

Uvođenje delecije u gen Scw4 upotrebom PCR metode "megapočetnice"

Grubišić, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:222107>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



1. UVOD

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je zbog svojih brojnih poželjnih karatkeristika idealan modelni organizam za proučavanje brojnih biokemijskih procesa u stanicama. Ovaj jednostanični eukariot odlikuje jednostavan životni ciklus, kratko generacijsko vrijeme te izmjene haploidne i diploidne generacije. Stanična stijenka kvasca ekstracelularna je struktura koja stanici pruža mehaničku čvrstoću, daje joj oblik, te osigurava osmotsku stabilnost (Smith i sur., 2000), a omogućuje stanici komunikaciju sa okolinom. Staničnu stijenku sačinjavaju dva sloja, prvi je građen od hitina i glukana i pruža stanici mehaničku čvrstoću, a drugi sloj je građen od manoproteina kojih je do sada u stijenci pronađeno više od 30. Neki od manoproteina imaju glikozidaznu i transglikozidaznu aktivnost, ali funkcija većine manoproteina stijenke i dalje je nepoznata. Proteini mogu u staničnu stijenku biti vezani nekovalentno i kovalentno. Nekovalentno vezani proteini izoliraju se pomoću vrućeg SDS-a u reducirajućim uvjetima (Mrša i sur., 1997), a kovalentno vezani proteini se mogu izolirati na dva načina. Prvi je pomoću enzima glukanaza kojima se izoliraju proteini vezani preko ostatka GPI sidra. Drugi način izolacije je ekstrakcijom pomoću 30mM NaOH kojim se izoliraju PIR proteini vezani za glukan stijenke esterskom vezom osjetljivom na hidrolizu pomoću NaOH.

Jedan od najzastupljenijih proteina stanične stijenke je protein Scw4p čija uloga je i dalje nepoznata. Zbog visokog stupnja homologije s glukanazama viših biljaka i funga pretpostavlja se da ima sličnu enzimatsku aktivnost, no katalitička aktivnost *in vitro* nije dokazana. Iako se najprije svrstavao u nekovaleno vezane proteine koji se iz stijenke mogu izolirati vrućim SDS-om, pronađeno je kako je određen dio Scw4p vezan i kovalentno te da se može izolirati pomoću 30mM NaOH (Teparić i sur., 2007). Budući da se izolira na isti način kao i PIR proteini pretpostavka je bila kako je mehanizam vezanja također jednak. Naime, PIR proteini sadrže tzv. PIR ponavljajući motiv (dio sekvence) koji je odgovoran za kovalentno vezanje u staničnu stijenku. Takav motiv nije pronađen u genu *SCW4*, no pronađen je dio sekvence koji je sličan tom motivu. Stoga je pretpostavljeno da bi ta sekvenca mogla biti odgovorna za kovalentno vezanje Scw4p u stijenku kvasca. Kako bi se ova pretpostavka ispitala u ovom radu se uvodi mutacija u gen *SCW4* pomoću PCR metode „megapočetnice“. Mutaciju sačinjava delecija regije od 48 pb koja sadrži spomenutu sekvencu koju smo na ta način izbacili iz gena. Nakon toga je provedena izolacija mutiranog i nativnog oblika Scw4p iz stanične stijenke na dva načina: pomoću SDS-a i NaOH s ciljem potvrde dvojakog načina vezanja proteina Scw4p u staničnu stijenku kvasca i potencijalne uloge deletiranog dijela sekvence u kovalentnom vezanju ovog proteina u stijenku.

2.LITERATURNI PREGLED

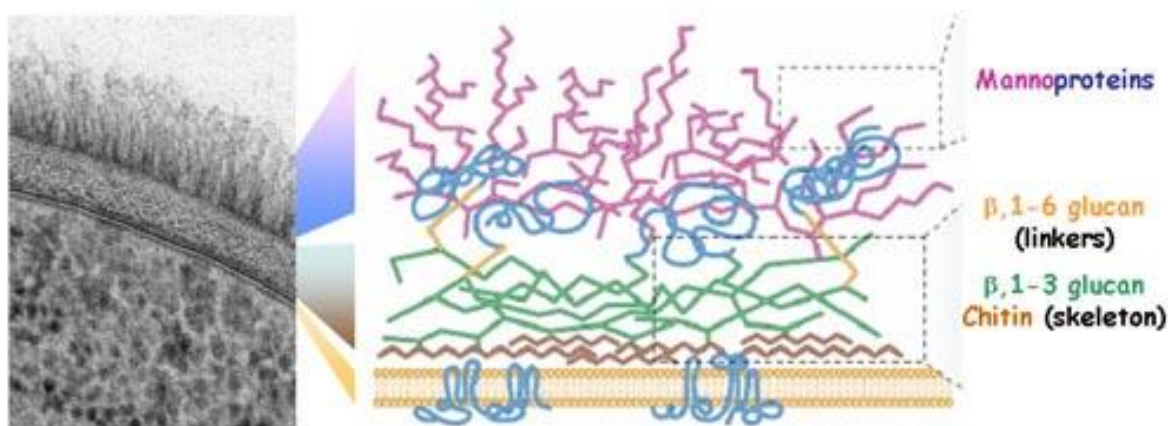
2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Jednostanični eukariot *S. cerevisiae* svrstan u carstvo gljiva, od davnina se koristi u pekarstvu i proizvodnji alkohola, a zbog svojih poželjnih karakteristika se često koristi i za istraživanje životnih procesa eukariotskih stanica. Idealan je modelni organizam za eksperimentalna istraživanja biokemijskih procesa eukariotskih stanica jer ga karakterizira jednostavan životni ciklus, kratko generacijsko vrijeme, jeftin te jednostavan uzgoj kao i laka genetička manipulacija.

2.2 Građa stanične stijenke kvasca

Stanice kvasca *S. cerevisiae* obavlja čvrsta ali ujedno i elastična struktura, stanična stijenka, koja ima vrlo važnu ulogu u stanici. Stanična stijenka kvasca ekstracelularna je struktura koja stanici pruža mehaničku čvrstoću, daje joj oblik, te osigurava osmotsku stabilnost (Smith i sur., 2000) budući da predstavlja selektivnu barijeru kroz koju različite molekule ulaze i izlaze iz stanice (Klis,1994; Cid i sur.,1995). Također ima ulogu i u komunikaciji stanice sa okolinom, a iako je čvrsta ujedno je i fleksibilna struktura što je veoma bitno za mnoge funkcije kao što su razmnožavanje, pupanje, transport i interakcija među stanicama.

Stanična stijenka čini oko 20 % suhe tvari stanice, a u svom sastavu sadrži do 90 % ugljikohidrata i oko 10% proteina (Fleet,1991; Ruiz-Herrera,1992; Orlean,1997). Građu stanične stijenke čine polisaharidni polimeri: glukan, hitin i manoproteini kao što je prikazano na Slici 1. Elektronska mikografija pokazuje njenu dvoslojnu strukturu pri čemu se na unutrašnji sloj izgrađen od umreženih polisaharida nadograđuje zaštitni vanjski sloj od manoproteina. Unutarnji sloj izgrađen od β -1,3-glukana (50% mase stijenke), β -1,6-glukana (5% mase stijenke) i hitina (1-2% mase stijenke), odgovoran je za mehaničku i osmotsku stabilnost (Teparić, 2005). Vanjski sloj sastavljen od manoproteina (35% mase stijenke) određuje površinska svojstva stijenke, a ujedno ima i protektivnu ulogu.



Slika1. Shematski prikaz građe stanične stijenke (www.abdn.ac.uk. Pristupljeno 25.lipnja.2015.)

2.3. POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE

Ugljikohidratni dio stanične stijenke (90%) čine tri polisaharidna polimera: glukan, hitin i manan

GLUKAN

Sa udjelom većim od 50% mase stijenke, glukan je najzastupljeniji polisaharid stanične stijenke kvasca. Stanična stijenka sadrži dvije vrste glukana: β -1,6-glukan i β -1,3-glukan koji čini gotovo polovicu mase stanične stijenke. Glukan čini unutarnji sloj stanične stijenke, koji setakođer sastoji od dva dijela: vlaknastog unutarnjeg dijela i amorfnog vanjskog sloja. Unutarnji vlaknasti sloj izgrađuje β -1,3-glukan zajedno s hitinom i tako stijenci daje čvrstoću i oblik. Molekule β -1,3-glukana izgrađene su od oko 1500 glukoznih jedinica međusobno povezanih β -1,3-glikozidnom vezom, a samo 50-ak glukoznih ostataka je uključeno u grananje preko C6 atoma. β -1,3-glukan kovalentno je vezan na ostale stanične komponente tako da su njegovi nereducirajući krajevi unakrsno vezani s reducirajućim krajevima hitinskih lanaca preko beta-1,4-glikozidne veze (Lesage i Bussey, 2006). Manje zastupljen glukan sa udjelom od samo 5% u stijenci, koji izgrađuje vanjski amorfnu sloj, je vodotopljivi razgranati polimer β -1,6-glukan. Sastavljen je od oko 140 glukoznih ostataka povezanih β -1,6-glikozidnom vezom. Kovalentno je vezan na β -1,3-glukan, hitin i manoproteine i time povezuje sve komponente stanične stijenke pa utječe na strukturu i stabilnost stanične stijenke (Lipke i Ovalie, 1998). Također može imati i ulogu akceptora za vezanje hitina posebice u za stanicu stresnim uvjetima.

HITIN

Hitin se u staničnoj stijenci pojavljuje u obliku linearnih lanaca N-acetilglukozamina povezanih β -1,4-glikozidnom vezom. Prevladava u ožiljcima koji zaostaju nakon pupanja stanice kvasca (Cabib i Duran, 2005.). Unatoč tome što hitin čini svega 1-2% suhe mase stanične stijenke, on ima važnu strukturnu ulogu u stijenci. Stoga u stanicama s oslabljenom stijekom, kao spašavajući mehanizam se aktivira sinteza hitina čija razina u bočnim zidovima takvih stanica može biti i do 20% suhe mase stijenke (Garcia-Rodriguez i sur.,2002). Sinteza hitina u *S. cerevisiae* je strogo regulirana (Cabib i sur.,2001) i uključuje tri hitin sintaze, a ugradnja hitina se u normalnim uvjetima odvija nakon citokineze. Procjenjuje se da je duljina hitinskih lanaca u ožiljcima pupova i staničnoj stijenci između 100 i 190 N-acetilglukozaminskih ostataka (Klis i sur., 2002).

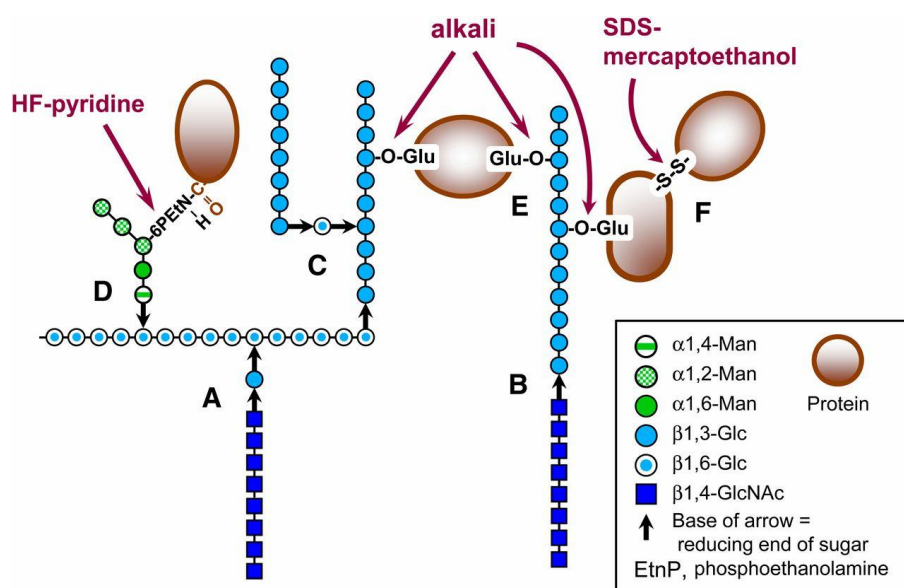
MANAN

Manan je razgranati polisaharid sa udjelom u stijenci od 35%. Predstavlja ugljikohidratni dio molekula manoproteina koji su smješteni u vanjskom sloju stanične stijenke kvasca. Manoproteini su proteini na koje su kovalentno vezani ugljikohidratni lanci u procesu postsintetske glikozilacije. Ugljikohidratni dio ovih glikoziliranih proteina može činiti od 50-95% njihove molekulske mase. Međusobno se razlikuju po tipu glikozilacije: N-glikozilacija asparginskih ostataka ili O-glikozilacija serinskih ili treoninskih ostataka. Obje glikozilacije

su neophodne za rast stanica kvasca te poremećaji u procesima glikozilacije imaju letalan učinak na stanicu.

