 283–286
13. **Goldman R.C., Sullivan P.A., Zakula D., Capobianco J.O.** (1995.) Kinetics of β -1,3 Glucan Interaction at the Donor and Acceptor Sites of the Fungal Glucosyltransferase Encoded by the *BGL2* Gene. *European Journal of Biochemistry*, **227** : 372–378
14. **Heiman M.G., Engel A., Walter P.** (2007), The Golgi-resident protease Kex2 acts in conjunction with Prm1 to facilitate cell fusion during yeast mating. *The Journal of Cell Biology*. **176** : 209-222.
15. **Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S.** (2002.) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **26**: 239-256
16. **Lesage G., Bussey H.** (2006.) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **70** : 317-43.
17. **Levin D.E.** (2011.) Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The Cell Wall Integrity Signaling Pathway. *Genetics* **189** : 1145– 1175
18. **Lipke P.N., Ovalle R.** (1998.) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *The Journal of Bacteriology*. **180** : 3735-3740.
19. **Mrša V., Seidl T., Gentzsch 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
20. **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. *Biochem. J.* **339** : 407-411.
21. **Olsen V., Cawley N.X., Loh Y.P.** (1998.), Yapsin1: Structure, Biosynthesis, and Specificity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **436** : 315-319
22. **Orlean P.** (2012.), Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics*, **192** : 775–818
23. **Qadota H., Python C.P., Inoue S.B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., Watanabe T., Levin D.E., Ohya Y.** (1996.) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272** : 279-81
24. **Rawlings N.D., Barrett A.J.** (2004.) Introduction: aspartic peptidases and their clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, **2**: 3–12. Elsevier, London.

25. **Reynolds T.B., Fink G.R.** (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291** : 878–881.
26. **Roh D.H., Bowers B., Riezman H., Cabib E.** (2002.) Rho1p mutations specific for regulation of $\beta(1-3)$ glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. *Molecular Microbiology* **44** : 1167–1183
27. **Roy A., Fen Lu C., Marykwas D.L., Lipke P.N., Kurjan J.** (1991.) The AGA1 Product Is Involved in Cell Surface Attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Adhesion Glycoprotein α -Agglutinin. *Molecular and Cellular Biology*, **11** : 4196-4206
28. **Sambrook J., Russell D.W.** (2001.) Molecular cloning: a laboratory manual, 4.izd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
29. **Shaw J.A., Mol P., Bowers B., Silverman S.J., Valdivieso M.H., Durdn A., Cabib E.,** (1991.) The Function of Chitin Synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *The Journal of Cell Biology*, **114** : 111-123
30. **Šestak S., Hagen I., Tanner W., Strahl S.** (2004.) Scw10, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology* **150** : 3197–320
31. **Teparić R., Stuparević I., Mrša V.** (2007.) Binding assay for incorporation of alkali-extractable proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **24** : 259–266.
32. **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
33. **Van den Hazel H.B., Kielland-Brandt M.C., Winther J.C.** (1993) The Propeptide Is Required for in Vivo Formation of Stable Active Yeast Proteinase A and Can Function Even When Not Covalently Linked to the Mature Region. *The Journal of Biological Chemistry*, **268** : 18002-18007
34. **Watanabe D., Utsugi T., Minemura M., Hirata A., Abe M., Ohya Y.** (2002.) Movement of yeast 1,3- β -glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes to Cells* **7**: 1-9
35. **Wilcox C.A., Fuller R.S.** (1991.) Posttranslational Processing of the Prohormone-cleaving Kex2 Protease in the *Saccharomyces cerevisiae* Secretory Pathway. *The Journal of Cell Biology*, **115** : 297-307