2.4. PROTEINI STANIČNE STIJENKE

Proteini čine 10% sadržaja stanične stijenke kvasaca, a nalaze se u obliku manoproteina kojih je dosad u stijenci identificirano više od 30. Funkcija većine proteina je još uvijek nepoznata, a za neke su istraživanja pokazala da njihovim uklanjanjem iz stanične stijenke nema značajnijih posljedica na oblik ili osmotsku stabilnost stanice. Iako točna fiziološka uloga velikog broja proteina stijenke nije poznata, smatra se da su proteini odgovorni za površinska svojstva stijenke kao što su hidrofobnost i električni naboj kao i za održavanje interakcija između stanica u procesima aglutinacije i flokulacije. Analizom proteina ustanovljeno je kako se prema načinu vezanja mogu podijeliti u dvije skupine, a sam način vezanja proteina je shematski prikazan na Slici 2. Proteini vezani nekovalentno na β -1,3-gukan čine jednu skupinu. Ti proteini se mogu izolirati pomoću vrućeg SDS-a uz dodatak merkaptetanola. Drugu skupinu čine proteini koji zaostaju na staničnoj stijenci nakon izolacije nekovalentnih proteina, a na glukanski sloj su vezani kovalentno. Oni se mogu podijeliti u još dvije podskupine, na tzv. GPI proteine te Pir-proteine, budući da se mogu izolirati na dva načina ovisno o vrsti vezanja na stijenk. GPI proteini vezani su preko glikozilfosfatidilinozitolnog ostatka (GPI sidra) na β -1,6-glukan, a iz stijenke se uglavnom ekstrahiraju tretmanom sa glukanaazama. Pir-proteini su za glukan vezani esterskom vezom između gama-karboksilne grupe specifičnog ostatka glutaminske kiseline proteina, koja se nalazi unutar ponavljajuće sekvence koja je specifična za ovaj tip proteina, te hidroksilne grupe glukoze iz β -1,3-glukana stijenke (Ecker i sr.,2006). Ovi proteini se ekstrahiraju pomoću NaOH (Mrša i Tanner, 1997.) jer je veza alkalno labilna.



Slika 2. Shematski prikaz vezanja proteina u staničnu stijenku kvasca (www.genetics.org.

Pristupljeno 25.lipnja.2015.)

Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke

Ovi proteini se vežu prvenstveno vodikovim vezama na glukan te disulfidnim mostovima na druge proteine stijenke. Čine 80% ukupnih proteina stijenke i nose oko 10 % ukupnog manana. Pretežito su O-glikozilirani (Mrša i sur., 1999.) i ravnomjerno distribuirani kroz staničnu stjenku (Klis i sur., 2006.). Dosad je iz stijenke izolirano i pročišćeno 10-ak nekovalentno vezanih proteina, čija fiziološka uloga nije u cijelosti objašnjena. Prvi protein ove skupine koji je pročišćen te mu je analizirana primarna struktura je Bgl2p. Taj protein, ovisno o koncentraciji supstrata u *in vitro* testu pokazuje endoglukanaznu ili transglukozidaznu aktivnost. Većina do sada opisanih proteina pokazuje značajnu homologiju primarne strukture sa glukan hidrolazama ili transglukozidazama, što vodi do zaključka da imaju ulogu u parenju, sporulaciji, pupanju, održavanju i pregradnji glukana u stijenci tokom rasta stanice kao i u ostalim staničnim procesima promjene stanične stijenke (Teparić i sur., 2010). Tako se za tri nekovalentno vezana proteina: Scw4p, Scw10p i Scw11p koji pokazuju značajan nivo homologije sa Bgl2p pretpostavlja da su glukan-remodelirajući enzimi, no enzimska aktivnost im nije dokazana *in vitro*. Neki od nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke prikazani su u Tablici 1. Nekovalentno vezani proteini mogu se izolirati na dva načina. Prvi je da se ekstrahiraju iz izoliranih i pročišćenih staničnih stijenki grijanjem na 95-100 °C tijekom 5-10 minuta u otopini SDS-a uz dodatak 5% merkaptioetanol (Mrša i sur., 1997). Drugi način izolacije je da se cijele stanice podvrgnu tretmanu sa 2 mM ditiotreitolom (DTT) (Cappellaro i sur., 1998) preko noći na 4 °C. Dobiveni ekstrakt će zbog dodatka reducirajućih agensa osim nekovalentno vezanih proteina sadržavati i proteine koji su vezani disulfidnim vezama na druge proteine stijenke.

Tablica 1. Pregled nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Scw-protein	Funkcija	veličina (kDa)
Scw9p	Endoglukanaza/transglukanaza	29
Scw6p	Egzoglukanaza	44
Scw4p	Homolog glukanazama	66
Scw2p	Hitinaza	116
Scw8p	Nepoznata	41
Scw3p	Homolog glukanazama	95
Scw10p	Homolog glukanazama	66
Scw11p	Homolog glukanazama	78

Kovalentno vezani proteini stanične stijenke

Nakon izolacije proteina stanične stijenke pomoću reagensa koji razaraju nekovalnetne veze i disulfidne mostove (SDS, beta-merkaptetanol, DDT) na staničnoj stijenci zaostaju proteini koji su kovalentno vezani na njene polisaharide i njihov udio je značajno manji od udjela nekovalnetno vezanih proteina. Mogu se izolirati na dva načina: glukanzama (zimolijaza, laminarinaza, β -1,3-glukanaza) ili pomoću 30 mM NaOH inkubacijom na $+4^{\circ}\text{C}$ preko noći (Mrša i sur., 1997.).

GPI proteini

GPI proteini vezani su preko glikozilfosfatidilinozitolnog ostatka (GPI sidra) na β -1,6-glukan, a iz stijenke se uglavnom ekstrahiraju tretmanom sa glukanzama. Intenzivno su O- i N-glikolizirani. GPI-sidro dodaje se na C-terminalnu karboksilnu skupinu proteina, a njegovo dodavanje kao i sinteza odvija se u ER-u stanice. Vezanje GPI-sidra na protein se odvija reakcijom transamidacije kojoj prethodi uklanjanje dijela peptidnog lanca sa C-terminalnog kraja proteina. Tako vezani protein prelazi iz endoplazmatskog retikuluma u Golgijevo tijelo te zatim do citoplazmatske membrane na kojoj ostaje vezan s vanjske strane. Većina proteina sa vezanim GPI sidrom se translociraju sa plazmine membrane na β -1,6-glukan stanične stijenke reakcijom transglikolizacije (De Groot i sur, 2005.). Zajedničke karakteristike proteina ove skupine su posjedovanje signalne sekvence koja je odgovorna za upućivanje u sekretorni put na N-terminalnom kraju, regije bogate serinom i treoninom unutar sekvence, te signala za dodavanje GPI-sidra na C-terminalnom kraju koji je neophodan za pravilnu lokalizaciju proteina u staničnoj stijenci. Pet proteina ove skupine su članovi GAS obitelji i imaju glukan-remodelirajuću aktivnost. Aglutinini, najviše istraženi proteini ove skupine imaju važnu ulogu u povezivanju stanica suprotnog tipa parenja, a smatra se kako kovalentno vezani proteini imaju i ulogu u flokulaciji. Fiziološka funkcija većine GPI-proteina i dalje je nepoznata.

PIR-proteini

Kovalentno vezani proteini izolirani blagom reakcijom β -eliminacije pomoću 30mM NaOH na $+4^{\circ}\text{C}$ spadaju u PIR porodicu proteina. Četri proteina ove skupine (prikazani u Tablici 2.) odlikuju sljedeće strukturne sličnosti: visoki stupanj homologije, bogatstvo serinom i treoninom, a i intenzivno su O-manolizirani. Također svi sadrže N-terminalni signalni peptid za upućivanje u sekretorni put, ponavljajuće regije duljine od oko 11 aminokiselina na N-terminalnom kraju (prema kojima su i dobili naziv: Proteins with Internal Repeats-PIR) te specifično mjesto za cijepanje Kex2p proteazom (Mrša i sur.,1997). Ekspresija PIR gena aktivira se u G1 fazi staničnog ciklusa, a zamjećeno je kako su geni pojačano ekprimirani kada se stanica nađe u stresnim uvjetima (Terashima i sr., 2000.; Jung i Levin, 1999.). Istraživanja svojstava ovih proteina pomoću različitih mutanata upućuje kako ovi proteini imaju ulogu u održavanju integriteta stanice i stanične stijenke. Naime inaktivacijom gena za sva 4 PIR proteina dolazi do povećanja osjetljivosti stanica na inhibitore sinteze stijenke kao i do izmjene morfologije same stijenke tako da mutante odlikuju veće stanice, nepravilnog oblika, te rast u nakupinama (Mrša i Tanner, 1999.). Točan način djelovanja PIR proteina na integritet stanične stijenke i dalje je nepoznat.

Tablica 2. Kovalentno vezani proteini izolirani pomoću 30mM NaOH

Protein	Veličina(kDa)	FUNKCIJA
Ccw7p/Pir2p/Hsp150p	115	"Heat - shock" protein
Ccw5p/Pir4/Ccw11p	41	Nepoznata
Ccw6p/Pir1p	250	Nepoznata
Ccw8p/Pir3p	57	Nepoznata

Scw4p PROTEIN

Scw4p protein je najprije identificiran u skupini nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke. Ovaj protein jedan je od najzastupljenijih proteina ove skupine. Funkcija samog proteina i dalje je nepoznata. Iako pokazuje visoku razinu homologije sa glukanazama funga i biljaka kao i ranije spomenutim Bgl2p, katalitička aktivnost nije dokazana *in vitro*. Njegov homolog je protein iste molekulske mase Scw10p s kojim pokazuje čak 63% identičnosti. Dosadašnja istraživanja pokazuju da ova dva proteina djeluju sinergistički u izgradnji stanične stijenke. Naime s ciljem otkrivanja funkcije ovog proteina istraživani su različiti mutanti. Kod mutanata u kojima je disruptiran ili *scw4* ili *scw10* nema značajnijih promjena fenotipa. No to nije bio slučaj kod dvostrukog mutanta *scw4scw10*. Kod ovog mutanta zamijećena je destabilizacija stanične stijenke, neuspješno parenje haploida, smanjenje koncentracija proteina koji se izoliraju pomoću glukanaza te veća osjetljivost na inhibitor sinteze hitina Calcofluor White. To navodi na zaključak da ova dva proteina imaju sličnu funkciju jer je za normalno funkcioniranje stanične stijenke dovoljna prisutnost bilo kojeg od ova dva proteina (Šestak i sur., 2004.), te da djeluju sinergistički u izgradnji stanične stijenke kvasca. Ekspresija gena *SCW4* je konstantna tijekom svih faza staničnog ciklusa, dok je u G1 fazi maksimalna ekspresija gena *SCW10* (Spellman i sur., 1998.). Dugo vremena se Scw4p svrstavao u nekovalentno vezane proteina, a tek daljnim istraživanjem je otkriveno kako se dobije i prilikom ekstrakcije proteina stijenke sa NaOH (Teparić i sur., 2007) što je pokazalo kako postoje dva načina vezanja ovoga proteina. Pretpostavlja se kako posttranslacijske modifikacije uvjetuju da li će se protein vezati kovalentno ili nekovalentno. Prilikom izolacije ovoga proteina pomoću SDS-a i NaOH dobiju se tri forme proteina različite po molekulskoj masi. Proučavanjem sekvence proteina Scw4p zamijećeno je prisustvo specifičnih mjesta za procesiranje s Kex2p i japsinskim proteazama. Upravo se one smatraju odgovornima za modifikaciju proteina i razlogom dobivanja tri različite forme proteina. Prema molekulskim masama dobivenih formi proteina smatra se da se kovalentno veže pretežno neprocesirani oblik proteina, dok se procesirani oblici Scw4p vežu nekovalentnim interakcijama. Iako se Scw4p može izolirati na isti način kao i PIR proteini, odnosno pomoću NaOH inkubacijom preko noći na +4°C, on ne posjeduje specifičnu ponavljajuću sekvencu svojstvenu PIR proteinima. To upućuje kako postoji još jedan način kovalentnog vezanja proteina na staničnu stjenku kvasca.

2.5.PROTEOLITIČKI ENZIMI UKLJUČENI U PROCESIRANJE PROTEINA STANIČNE STIJENKE

Fiziološka uloga proteina Kex2p u stanici

Kex2p je transmembranska Ca^{2+} ovisna serinska proteaza s ulogom u procesiranju proproteina (Fuller i sur., 1989a). Ona cijepa proteine nakon specifičnog slijeda aminokiselinskih ostataka iza para bazičnih aminokiselina. Pripada konzerviranoj obitelji prohormoskih i pro-proteinskih konvertaza pronađenih u sekretornom putu, te je njihov najistraživaniji predstavnik (Rockwell i Thorner, 2004.). Kex2p sudjeluje u procesiranju proteina koji imaju ulogu u održavanju i remodeliranju stanične stijenke (Brickner i Fuller, 1997.) pa to dovodi do pretpostavke da sudjeluje i u procesiranju Scw4p proteina. Nadalje procesira i proteine koji sudjeluju u formiranju zračnih hifa (Wosten i sur., 1996), feromona alfa-faktora i "killer" toksina (Julius i sur., 1984), lipaza (Pignede i sur., 2000.), te autokatalizira svoju proteolizu što dovodi do nastanka aktivne forme enzima (Germain i sur., 1993.). Neka istraživanja pokazala su da sudjeluje i u fuziji stanica prilikom parenja bilo da proteolitički aktivira još uvijek nepoznati protein s ulogom u fuzijskoj mašineriji ili tvori kompleks sa Prm1p (Pheromone regulated membrane protein 1) koji je važan za fuziju stanica prilikom parenja (Heiman i sur., 2007.).

Kex2p se translatira kao inaktivni prekursor građen od više domena koje podliježu modifikacijama. Zimogeni oblik Kex2p sastoji se od: N-terminalne signalne sekvence za ER, pro-domene neophodne za aktivnost enzima koja djeluje kao intermolekularni „chaperone“ i time omogućuje smatanje proteolitičke domene u aktivnu konformaciju, katalitičke domene, konzervirane P-domene neophodne za katalitičko djelovanje *in vivo*, visoko glikozilirane domene bogate serinom i treoninom, transmembranske domene te citosolnog repa koji sadrži TGN (Trans Golgi Network) lokalizacijski signal (Wilcox i Fuller, 1991.). TGN je odjeljak stanice u kojem se proteini sekretornog puta sortiraju u različite dijelove stanice i retrogradnim transportom vraćaju iz membrane (Griffiths i Simons, 1986.). Kex2p proteaza s najvećim afinitetom za katalizu reže iza para Lys-Arg sa omjerom k_{cat}/K_M i do $1.1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Brenner i Fuller, 1992.) što je čini visoko učinkovitom sa $t_{1/2}$ oko 80 minuta. Tako dugi period poluživota ovoj proteazi omogućuje to što se čak 97 % proteaze nalazi intracelularno (Fuller i sur., 1989.b). Aktivacija Kex2p se odvija na N-terminalnom dijelu i to u više koraka. Naprije se kotranslacijski odcjepljuje signala sekvenca u ER nakon čega slijedi N- i O-glikozilacija, a zatim slijedi autoprocisiranje pro-regije od 89 aminokiselina. Tim odcjepljivanjem prodomene stvara se katalitički aktivan enzim (Wilcox i Fuller, 1991; Germain i sur., 1993.). Na kraju slijedi intenzivna N- i O-glikozilacija, skraćivanje enzima Ste13p dipeptilaminopeptidazom i zatim lociranje proteina u kasnom Golgiju (Brenner i Fuller, 1992.).

Proteaze iz porodice japsina te njihova fiziološka uloga u stanic

Japsini su proteaze koje spadaju u porodicu aspartatnih proteaza. U *S. cerevisiae* tu porodicu čini 5 homologa: *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*, *YPS6*, *YPS7* (Olsen i sur., 1999). Kao i Kex2p, ove proteaze hidroliziraju iza para bazičnih aminokiselina Lys-Arg i Arg-Arg, ali i iza pojedinačne bazične aminokiseline (Cawley i sur., 1998). I japsini se kao i brojne druge proteaze sintetiziraju kao inaktivni zimogeni, a tek nakon proteolize prodomene enzim postaje katalitički aktivan. Naime pro-regija koja sudjeluje u sortiranju u intracelularne odjeljke (Hasilik, 1992.) i omogućuje pravilno smatanje japsina *in vivo* je ujedno i inhibitor katalitičke domene. To omogućuje funkciju katalize tek kada je japsin pravilno lokaliziran. Katalitička domena pokazuje visok stupanj homologije između japsina, a sastoji se od dva dijela peptidnog lanca povezana disulfidnim mostom. Između ta dva dijela kod nekih japsina se nalazi slobodni dio polipeptidnog lanca u obliku petlje koja se naziva „loop insertion“. Veza između propeptida i katalitičke domene je stabilizirana ionskim interakcijama pri pH 4.0, a do autokatalitičke aktivacije zimogena dolazi kada se projapsin nađe u kiselom okolišu što uzrokuje odbijanje pozitivnih naboja u prodomeni i protoniranja Asp u katalitičkoj domeni što destabilizira njihove interakcije. Istraživanjima je uočeno kako se ekspresija japsina mijenja ovisno o uvjetima okoline. Tako se ekspresija povećava 12 puta sa povišenjem temperature sa 24°C na 37°C što navodi na zaključak da japsini sudjeluju u mehanizmu odgovora na temperaturni stres (Ash i sur., 1995). Japsini su i pojačano ekprimirani u periodu aktivne sinteze te remodeliranja stanične stijenke, zatim u uvjetima oštećenje stijenke zimolijazom, SDS-om, Ca^{2+} i Na^{+} , Congo Red-om te Calcofluor White-om (Krysan i sur., 2005). Japsini se ističu iz porodice aspartatnih proteaza po C-terminalnoj sekvenci koja omogućuje vezanje GPI-sidra a time i lokalizaciju japsina u plazma membrani ili staničnoj stijenci. Već je napomenuto kako je lokalizacija japsina ključna za njegovu aktivnost. To potvrđuje i delecija C-terminalnog dijela Yps2, koji nosi signal za vezanje GPI-sidra, što je dovelo do gubitka aktivnosti enzima (Komano i Fuller, 1995).

2.6. PCR- polimerazna lančana reakcija

PCR- (Polymerase Chain Reaction) je metoda koja omogućava umnožavanje točno određenog, relativno kratkog dijela DNA u veliki broj identičnih kopija iz male količine genetičkog materijala. Kary Mullis je 1983. godine otkrio i opisao ovu metodu za *in vitro* umnožavanje DNA bez kloniranja te je za to otkriće dobio Nobelovu nagradu 1993. godine. Ciljni dio DNA molekule koji se želi umnožiti određuje se kratkim oligonukletidnim sekvencama koji se još nazivaju "primeri", "klince" ili "početnice", a koji su komplementarni krajevima ciljanog dijela DNA. Početnice koje se obično sastoje od 12-30 nukleotida se komplementarno sparuju „lijevo i desno“ od dijela DNA koji želimo umnožiti i pri tome 3'-krajevi početnicamoražu biti orijentirani jedan prema drugome. Pomoću DNA polimeraze na kalupu jednog lanca DNA sintetizira se novi komplementarni lanac i pri tome veličina sintetiziranog dijela DNA molekule odgovara dužini koju omeđuju izabrane početnice.

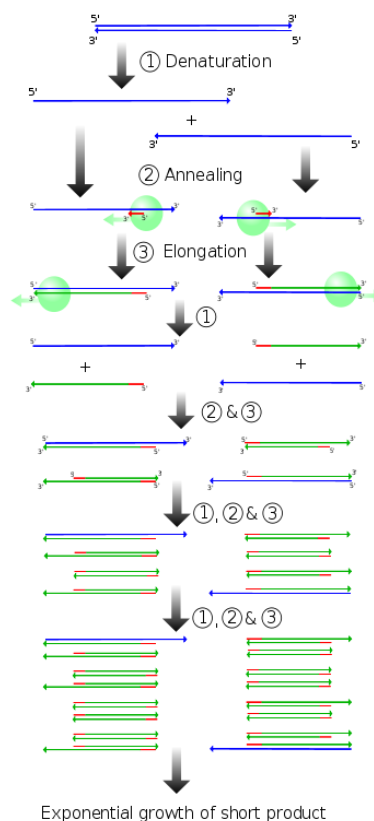
Polimerazna lančana reakcija se odvija u uređaju-

PCR tremobloku (Slika 4.), koji automatski i veoma precizno kontrolira promjene temperatura tijekom ciklusa amplifikacije.

Taj uređaj zagrijava i hladi reakcijsku smjesu koja se nalazi u termobloku, a osim toga uređaj kontrolira i dužinu trajanja pojedinih ciklusa amplifikacije. Reakcijska otopina za uspješno provođenje PCR-a mora sadržavati: DNA-kalup, početnice (1 pM/μL), smjesu sva četiri dNTP-a (200 pM/μL), termostabilnu DNA polimerazu (1-5 U) i pufer za polimerazu koji sadržava Mg^{2+} . Osnovni uvjeti svih PCR protokola su: 1. Inicijalno denaturiranje DNA u trajanju od 3-5 minuta na temperaturi od 95°C pri čemu dolazi do razdvajanja DNA lanaca koji onda služe kao kalupi za amplifikaciju; 2. Komplementarno sparivanje početnica („annealing“) na temperaturi od 50-65°C na kojoj dolazi do vezanja oligonukleotidnih početnica na razdvojene lance DNA. Temperatura vezanja početnica se računa po formuli koja se temelji na sadržaju nukleotidnih parova GC i AT unutar sekvence početnica; 3. Sinteza komplementarnog lanca na temperaturi od 72°C što je optimalna temperatura za djelovanje termostabilne Taq-polimeraze. Vrijeme ovog koraka ovisi o duljini fragmenta (1 minuta po kb fragmenta).



Slika 4. Uređaj za PCR (PCR-termoblok)



Slika3. Shematski prikaz PCR metode

(www.boundless.com).

Pristupljeno 28.lipnja.2015.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- agar, kvašćev ekstrakt, pepton, baktotripton i kvašćeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) – Biolife (Milano, Italija)
- rafinoza, galaktoza - Difco Laboratories (Detroit, USA)
- histidin, uracil, leucin, triptofan, lizin i etidijev bromid–Merck (Darmstadt, Njemačka)
- ECL-otopine za razvijanje blota, standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- λ_{DNA} standard za elektroforezu
- amonijev persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, Triton X-100, β -merkaptotanol i Na-dodecilsulfat (SDS) – Fluka (Buchs, Švicarska)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Ponceau S (PEG 4000) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- anti-HA-peroksidaza antitijela - Boehringer (Manheim, Njemačka)
- Ampicilin-Roth (Karlsruhe, Njemačka)

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

3.1.2 . Hranjive podloge i uvijeti uzgoja 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), 2g/L smjese aminokiselina i vitamina ("drop out"- Tablica 3.) koja sadrži sve aminokiseline potrebne za rast kvasca osim onih preko kojih se vrši selekcija auksotrofnih sojeva, te šećera (0,02g/L) (Sambrook i Russel, 2001). Kao izvor ugljika korištena je galaktoza (20%) i rafinoza (20%). U podlogu se dodaju histidin (80mg/L), triptofan (80mg/L) i leucin (160mg/L) sterilizirani autoklaviranjem.

Tablica 3. Smjesa aminokiselina i vitamina (“drop out”):

adenin	3,00 g	L-metionin	2,0 g
L-arginin	2,00 g	L-fenilalanin	2,0 g
L-asparagin	2,00 g	L-prolin	2,0 g
L-asparaginska kis.	6,00 g	L-serin	6,0 g
L-cistein	2,00 g	L-treonin	2,0 g
L-glutamin	2,00 g	L-tirozin	2,0 g
L-glutaminska kis.	2,00 g	L-valin	2,0 g
L-glicin	2,00 g	p-aminobenzojeva kis.	0,2g
L-izoleucin	2,00 g	Inositol	2,0g

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. Kvasci su u tekućem mediju uzgajani na tresilici pri temperaturi od 30°C, a na krutim podlogama u termostatu pri 30°C.

3.1.3 Soj kvasca

U radu je korišten laboratorijski soj kvasca $\Delta 20$ SCW4 sljedećeg genotipa :

$\text{Mat}\alpha$, $\text{his}3\Delta$, $\text{leu}2\Delta$, $\text{met}15\Delta$, $\text{ura}3\Delta$ + pBG1805 $\Delta 20$ SCW4

3.1.4. Hranjive podloge i uvjeti uzgoja bakterija

E.coli je uzgajana u tekućoj LB podlozi (baktotripton (0,01g/L), kvašćev ekstrakt (0,05g/L), NaCl (0,05 g/L)), odnosno na krutoj LB podlozi (baktotripton (0,01g/L), kvašćev ekstrakt (0,05g/L), NaCl (0,05 g/L), agar (0,015g/L)). Za uzgoj stanica nakon transformacije plazmidima koji nose gen za rezistenciju na ampicilin u tekuću odnosno krutu LB podlogu dodavan je ampicilin u koncentraciji 100 µg/mL.

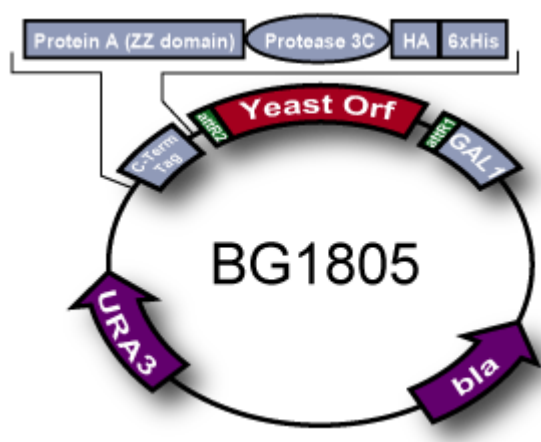
3.1.5. Sojevi bakterija

Korišten je soj *Escherichia coli* sljedećeg genotipa:

DH5α F- Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 λ*⁻*thi-1 gyrA96 relA1* (Life Technologies)

3.1.6. Plazmid

Korišten je plazmid pBG1805 koji sadrži *ori* sekvenciju koja mu omogućava umnažanje u bakteriji *E.coli*, *BLA* gen koji omogućuje selekciju bakterija koje ga sadrže na podlozi uz dodatak ampicilina, te kvašćev *URA3* gen koji omogućuje selekciju transformiranih stanica kvasca na hranjivim podlogama bez uracila. Željeni gen, u našem slučaju *SCW4*, se nalazi pod kontrolom promotra *GAL1*, a iza gena se nalaze nastavci –*HA1 6XHis* (Slika 5.). Ovaj plazmid korišten je i kao kalup za uvođenje mutacije unutar sekvence *SCW4* gena. Mutacije su uvedene pomoću PCR-a metodom “megapočetnice”.



Slika5. Plazmid pBG1805 (dharmacon.gelifesciences.com. Pristupljeno 15. Srpnja.2015)

3.2. METODE

3.2.1. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Cijepanje DNA provedena su restrikcijskim enzimima SacI i EcoRV prema uputama proizvođača restrikcijskih enzima („New England Biolabs“ Ipswich, MA, SAD). Restrikcija je provedena kroz 2 sata pri 37°C sa svakim pojedinim enzimom (ukupno 4 sata). Denaturacija enzima na kraju restrikcije je provedena kroz 20 minuta na 70°C.

3.2.2. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Izolacija fragmenta DNA iz agaroznog gela provedena je upotrebom kita za izolaciju „QIAquick Gel Extraction Kit“ prema uputama proizvođača („Qiagen“, Valencia, CA, USA). Izolirani fragmenti su eluirani sa kolonica za pročišćavanje u 30 µl pufera za eluciju (EB pufer iz kita).

3.2.3. TA-ligacija

Ligacijska smjesa ukupnog volumena 10 µL se sastojala od 50 ng plazmida pGEM-T Easy Vector, 175,5 ng fragmenta amplificiranog PCR-om, 1 µL pufera za DNA ligazu i 1 µL DNA ligaze. U ligaciji je korišten molarni odnos plazmida i fragmenta 1:3. Masa fragmenta potrebna za ligaciju se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$\frac{\text{ng vektora} \times \text{veličina fragmenta (inserta) u kb}}{\text{veličina vektora u kb}} \times \text{molarni odnos plazmida i fragmenta} = \text{ng inserta}$$

3.2.4. Ligacija plazmidne DNA

Ligacijska smjesa ukupnog volumena od 10 µL se sastojala od 50 ng odgovarajućeg fragmenta plazmida pBG1805 SCW4 (prethodno pripremljenog restrikcijom originalnog plazmida pomoću enzima SacI i EcoRV) odgovarajuće količine PCR-om umnoženog fragmenta (također prethodno pripremljenog restrikcijom pomoću enzima SacI i EcoRV) da bi se postigao molarni odnos plazmida i fragmenta 1:3, 1 µL 10x koncentriranog pufera za T4 ligazu i 2.5 U T4 ligaze. Smjesa je inkubirana na 4°C preko noći. Budući da su i plazmid i insert porezani sa istim restrikcijskim enzimima, SacI i EcoRV, dobiveni su komplementarni „ljepljivi krajevi“ koji se djelovanjem T4 ligaze mogu povezati u kružnu molekulu plazmida. Kako se restrikcijom originalnog plazmida pBG1805 SCW4 sa ova dva enzima dobiju 2 fragmenta, a nama je za ligaciju sa PCR fragmentom potreban jedan od njih, potrebno je po završetku restrikcije dobivene fragmente razdvojiti elektroforezom u agaroznom gelu i iz gela izolirati potreban fragment. Također i insert koji želimo ubaciti u plazmid moramo izolirati iz gela budući da smo ga ovim enzimima isjekli iz plazmida pGEM-T Easy Vector (unesen TA ligacijom). Nakon izolacije potrebnog fragmenta plazmida pBG1805 SCW4 i PCR fragmenta te određivanja njihove koncentracije može se započeti ligacija.

3.2.5. Transformacija kompetentnih stanica *E.coli*

U alikvot kompetentnih stanica *E.coli* (DH5 α Competent Cells, Invitrogen) doda se 10 μ L DNA, te se kivete inkubiraju na ledu 30 min. Nakon toga se 20 sekundi inkubiraju pri 42 $^{\circ}$ C („heat shock“) i zatim se vrte na led na 2 minute. Zatim se na stanice doda 950 μ L tekuće LB-podloge (predinkubirane na 37 $^{\circ}$ C) i sve se inkubira 1 sata na 37 $^{\circ}$ C. Po 200 μ L od ove suspenzije se nacijepi na krute LB-Amp ploče (sadrže ampicilin) i inkubira preko noći na 37 $^{\circ}$ C.

3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija *E.coli* iz malog volumena podloge („mini prep“)

Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *E.coli* provedena je pomoću Qiaprep Miniprep kita prema uputama proizvođača („Qiagen“, Valencia, CA, USA). Plazmidi su izolirani iz stanica *E. coli* uzgojenih preko noći na 37 $^{\circ}$ C u 3 ml LB podloge uz dodatak ampicilina u koncentraciji 100 μ g/mL.

3.2.7. Pročišćavanje PCR produkata

Kako bi se uklonili ostatci nepotrošenih nukleotida i početnica, *Taq* polimeraze i pufera za *Taq* polimerazu nakon završetka umnažanja PCR produkti su pročišćeni pomoću kita za pročišćavanje PCR produkata (QIAquick PCR purification Kit; „Qiagen“, Valenca, CA, USA) prema uputstvima proizvođača.

3.2.8. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza DNA je provedena u 1% agaroznom gelu pripremljenim sa TAE-puferom (40mmol/L TRIS-HAc pH8,0; 1 mmol/L EDTA). Elektroforeza je provedena pri naponu 5V/cm gela, a po njenom završetku gel je uronjen u otopinu etidij-bromida na 15 minuta nakon čega su vrpce DNA vizualizirane pomoću UV svjetla na transiluminatoru (Hoefer, Macrovue Uvis-20).

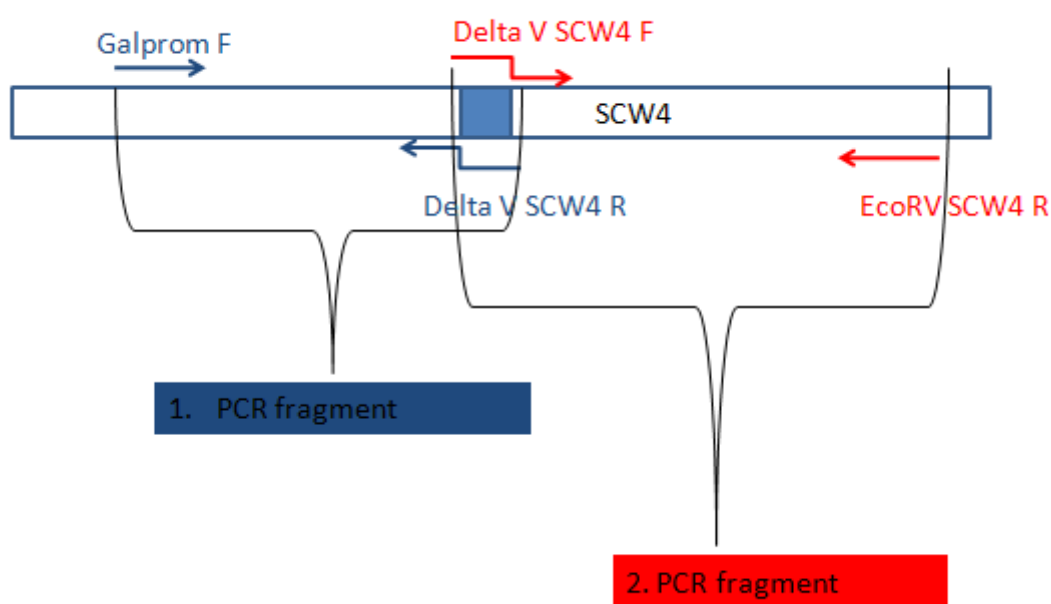
3.2.9. Uvođenje mutacije u gen SCW4 metodom „megapočetnice“

Za uvođenje mutacije u SCW4 gen PCR metodom „megapočetnice“ (Huges i Moody, 2007) korišteni su oligonukleotidi prikazani u Tablici 4.

Tablica4. Oligonukleotidi korišteni za uvođenje mutacije u gen SCW4 PCR metodom.

Naziv početnice	Sekvenca
Galprom F	5'GCTGGAGCTCCACCGCGGGAACGGATTAGAAGCC3'
Delta V SCW4 R	5'GGCAGCCTTCAAGGCAGATCTGTTAACCAATTCGTTACCAATGGAAC3'
Delta V SCW4 F	5'GTTTCCATTGGTAACGAATTGGTTAACAGATCTGCCTTGAAGGCTCC3'
EcoRV SCW4 R	5'ACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTCC3'

U prvom koraku je PCR-om koristeći plazmid pBG1805 SCW4 kao kalup uz upotrebu odgovarajućih početnica (galprom F i delta V SCW4 R) umnožen dio promotorske regije i početak SCW4 gena pri čemu je u produkt unesena željena mutacija (1. PCR produkt). U drugom koraku je koristeći plazmid pBG1805 SCW4 kao kalup uz upotrebu parova početnica delta V SCW4 F i EcoRV SCW4 R umnožen dio SCW4 gena nizvodno od mjesta na koje se unosi mutacija i mutirana regija (2. PCR produkt). Mutacija je unesena na način da početnice nisu u potpunosti komplementarne kalupu, odnosno nisu komplementarne onom dijelu gena koji želimo izbaciti kao što je prikazano na Slici 6. Ti dijelovi početnica koji se nisu spojili sa kalupom su pak međusobno komplementarni što omogućuje daljnje umnožavanje produkta bez dijela gena koji smo željeli izbaciti.



Slika 6. Unošenje mutacije u SCW4 gen metodom PCR-a-1.stupanj. Plavim pravokutnikom je označena regija u SCW4 genu koja se želi izbaciti.

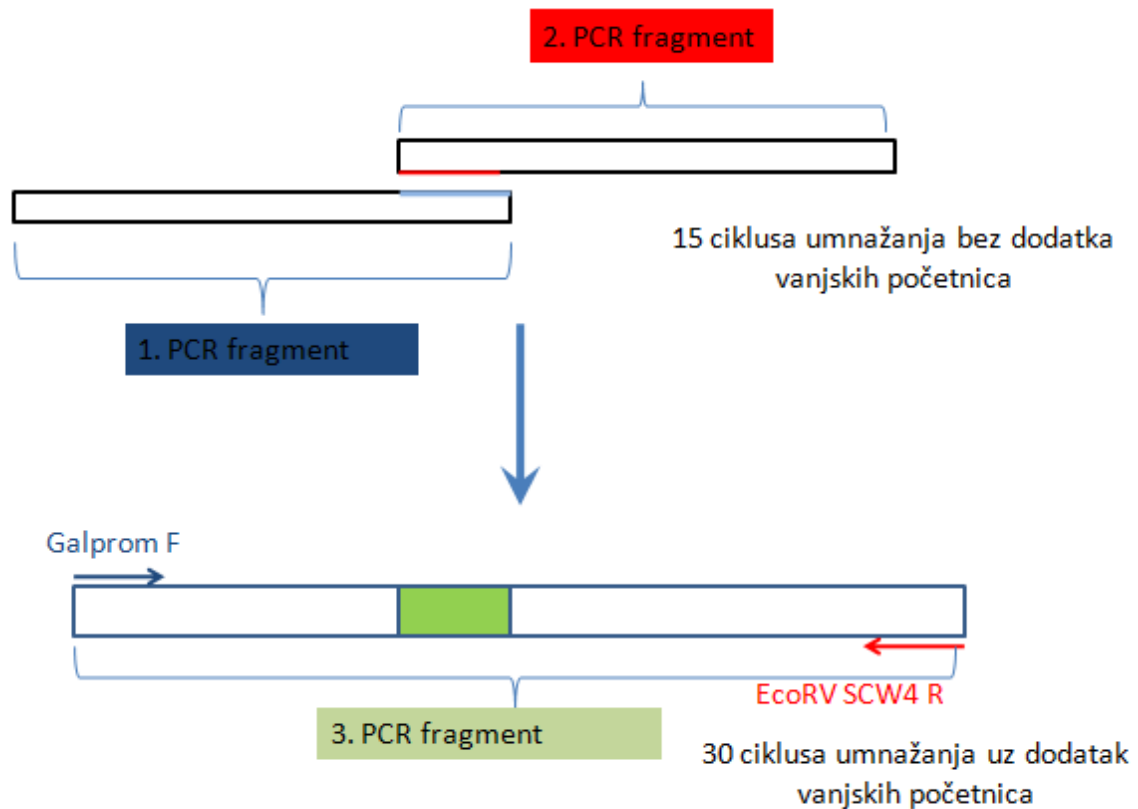
Reakcijska smjesa volumena 50 μL bila je sljedećeg sastava:

pBG1805 SCW4 kao kalup	0,30 μL
početnice	2,00 μL
pufer za Taq polimerazu (10x koncentriran)	5,00 μL
Taq polimeraza	1,00 μL
smjesa deoksiribonukleozid-trifosfata	1,00 μL
sterilna deionizirana voda	38,7 μL

Uvjeti provođenja PCR reakcije za prvi i za drugi PCR produkt bili su različiti. Prvi ciklus umnažanja kod 1. PCR produkta se sastojao od denaturacije plazmidne DNA kroz 5 minuta na 95⁰C, komplementarnog sparivanja početnica s kalupom 90 sekundi pri 60⁰C i sinteze DNA 120 sekundi na 72⁰C. Zatim je slijedilo 34 ciklusa umnažanja, a svaki ciklus se sastojao od: denaturacije dvolančane DNA (45 sekundi na 95⁰C), komplementarnog sparivanja početnica sa kalupom (90 sekundi na 67⁰C) i sinteze DNA (120 sekundi pri 72⁰C). Za sintezu drugog PCR produkta prvi ciklus se također sastojao od denaturacije kroz 5 minuta na 95⁰C, komplementarnog sparivanja početnica kroz 90 sekundi, ali na nižoj temperaturi od 56⁰C te sinteze DNA na 72⁰C kroz 2 minute i 20 sekundi. Zatim je slijedilo 30 ciklusa umnažanja sa istim uvjetima kao u prvom ciklusu, ali sa kraćim vremenom denaturacije od 45 sekundi.

Nakon završetka umnažanja PCR produkti su pročišćeni pomoću kita za pročišćavanje PCR produkata (QIAquick PCR purification Kit; „Qiagen“, Valenca, CA, USA) prema uputstvima proizvođača, čime su uklonjeni ostaci nepotrošenih nukleotida i početnica, Taq polimeraza te pufer za Taq polimerazu.

Pročišćeni produkti su zatim upotrijebljeni za drugi krug PCR-a, gdje su korišteni kao kalup za umnažanje umjesto pBG1805 SCW4 (Slika 7.) . Najprije su određene koncentracije PCR produkata mjerenjem apsorbancije na 260nm u spektrofotometru 100x razrijeđenog uzorka i zatim preračunavanjem u koncentraciju po formuli: $OD_{260} * 50 \mu\text{g/mL} * 100 = \text{koncentracija } \mu\text{g/mL}$. U reakcijsku smjesu za drugi krug PCR-a uzete su ekvimolarne količine PCR produkata 1 i 2 (po 100 nmola svakog PCR produkta), pufer za Taq polimerazu (10x koncentriran; 5 μ L), smjesa deoksiribonukleozid-trifosfata (1 μ L), Taq polimeraza (0,5 μ L), te je dodana sterilna deionizirana voda do ukupnog volumen od 50 μ L. Provedeno je 15 ciklusa umnažanja, a svaki ciklus se sastojao od denaturacije dvolančane DNA 45 sekundi na 95⁰C, komplementarnog sparivanja PCR produkata 1 i 2 u regijama u kojima se preklapaju kroz 90 sekundi na 56⁰C i sinteze DNA u trajanju od 3 minute i 40 sekundi na 72⁰C. Na ovaj način je sintetiziran produkt u koji je unesena željena mutacija. Nakon toga je dobiveni produkt umnožen tako da su u reakcijsku smjesu dodane vanjske početnice (GalpromF i EcoRV SCW4) u koncentraciji od 0,05 pmol/ μ L i umnažanje je nastavljeno kroz 30 ciklusa u jednakim uvjetima. Dobiveni produkt (3. PCR fragment) pročišćen je izolacijom iz gela pomoću kita za izolaciju iz gela „QIAquick Gel Extraction Kit“ („Qiagen“, Valencia, CA,USA).



Slika 7. Unošenje mutacije u SCW4 gen metodom PCR-a-2. stupanj. Plavom i crvenom bojom označeni su dijelovi dobivenih fragmenata koji se nisu u prvom krugu sparili sa kalupom, a međusobno su komplementarni te je taj dio gena u sintetiziranom fragmentu pokazan zelenom bojom

3.2.10. Izolacija staničnih stijenki

Stanice kvasca odvojene su od podloge centrifugiranjem 5 minuta na 3000 o/min. Talog je ispran tri puta u 25 ml vode te zatim u 20 ml 50mM K-fosfatnog pufera pH 8.0, te su stanice resuspendirane u što manjem volumenu istog pufera. Zatim su stanice razbijene na vorteks mješalici uz dodatak staklenih kuglica promjera 0,4-0,6 mm tijekom 10 minuta uz povremeno hlađenje na ledu. Nakon rabijanja, stijenke su od staničnog ekstrakta odvojene centrifugiranjem 5 minuta na 3000 o/min. Talog staničnih stijenki ispran je četiri puta s 50mM K-fosfatnim puferom pH 8.0.

3.2.11. Izolacija nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Stanične stijenke su tretirane Laemmli puferom (50mM TRIS-HCl pufer pH 6.8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 0,001% bromfenol plavo i 5% beta-,erkaptoetanol) 10 minuta na temperaturi od 95-100 °C. Nakon centrifugiranja tretirane suspenzije stijenki, 5 minuta na 3000 o/min, odvojen je i sačuvan supernatant koji sadrži nekovalentno vezane proteine.

3.2.12. Izolacija kovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Nakon izolacije nekovalentno vezanih proteina, stijenke su tretirane s 50 µL 30 mM NaOH pri 4 °C preko noći. Nakon toga suspenzija je centrifugirana 5 minuta na 3000 o/min i odvojen je supernatant koji sadrži izolirane proteine.

3.2.13. SDS-elektroforeza po Laemmli-u

Proteini izolirani iz stijenke razdvojeni su SDS elektroforezom po Laemmli-u. Uzorci su pripremljeni tako da je volumenima od 20 µL SDS i NaOH ekstrakta proteina dodano 5 µL pufera za uzorke za elektroforezu po Laemmli-u (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 10% glicerol, 0,001% bromfenol plavo i 5% β-merkaptotanol). Uzorci su nanjeni na 10% poliakrilamidne ploče za elektroforezu.

Poliakrilamidne ploče za elektroforezu sastoje se od gornjeg gela za sabijanje i donjeg gela za razdvajanje. Sastav gela za sabijanje je : 4,5% akrilamida, 0,12% N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) i 7,5% amonij persulfata (APS) u 0,5 M TRIS-HCl puferu pH6.8. Sastav 10 % gela za razdvajanje je: 10 %akrilamida, 0,3% N,N'-metilenbisakrilamida, 0,1 % SDS-a, 0,05% TEMED i 5% APS u 1,5 M TRIS-HCl puferu pH 8,8. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu (25 mM TRIS-glicin pufer pH 6,8, 0,1% SDS) u aparatu za elektroforezu (Sigma) pri naponu od 200 V. Tijek elektroforeze praćen je migracijom boje brom fenol plavo, a elektroforeza je zaustavljena kada je boja dosegnula rub ploče.

3.2.14. Prijenos proteina na nitrocelulozu i njihovo specifično obilježavanje

Nakon završene elektroforeze proteini iz poliakrilamidnog gela elektroforetski su preneseni na nitroceluloznu membranu. Prijenos je proveden u natrij-karbonatnom puferu (10 mM NaHCO_3 , 3 mM Na_2CO_3 i 20 % metanol), uz stalnu jakost struje od 400 mA tijekom 75 minuta u za to namjenjenom uređaju (Hoefer Pharmacia Biotech Inc). Nakon završenog prijenosa nitroceluloza je bojena bojom Ponceau S (0,1% Ponceau S u 5%-tnoj očetnoj kiselini). Obojeni standardi označeni su grafitnom olovkom, a boja je isprana destiliranom vodom.

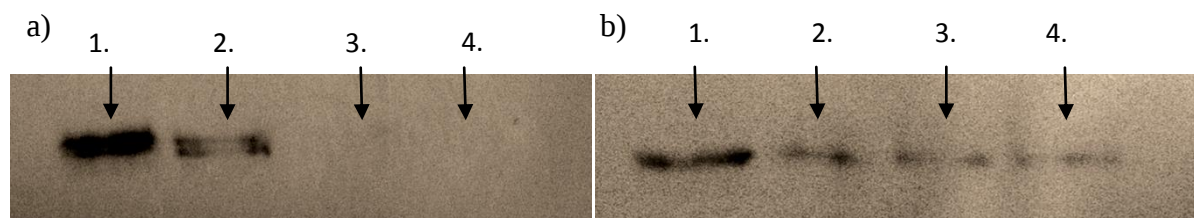
Za detekciju proteina označenih -HA oznakom, nitroceluloza je inkubirana na sobnoj temperaturi 45 minuta u puferu za blokiranje (50 mM TRIS-HCl pufer pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) uz dodatak 1% obranog mlijeka u prahu radi zasićenja membrane proteinima. Slijedila je inkubacija u puferu za blokiranje uz dodatak anti-HA antitijela (3 μL komercijalnog preparata u 10 ml pufera za blokiranje). Nakon 90 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi nitroceluloza je isprana tri puta po 15 minuta puferom za blokiranje. Na tako pripremljenu nitrocelulozu nanesen je 0,5mL Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048 otopine za razvijanje, a kemiluminiscencija je zabilježena na RTG-filmu. Duljina ekspozicije RTG-filma obično je bila prekonoćna.

4.REZULTATI

Jedan od ciljeva ovoga rada je potvrditi dvojak mehanizam ugradnje proteina Scw4p u staničnu stijenku kvasca. Tijekom dosadašnjih istraživanja proteina Scw4p ustanovljeno je da se ovaj protein iz stanične stijenke može ekstrahirati na dva načina: kuhanjem sa SDS-om i ekstrakcijom sa NaOH. Detekcija proteina i u frakciji kovalentno i u frakciji nekovalentno vezanih proteina upućuje na dvojak mehanizam vezanja Scw4p na staničnu stijenku. Pretpostavlja se kako mehanizam ugradnje ovisi o procesiranju proteina budući da se veća neprocesirana forma pretežno nalazi u frakciji kovalentno vezanih proteina, a manja procesirana u frakciji nekovalentno vezanih proteina (Stuparević, 2010). Pomoću NaOH se iz stanične stijenke kvasca ekstrahiraju PIR proteini koji posjeduju karakterističnu sekvencu koja je odgovorna za kovalentno vezanje. Budući da se i Scw4p može ekstrahirati na isti način kao i PIR proteini, ali ne posjeduje tu karakterističnu sekvencu postavlja se pitanje načina kovalentnog vezanja ovoga proteina. Pretraživanjem gena SCW4 pronađen je dio sekvence sličan karakterističnoj sekvenci PIR proteina te je drugi cilj ovoga rada bio pomoću PCR-metode tu sekvencu izbaciti iz gena kako bi se ustanovilo da li je ona odgovorna za kovalentno vezanje na staničnu stijenku.

4.1.Ispitivanje vezanja Scw4p u staničnu stijenku kvasca

Kako bi se potvrdili rezultati prijašnjih istraživanja kako se Scw4p veže i kovalentno i nekovalentno u stijenku kvasca, proveden je uzgoj kvasca te su zatim izolirani proteini stijenke ekstrakcijom sa vrućim SDS-om i ekstrakcijom sa NaOH. Kako bi se pokazalo da u stijenci nakon ekstrakcije sa vrućim SDS-om zaostaje određena količina kovalentno vezanog Scw4p proteina, ekstrakcija stijenki sa SDS-om ponovljena je 4 puta. Nakon svakog ponavljanja je izdvojen supernatant, a stijenke su ponovno podvrgnute ekstrakciji sa vrućim SDS-om. Na taj način su dobiveni alikvoti stijenki podvrgnuti različitom broju (1-4) uzastopnih ekstrakcija SDS-om. Nakon izolacije nekovalentnih proteina, stijenke su izložene prekonoćnom djelovanju 30mM NaOH kako bi se izolirali kovalentno vezani proteini. Nakon izolacije protein Scw4p-HAu uzorcima je detektiran pomoću reakcije hemaglutininskog ostatka (-HA) i specifičnih anti-HA antitijela „Western blot“ metodom kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode.

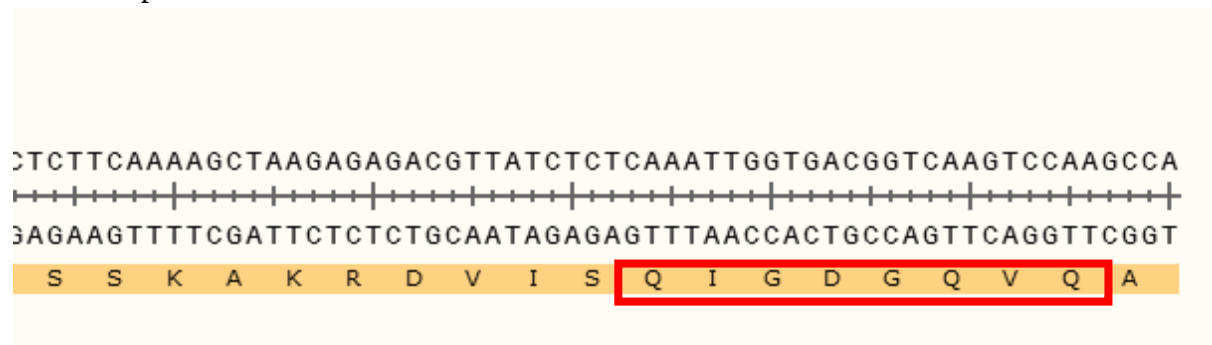


Slika 8. Western blot analiza Scw4p-HA ekstrahiranog iz stijenki pomoću (a) SDS-a i (b) NaOH. a) Uzorak: 1. Scw4p izoliran u prvom koraku SDS ekstrakcije; 2. Scw4p izoliran u drugom koraku SDS ekstrakcije; 3. Scw4p izoliran u trećem koraku SDS ekstrakcije (nema detektiranih proteina); 4. Scw4p izoliran u četvrtom koraku SDS ekstrakcije (nema detektiranih proteina); b) Scw4p izoliran pomoću NaOH nakon : 1. prvog koraka SDS ekstrakcije; 2. drugog koraka SDS ekstrakcije; 3. trećeg koraka SDS ekstrakcije; 4. četvrtog koraka SDS ekstrakcije

Rezultati (Slika 8.) pokazuju kako se količina Scw4p detektirana u SDS ekstraktu smanjuje sa brojem ekstrakcija stijenki. Kao što slika pokazuje najveća količina proteina je ekstrahirana tijekom prvog 10-minutnog izlaganja SDS-u, dok se nakon druge ekstrakcije stijenki SDS-om količina Scw4p smanjila, te nakon trećeg i četvrtog ponavljanja ekstrakcije u uzorcima nema detektiranih Scw4p proteina što znači da se sav nekovalentno vezani Scw4p ekstrahirao kroz prva dva koraka ekstrakcije stijenki vrućim SDS-om. Najveća količina kovalentno vezanog Scw4p (NaOH ekstrakt) je izolirana iz stijenki nakon prve ekstrakcije SDS-om. Kod stijenki koje su izložene višestrukim ekstrakcijama SDS-om, blot pokazuje kako je količina proteina u NaOH ekstraktu podjednaka neovisno o broju ponavljanja tretmana stijenki SDS-om. Time je potvrđeno kako se Scw4p uistinu veže i kovalentno i nekovalentno u staničnu stijenku kvasca što se slaže sa prethodno dobivenim rezultatima dobivenim u ovome laboratoriju.

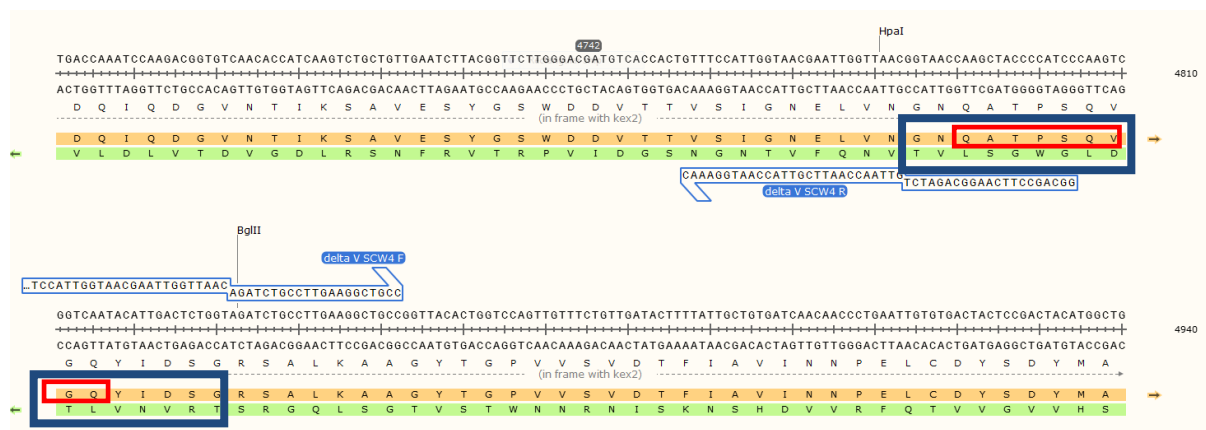
4.2. Delecija dijela gena SCW4sličnog PIR ponavljajućem motivu.

Prethodnim ispitivanjem potvrđeno je kako se Scw4p veže kovalentnom vezom u staničnu stijenku kvasca. S obzirom na to da se izolira istim načinom kao i proteini PIR-porodice pretpostavilo se kako se u stijenku i veže istim mehanizmom kao i PIR proteini. Specifično za PIR proteine je karakterističan dio sekvence odgovoran za kovalentno vezanje. Na slici 9. je prikazan taj karakteristični dio sekvence označen crvenim okvirom. Sekvenca je karakteristična po specifičnom rasporedu aminokiseline glutamina (Q). Između prve i druge glutaminske aminokiseline nalaze se još 4 različite aminokiseline i to: izoleucin (I), glicin (G), aspartat (D), i ponovno glicin (G), a između drugog i trećeg glutamina se nalazi aminokiselina valin (V). Ova sekvenca kao i raspored glutamina karakterističan je za sva četiri PIR proteina.



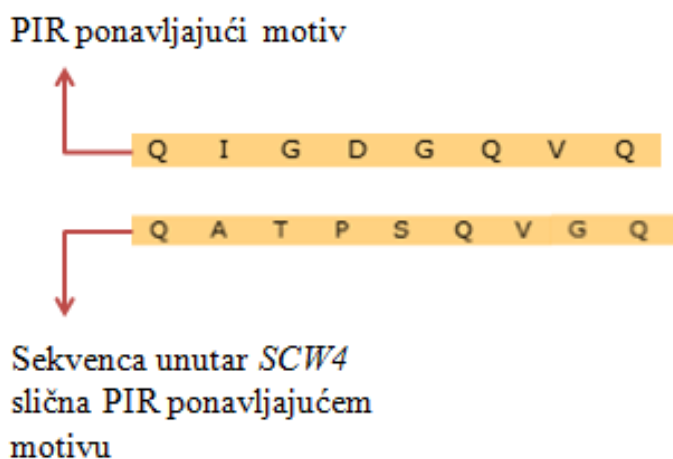
Slika 9. PIR ponavljajući motiv odgovoran za kovalentno vezanje PIR proteina u staničnu stijenku

Mehanizam kovalentnog vezanja Scw4p u stijenku je i dalje nepoznanica budući da ovakva sekvenca nije pronađena u genu za ovaj protein. No pronađen je dio sekvence sličan ovoj sekvenci, te je moguće da je ona odgovorna za kovalentno vezanje. Stoga je cilj ovoga rada izbaciti taj dio sekvence iz gena kako bi se provjerila njegova uloga u vezanju proteina u staničnu stijenku. To je učinjeno pomoću PCR-a kako je opisano u poglavlju Materijali i metode. Slika 10. pokazuje dio sekvence gena SCW4 za koju se pretpostavlja kako je odgovorna za kovalentno vezanje. Dio gena koji se želi izbaciti je dio za koji se početnice (delta V SCW4 R i delta V SCW4 F) nisu sparile sa kalupom i označen je plavim okvirom.



Slika 10. Dio sekvence gena *SCW4* sličan PIR ponavljajućem motivu, koji se izbacuje pomoću PCR metode „megapočetnice“. Plavim okvirom označen je dio koji se iz gena izbacuje, a crvenim okvirom označena je sekvenca slična PIR ponavljajućem motivu.

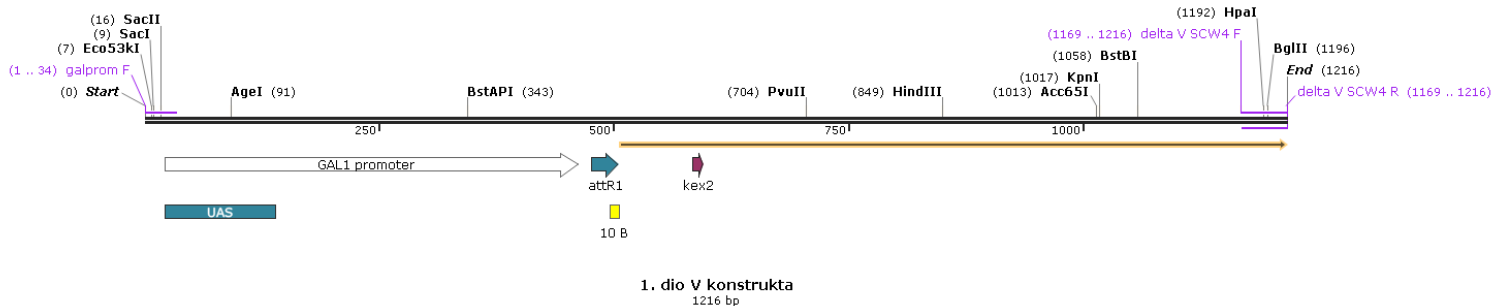
Kao što je vidljivo iz slike taj dio sekvence sadrži glutamine čiji je raspored sličan onome u sekvenci PIR proteina (označeno crvenim okvirom). Sekvenca također sadrži tri glutaminske aminokiseline te se između prve dvije također nalaze 4 aminokiseline, a to su: alanin (A), treonin (T), prolin (P) i serin (S). Još jedna razlika je što se između druge i treće glutaminske kiseline ne nalazi samo jedna aminokiselina (valin kod PIR proteina) nego dvije aminokiseline (valin i glicin). Budući da je to jedina sekvenca u genu *SCW4* koja je brojem i rasporedom glutamata slična sekvenci PIR proteina odgovornoj za kovalentno vezanje, pretpostavljeno je da bi ona mogla biti odgovorna za kovalentno vezanje Scw4p u staničnu stijenk. Na Slici 11. prikazane su spomenute sekvence jedna ispod druge kako bi se uočila navedena sličnost. Kao što je vidljivo na slici usporedbom ove dvije sekvence uočljiva je sličnost u rasporedu tri prisutna glutamina (aminokiselina Q).



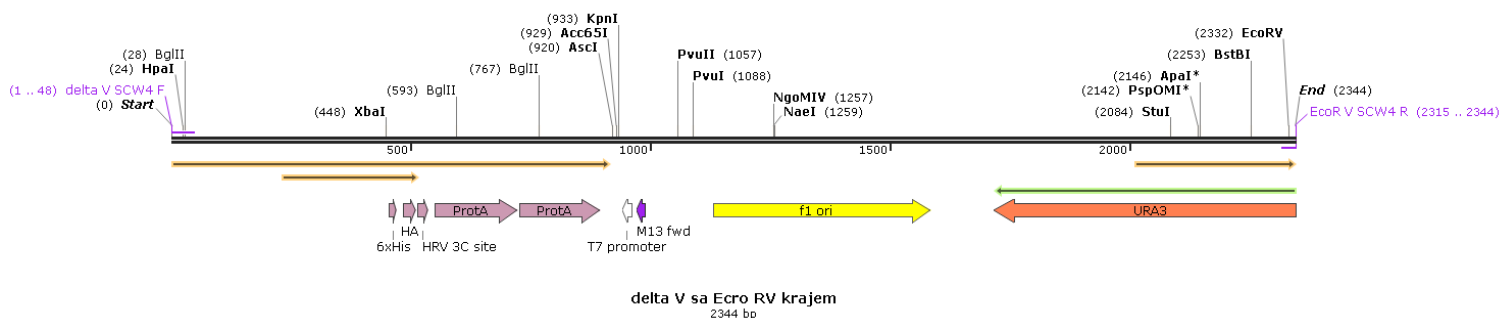
Slika 11. Usporedba PIR ponavljajućeg motiva sa sekvencom sličnom tom motivu iz gena *SCW4*

4.2.1. UVOĐENJE DELECije

Polazeći od pretpostavke kako je taj dio sekvence odgovoran za kovalentno vezanje, u sljedećem je koraku provedena delecija pomoću PCR metode „megapočetnice“. U prvom krugu PCR-a korištene su početnice „GalpromF“ i „delta V SCW4 R“ te „delta V SCW4 F“ i „EcoRV SCW4 R“. Time su dobiveni prvi i drugi dio konstrukta delta V koje prikazuju Slike 12. i 13.

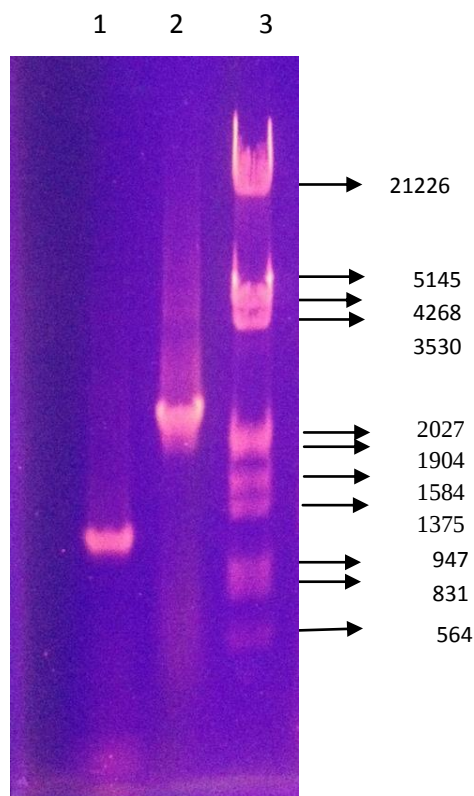


Slika 12. 1.dio ΔV konstrukta dobiven korištenjem početnica „GalPromF“ i „delta V SCW4 R“



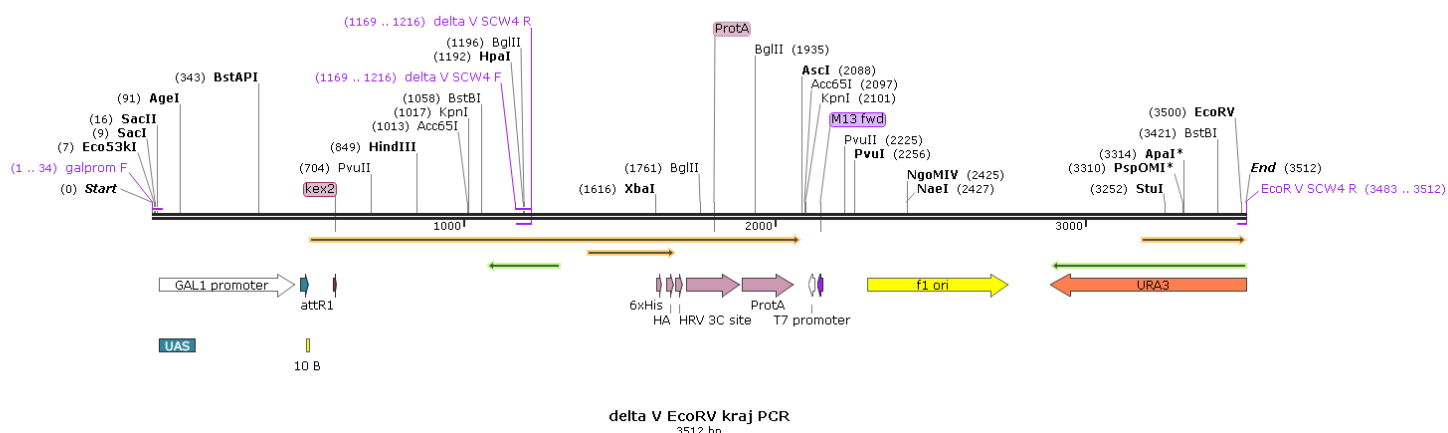
Slika 13.2. dio ΔV konstrukta dobiven korištenjem početnica „delta V SCW4 F“ i „EcoRV SCW4 R“

Slike prikazuju i veličine fragmenata: 1.dio konstrukta je veličine 1216pb, a 2.dio konstrukta 2344pb. Kako bi se potvrdilo da su PCR-om dobiveni upravo ovi konstrukti provedena je elektroforeza u agaroznom gelu, te je veličina dobivenih konstrukata uspoređena sa standardom (Slika 14).



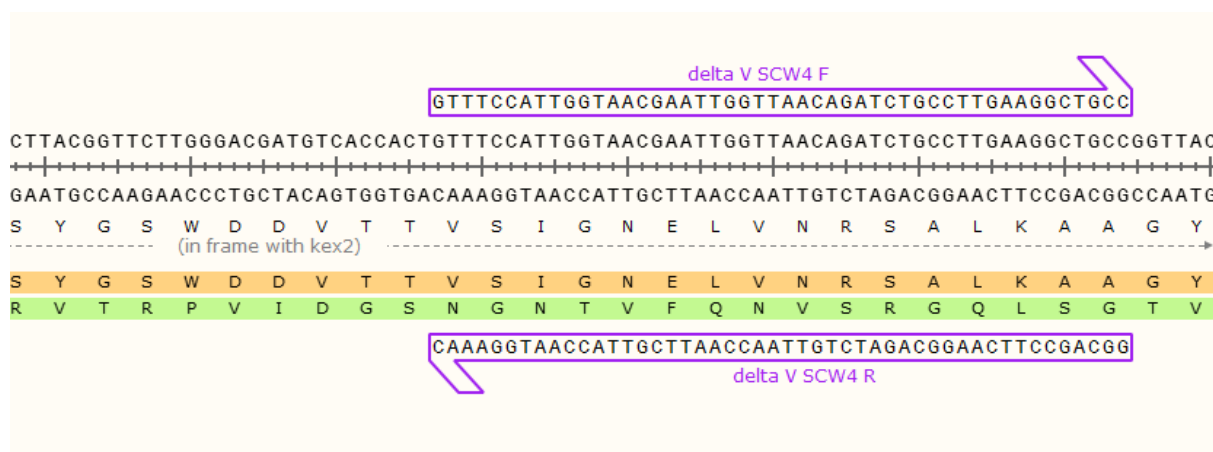
Slika 14. Elektroforetska analiza fragmenata dobivenih 1. krugom PCR-a. Uzorak: **1.** 1. dio ΔV konstrukta **2.** 2. dio ΔV konstrukta **3.** Standard tj. λ HindIII i EcoRV

Nakon pročišćavanja pomoću kita za pročišćavanje PCR produkata (Materijali i metode), uslijedio je drugi krug PCR-a u kojem su korištene početnice „GalpromF“ i „EcoRV SCW R“ te u kojem je dobiven konstrukt koji ima deletiran željeni dio sekvence. Uspješnost delecije u PCR produktu $\Delta VSCW4$ potvrđena je gel elektroforezom odnosno usporedbom veličine dobivenog fragmenta sa standardom. Slika 15. pokazuje PCR konstrukt $\Delta VSCW4$ te njegovu veličinu od 3512 pb.



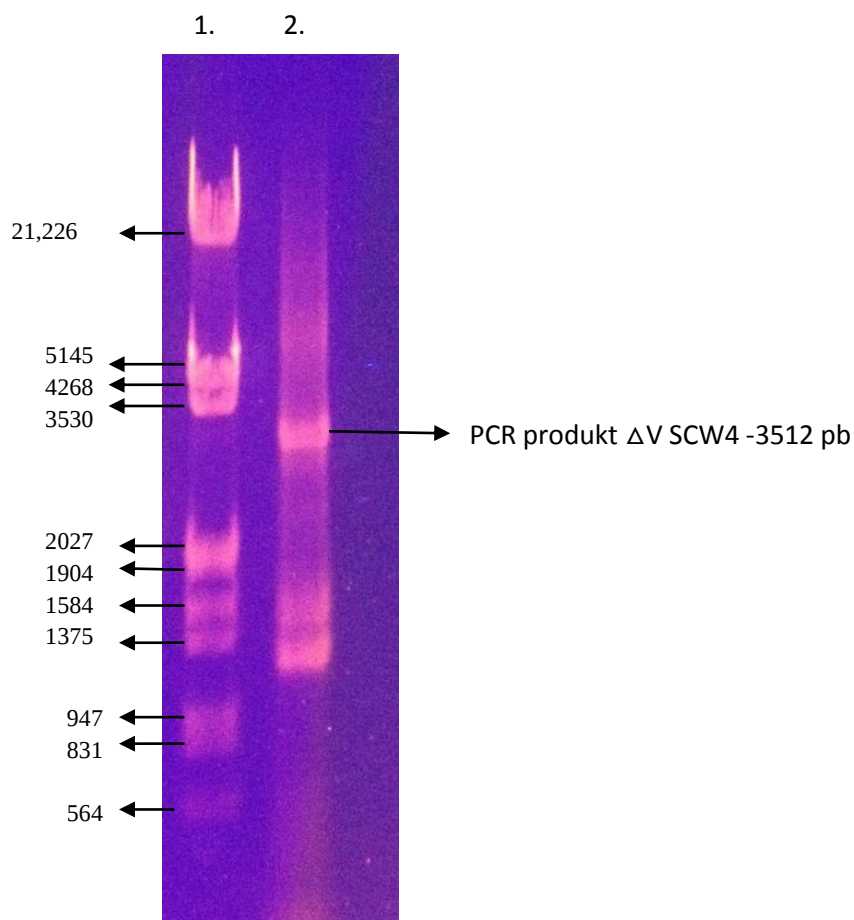
Slika 15. PCR produkt ΔV SCW4 sa deletiranom sekvencom od 50 pb.

Dobiveni konstrukt ima deletiranu regiju od 48 pb unutar koje se nalazi sekvenca za koju se pretpostavlja da je odgovorna za kovalentno vezanje. Dobiveni konstrukt sadrži sekvencu prikazanu na Slici 16. na kojoj je vidljivo kako ne sadrži ranije spominjanu regiju sa Q aminokiselinama, te također prikazuje kako se u drugom krugu PCR-a početnice u potpunosti sparuju kako je objašnjeno u poglavlju Materijali i metode.



Slika 16. Konstrukt ΔV SCW4.

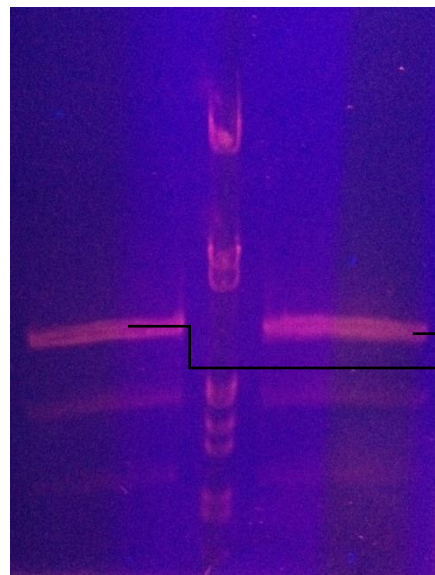
Kao što slika elektroforetske analize (slika 17.) pokazuje zbog nespecifičnog spajanja uz željeni fragment umnožena su i dva fragmenta manjih veličina. Zbog toga je željeni fragment od 3512 pb izrezan i izoliran iz gela kako je opisano u poglavlju Materijali i metode.



Slika 17. Elektroforetska analiza 2.kruga PCR-a. Uzorak: 1. Standard Λ 2. PCR produkti drugog kruga PCR-a.

Nakon izolacije iz gela te elektroforetske provjere uspješnosti izolacije provedena je TA ligacija u plazmid pGEM-T Easy Vector kako je opisano u „Materijali i metode“. Transformanti su najprije uzgajani na krutoj hranjivoj podlozi sa ampicilinom, a zatim su odabrane kolonije uzgojene u tekućoj podlozi koja je također sadržavala ampicilin. Nakon toga je plazmidna DNA iz *E.coli* izolirana pomoću kita za „mini-prep“ (Materijali i metode). Sljedeći korak je bio restrikcija dobivenih plazmida sa enzimima SacI i EcoRV kako bi se iz plazmida izrezao umetnuti fragment, ali sa krajevima pogodnim za ligaciju u plazmid pBG1805SCW4 koji je također podvrgnut restrikciji sa EcoRV i SacI. Nakon restrikcije plazmidne DNA cijeli volumen restrikcijske smjese je stavljen na gel elektroforezu kako bi se izolirao željeni fragment. Slika 18. pokazuje željeni fragment veličine 3512 pb izrezan navedenim enzimima.

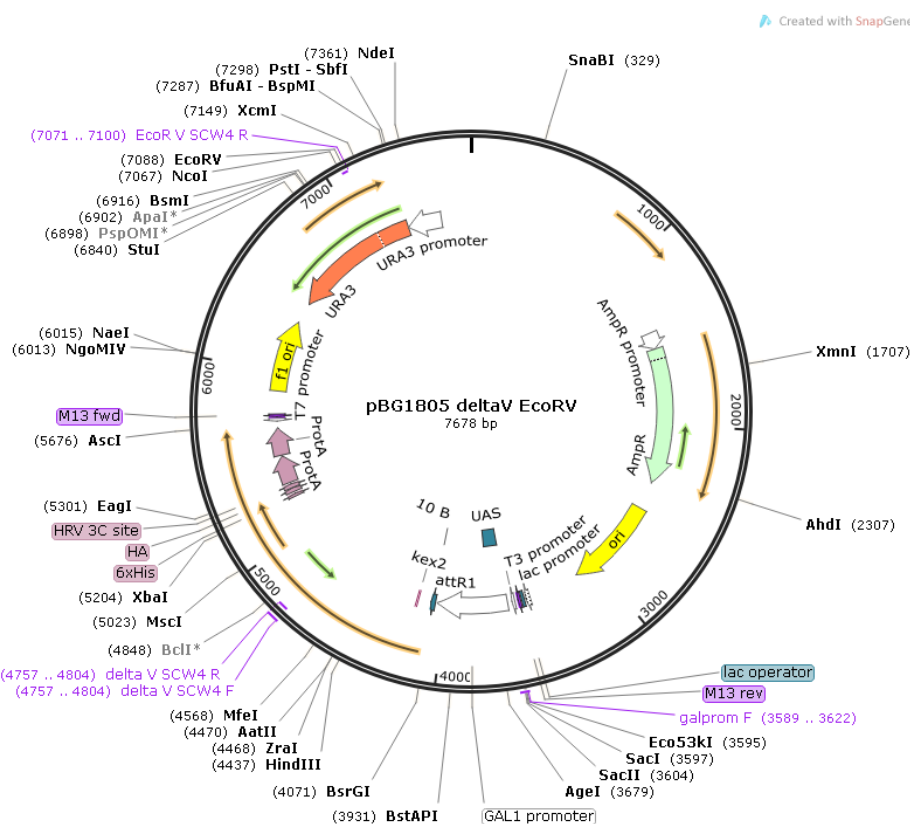
plazmid standard plazmid



Odgovarajući
fragment koji se izolira
iz gela

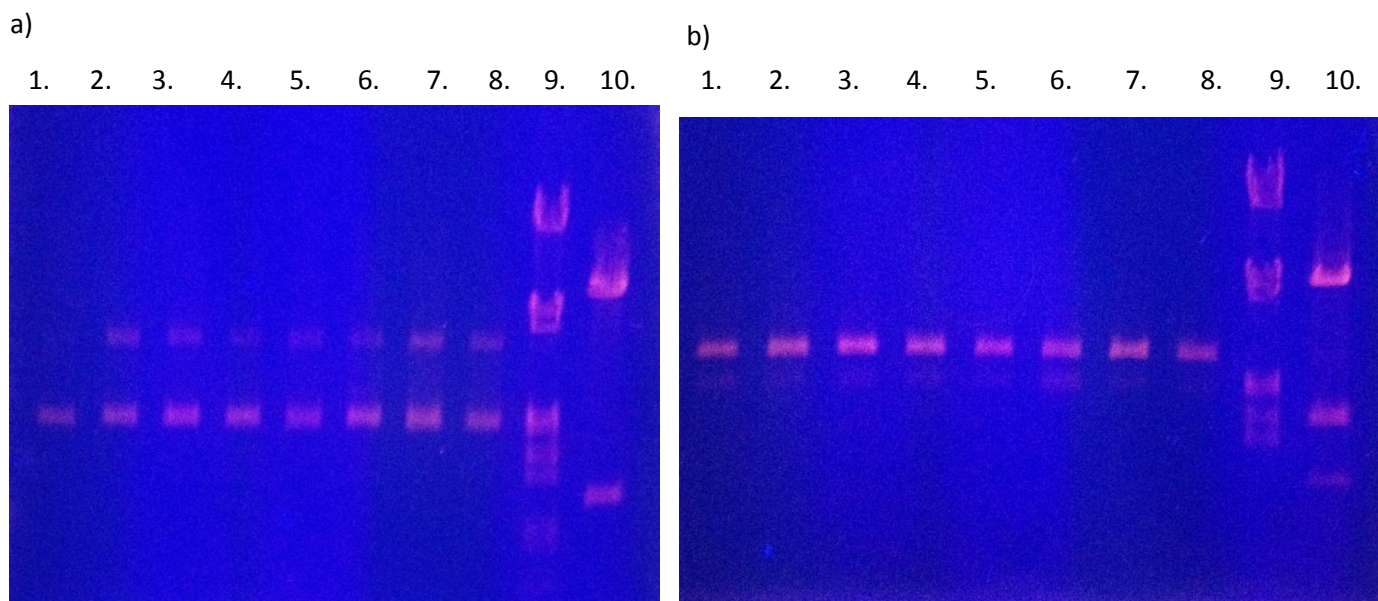
Slika 18. Restrikcija plazmida dobivenog TA ligacijom sa SacI i EcoRV

Nakon izolacije željenog fragmenta iz gela („Materijali i metode“) slijedila je ligacija sa odgovarajućim fragmentom plazmida pBG1805 SCW4 dobivenog restrikcijom sa SacI i EcoRV („Materijali i metode“). Nakon ligacije i transformacije kompetentnih stanica *E.coli* ligacijskom smjesom, transformanti su uzgojeni na krutoj podlozi , a potom su odabrane kolonije uzgojene i na tekućoj podlozi koja je sadržavala ampicilin, i zatim je napravljen „mini-prep“ kako bi se izolirala plazmidna DNA.



Slika 19. Plazmid pBG1805 SCW4 sa unesenom mutacijom

Zatim je napravljena restrikcijska analiza dobivenog plazmida enzimom KpnI i enzimom PvuII kako bi se provjerila uspješnost ligacije željenog fragmenta u plazmid. Slika 20. pokazuje fragmente dobivene restrikcijom koji veličinama ne odgovaraju fragmentima koji su se trebali dobiti restrikcijom sa ovim enzimima. Restrikcijom sa KpnI trebali su se dobiti fragmenti veličine 6594 i 1084 pb, a restrikcijom sa PvuII fragmenti veličine 5240, 1521 i 917 pb. Iz prikazanog se može zaključiti kako ligacija željenog fragmenta u plazmid nije uspjela te se nije dobio plazmid pBG1805SCW4 sa unešenom željenom mutacijom (Slika 19.).



Slika 20. Elektroforetska analiza fragmenata dobivenih restrikcijom plazmidne DNA izolirane „mini prepom“ iz transformiranih stanica *E. coli* sa a) restrikcijskim enzimom KpnI; Uzorak: 1-8. Plazmidna DNA izolirana „mini prepom“ iz odabranih kolonija *E. coli* označenih brojevima od 1-8. 9. standard 10. originalni plazmid pBG1805 SCW4 i b) restrikcijskim enzimom PvuII; Uzorak: 1-8. Plazmidna DNA izolirana „mini prepom“ iz odabranih kolonija *E. coli* označenih brojevima od 1-8. 9. Standard 10. Originalni plazmid pBG1805 SCW4

5. RASPRAVA

Kao modelni organizam u ovome radu je korišten kvasac *S. Cerevisiae* koji se zbog svojih povoljnih karakteristika tradicionalno koristi za proučavanje biokemijskih procesa u eukariotskim stanicama, a u središtu samoga rada je protein njegove stanične stijenke Scw4p. Stanična stijenka kvasca je složena ekstracelularna organela koja svojom čvrstoćom i elastičnošću pruža stanici fizičku zaštitu te joj određuje oblik. Staničnu stijenkiju izgrađuju polisaharidi glukan i hitin te oko tridesetak različitih manoproteina za koje se pretpostavlja da sudjeluju u izgradnji i promjenama stijenke tijekom rasta. Funkcija većine proteina stijenke i dalje je nepoznata, a zanimljivo je kako od svih identificiranih proteina niti jedan nije esencijalan za stanicu. Proteini se u staničnu stijenkiju ugrađuju putem najmanje tri mehanizma, a dijele se na kovalentno vezane proteine i proteine koji su nekovalentno vezani na polisaharde stanične stijenke. Proteini sa pretežito glikozidaznom ili transglikozidaznom aktivnošću su nekovalentno vezani te se iz stijenke mogu izolirati tretmanom sa vrućim SDS-om u reducirajućim uvjetima (Mrša i sur., 1997). Kovalentno vezani proteini se mogu podijeliti na još dvije podskupine prema načinu vezanja u stijenkiju. Prvu skupinu čine proteini vezani putem ostatka GPI sidra, a izoliraju se jedino pomoću pripravaka glukanaza. Drugu skupinu kovalentno vezanih proteina čine proteini vezani esterskom vezom između γ -karboksilne skupine glutaminske kiseline i hidroksilne grupe glukoze, a pripadaju PIR porodici proteina. Ova skupina proteina se izolira prekonoćnom inkubacijom u 30 mM NaOH na +4°C. Protein Scw4p je najprije detektiran među nekovalentno vezanim proteinima stijenke (Mrša i sur., 1997). No daljnim istraživanjima zamijećeno je kako i nakon disrupcije sva četiri PIR gena u NaOH ekstraktu stijenke četverostrukog *pir* mutanta zaostaje proteinska vrpca veličine 67 kDa što odgovara molekulskoj masi proteina Scw4p i Scw10p. Disrupcijom *SCW4* gena u četverostrukom *pir* mutantu potvrđeno je kako je zaostali protein u NaOH ekstraktu Scw4p što upućuje na dvostruki način vezanja ovoga proteina u staničnu stijenkiju kvasca.

Kako bi se potvrdilo da je Scw4p detektiran u NaOH ekstraktu stvarno kovalentno vezani protein, a ne eventualno zaostali nekovalentno vezani Scw4p usljed nepotpune ekstrakcije stijenke SDS-om, u ovom radu proveden je uzgoj kvasca transformiranog plazmidom pBG1805 koji sadrži gen *SCW4* pod kontrolom jakog inducibilnog GAL promotora što omogućuje prekomjernu produkciju proteina Scw4p u uvjetima uzgoja na galaktozi. Iza gena *SCW4* se nalazi hemaglutininski nastavak (-HA) koji omogućava detekciju proteina sa specifičnim antitijelima za taj nastavak Western blot metodom. Nakon uzgoja uslijedilo je razbijanje stanica i izolacija proteina stanične stijenke kvasca. Vrućim SDS-om izdvojeni su nekovalentno vezani proteini. Stijenke su podvrgnute višestrukoj ekstrakciji vrućim SDS-om kao što je opisano u poglavlju „Rezultati“. Zatim su iz stijenke izolirani kovalentno vezani proteini pomoću 30 mM NaOH. Nakon izolacije Scw4p je detektiran Western blot metodom („Materijali i metode“). Rezultati su pokazali kako su nakon dva uzastopna tretmana stijenke vrućim SDS-om izolirani svi nekovalentno vezani Scw4p proteini, dok se u NaOH ekstraktu detektira podjednaka količina kovalentno vezane forme proteina Scw4p bez obzira na broj provedenih uzastopnih ekstrakcija stijenke SDS-om (Slika 8.). Time je potvrđeno kako se Scw4p u staničnu stijenkiju uistinu veže i kovalentno i nekovalentno.

Prema rezultatima prijašnjih istraživanja načina ugradnje Scw4p u stijenku pretpostavlja se da je različit način ugradnje posljedica različitog procesiranja ovoga proteina.

Budući da se kovalentno vezani Scw4p iz stijenke izolira pomoću 30 mM NaOH odnosno na isti način kao i PIR proteini pretpostavilo se kako je mehanizam kovalentne ugradnje proteina također isti. Za proteine PIR porodice je karakteristično da pokazuju visoki stupanj homologije te sadrže specifičnu sekvencu odgovornu za kovalentno vezanje (Slika 9.). PIR ponavljajući motiv sadrži tri glutamata koji su bitni za kovalentno vezanje proteina u stijenku. Između prvog i drugog glutamata nalaze se još 4 aminokiseline i to redom: izoleucin, glicin, aspartat i ponovno glicin. Između drugog i trećeg glutamata nalazi se samo jedna aminokiselina i to valin. Budući da Scw4p ne sadrži ovakav PIR ponavljajući motiv upućuje na to da postoji još jedan, četvrti način vezanja proteina u stijenku (Mrša i sur., 1999; Teparić i sur., 2010). Unatoč tome što u genu *SCW4* nije pronađen PIR ponavljajući motiv pronađena je sekvenca koja nalikuje na tu specifičnu sekvencu kao što je prikazano na Slici 11. Sekvenca unutar gena *SCW4* također sadrži tri glutamata u veoma sličnom rasporedu kao kod PIR ponavljajućeg motiva. Razlika je u četiri aminokiseline koje se nalaze između prvog i drugog glutamata koje su različite od onih koje se pojavljuju u PIR motivu (u *SCW4* to su: alanin, treonin, prolin, serin), kao i u tome da se uz valin između drugog i trećeg glutamata pojavljuje i glicin. Kako bi se ispitalo ima li ta sekvenca ulogu u kovalentnom vezanju Scw4p proteina, pomoću PCR metode deletirano je 48 parova baza kako bi se izbacila iz gena. Mutacija je unesena pomoću PCR metode „megapočetnice“ u dva koraka. U prvom koraku korištene su početnice koje se djelomično sparuju sa kalupom na način da se ne sparuju u regiji koju želimo deletirati, no ti dijelovi početnica su međusobno komplementarni što omogućuje daljnje umnožavanje produkta u drugom koraku PCR metode, ali sada bez dijela sekvence koji smo željeli izbaciti. Zatim je takav konstrukt (nazvan ΔV) ligiran u plazmid pGEM-T-Easy TA ligacijom, plazmid je umnožen i izoliran („miniprep“-Materijali i metode), a zatim je fragment sa unesenom mutacijom iz plazmida izrezan restriksijskim enzimima EcoRV i SacI. Plazmid pBG1805 *SCW4* također je podvrgnut restrikciji sa enzimima EcoRV i SacI kako bi se iz originalnog plazmida izrezao dio koji želimo zamijeniti pripremljenim fragmentom sa unesenom mutacijom. Kako su i plazmid i konstrukt posječeni istim restriksijskim enzimima sadrže odgovarajuće ljepljive krajeve što omogućuje njihovu ligaciju. Unatoč tome ligacija nije uspjela te u ovom radu željeni fragment nije ubačen u plazmid pBG1805 *SCW4*. U daljnjem radu potrebno je ponoviti ligaciju fragmenta plazmida pBG1805 *SCW4*, te dobiveni plazmid sa unesenom mutacijom iskoristiti za transformaciju kvasca kako bi se analizirao efekt mutacije. Da bi se to postiglo potrebno je transformirani kvasca uzgojiti u uvjetima prekomjerne sinteze proteina Scw4p, a zatim proteine izolirati pomoću SDS-a i NaOH, te ih analizirati Western blot metodom kako je opisano u poglavlju „Materijali i metode“. Ukoliko bi rezultati pokazali da NaOH ekstrakt ne sadrži proteine to bi potvrdilo da je ova sekvenca odgovorna za kovalentno vezanje proteina u stijenku. Ako bi pak u NaOH ekstraktu bilo proteina to bi značilo kako izbačena sekvenca ne sudjeluje u kovalentnom vezanju proteina, već je za to odgovorna neka druga sekvenca unutar *SCW4* gena.

6. ZAKLJUČCI

Scw4p je vezan u staničnu stijenku na dva načina, kovalentno i nekovalentno.

Delecija dijela gena *SCW4* je uspješno provedena upotrebom PCR metode „megapočetnice“.

7. POPIS LITERATURE

- Ash, J., Dominguez, M., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y., Bourbonnais, Y. (1995) The yeast proprotein convertase encoded by YAP3 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein that localizes to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **259**, 878-883
- Brenner, C., Fuller, R.S. (1992) Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 922-926.
- Brickner, J. H, Fuller, R.S. (1997) SOI1 encodes a novel, conserved protein that promotes TGN-endosomal cycling of Kex2p and other membrane proteins by modulating the function of two TGN localization signals. *J. Cell Biol.* **139**, 3-36.
- 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. *J. Biol. Chem.* **276**, 19679-29682
- Cabib, E., Duran, A. (2005) Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J. Biol. Chem.* **280**: 9170-9179
- Cappellaro, C., Mersa, V. And Tanner, W. (1998) New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J. Bacteriol.* **180**, 5030-5037
- Cawley, N.X., Olsen, V., Zhang, C.F., Chen, H C., Tan, M., Loh, Y.P. (1998) Activation and processing of non-anchored yapsin 1 (Yap3p). *J. Biol. Chem.* **273**, 584-591.
- Cid, V. J., A. Duran, F. Rey, M.P. Snyder, C. Nombela *et al.*(1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* Microbiol. Rev. **59**: 345-386
- De Groot, P. W., Ram, A. F., and Klis, F. M. (2005) *Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls Fungal Genet. Biol.* **42**, 657–675
- Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrša, V., Tanner, W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J. Biol. Chem.* **281**(17), 11523-11529.
- Fleet, G.H., (1991) Cell wall. U: *The Yeasts* (Rose, A.H., Harrison, J.S.), Academic Press, London, str. 199-277
- Fuller, R.S., Brake, A., Thorner, J. (1989a) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**,1434-1438.
- Fuller, R.S., Brake, A., Thorner, J. (1989b) Intracellular targeting and structural conservation of a pro-hormone processing endoprotease. *Science* **246**,482-486.
- Garcia-Rodriguez, L.J., Duran, A. And Roncero, C. (2000)Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J. Bacteriol.* **182**, 2428-2437
- Germain, D., Thomas, D., Boileau, G. (1993) Processing of Kex2 pro-region at two interchangeable cleavage sites. *FEBS Lett.***323**, 129-131
- Griffiths, G., Simons, K. (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science***234**, 438-443

- Hasilik, A. (1992) The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. *Experientia* **48**, 130-151.
- 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. *J. Cell Biol.* **176**, 209-222.
- Julius, D, Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., Thorner, J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* **37**, 1075-89.
- Jung U.S. and Levin D.E. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.* **34**, 1049-1057
- Klis, F.M. et al. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185-22
- Klis, F.,M., et al. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185-202.
- Komano, H., Fuller, R.S. (1995) Shared functions in-vivo of a glycosyl-phosphatidylinositol linked aspartyl protease, Mkc7, and the proprotein processing protease Kex2 in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10752-10756
- 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.
- Lesage, G., Bussey, H. (2006) Cell Wall Assembly in *Sacharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 318-322
- Lipke, P. N., Ovalie, R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**, 3735-3740.
- 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. *J. Biol. Chem.* **269**, 19338-19342
- Mrša, V., Seidl, T., Gentzsch, M., Tanner, W. (1997) Specific labeling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1145-1154.
- Mrša, V., Tanner, W. (1999) role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of PIR protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **15**, 813-820.
- 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.
- Orlean, P. (1997) The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Pringle, J.R., Broach, J.R., Jones, E.W.) Vol. 3, Cold Spring Harbor, NY, 229.

- Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M., Nicaud, J. M. (2000) Characterization of extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolitica*. *J. Bacteriol.* **182**, 2802-2810.
- Rockwell, N.C., Thorner, J.W. (2004.) The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends. Biochem. Sci.* **29**, 80-87
- Ruiz-Herrera, J. (1992) Fungal Cell Wall: Structure, synthesis and assembly. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., Moxham, K.E., Middelberg, A.P. (2000) The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **97**, 9871-9874.
- Spellman, P.T., Sherloc, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., Fucter, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3273-3297
- Stuparević, I. (2010) Identifikacija i uloga proteina stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izoliranih alkalnom ekstrakcijom. Doktorska dizertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
- Šestak, S., Hagen, I., Tanner, W., Strahl, S. (2004) Scw10p, a cell wall glucanase/transglucosidase important for cell wall stability in *Sacharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **150**, 3197-3208
- Teparić, R. i sur., (2010) Proteins in the *S.cerevisiae* Cell Wall. *Food Technol.Biotechnol.* **48**,317-328.
- Teparić, R. (2005) Proteini stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: mehanizam ugradnje u stijenk u i moguće fiziološke funkcije. *Doktorska disertacija*, Sveučilište u Zagrebu.
- 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.
- Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K. and Kitada, K., (2000) Upregulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 64-74
- Wilcox, C.A., Fuller, R.S. (1991) Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *J. Cell. Biol.* **115**, 297-307
- Wosten, H.A., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Bolker, M., Kahmann, R. (1996) A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **15**, 4274-4281

