Utjecaj prekomjerne sinteze proteina stanične stijenke Scw4p na fenotip kvasca S. cerevisiae

Miškić, Terezija

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

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:159:311458

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Terezija Miškić
6501/N

Utjecaj prekomjerne sinteze proteina stanične stijenke Scw4p na fenotip kvasca *S. cerevisiae*

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biokemija

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

Zagreb, 2014.

Zagreb, 2014.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Utjecaj prekomjerne sinteze proteina stanične stijenke Scw4p na fenotip kvasca *S. cerevisiae*

Terezija Miškić, 6501/N

Sažetak: Protein Scw4p je jedan od najzastupljenijih nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke, čija fiziološka uloga u stijenci još uvijek nije poznata. U ovom radu je ispitivana potencijalna fiziološka uloga Scw4p ispitivanjem fenotipskih karakteristika mutiranih stanica kvasaca koje sintetiziraju povećanu količinu tog proteina. Prekomjerna sinteza Scw4p u stanicama divljeg tipa kvasca, *kex2* mutanta i japsinskog mutanta dovodi do smanjenja viabilnosti stanica sva tri soja kvasca, pri čemu je veće smanjenje viabilnosti postignuto pri pH=4 nego pri pH=7. Prekomjerna sinteza Scw4p u stanicama divljeg tipa kvasca i japsinskog mutanta dovodi do povećanja osjetljivosti na djelovanje zimolijaze, dok kod stanica *kex2* mutanta nema efekta. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da protein Scw4p djeluje kao glukanaza, jer pri njegovoj povećanoj sintezi dolazi do pada vijabilnosti i povećanja osjetljivosti stanica na djelovanje hidrolitičkih enzima iz okoline. Enzimski aktivna je procesirana forma Scw4p, pri čemu se jači efekt aktivacije postiže djelovanjem Kex2p proteaze, a slabiji djelovanjem japsinskih proteaza.

Ključne riječi: stanična stijenka kvasca, Scw4p, Kex2p, japsinske proteaze
Rad sadrži: 22 stranica,8 slika,1 tablica,15 literaturnih navoda, 0 priloga
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

Rad predan: lipanj 2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition
Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for biochemistry

The effect of over-expression of cell wall *Scw4p* protein on *S. cerevisiae* phenotype charateristics

Terezija Miškić, 6501/N

Abstract: One of the most abundant noncovalently linked cell wall proteins is Scw4p and its role in the cell wall has not yet been discovered. This paper examines the potential physiological role of this protein. The phenotype characteristics of mutant yeast cells that over-express Scw4p protein are questioned. The over-expression of Scw4p in wild type yeast cells, in *kex2* mutant cells, and in yapsin mutants lowers the viability of every type of yeast cell. Greater infuluence of decreasing viability was achieved under pH=4 than under pH=7 conditions. Also, the over-expression of Scw4p in wild type yeast cells and in yapsin mutants increases the sensibility to zymoliase treatment and there is no effect at all in *kex2* mutants. Such results indicate that protein Scw4p has glucanase activity and its active form is a processed form, wherein a greater activation effect is achieved with Kex2p proteases and lower one with yapsine proteases.

Keywords: yeast cell wall, Scw4p protein, Kex2p, yapsine proteins
Thesis contains: 22 pages, 8 figures, 1 tables, 15 references, 0 supplements
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: PhD. Renata Teparić, Associate professor

Thesis delivered: June, 2014

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. LITERATURNI PREGLED 2

2.1 Građa stanične stijenke kvasaca 2

2.2. Proteini stanične stijenke 3

2.2.1. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke 4

2.2.2 Proteini stijenke vezani preko ostatka GPI sidra 4

2.2.3. Pir proteini 6

2.3. Protein Scw4p 6

2.4. Ispitivanje fiziološke uloge proteina stijenke 7

3. EKSPERIMENTALNI DIO 9

3.1. MATERIJALI 9

3.1.1. Kemikalije 9

3.1.2. Hranjive podloge i uvjeti uzgoja kvasca 9

3.1.3. Sojevi kvasaca 10

3.2. METODE 10

3.2.1. Indukcija gena pod kontrolom promotora za galaktozidazu 10

3.2.2. Bojanje stanica metilenskim modrilom 10

3.2.3. Ispitivanje osjetljivosti stanica kvasca na djelovanje zimolijaze 11

4. REZULTATI 12

4.1. Ispitivanje utjecaja povećane sinteze Scw4p na vijabilnost stanica divljeg tipa, *kex2* mutanta i japsinskog mutanta pri pH4 13

4.2. Ispitivanje utjecaja povećane sinteze Scw4p na vijabilnost stanica divljeg tipa, *kex2* mutanta i japsinskog mutanta pri pH7 14

4.3. Ispitivanje utjecaja povećane sinteze Scw4p na osjetljivosti stanica divljeg tipa, *kex2* mutanta i japsinskog mutanta na djelovanje zimolijaze 15

5. RASPRAVA 17

6. ZAKLJUČCI 20

7. POPIS LITERATURE 21

1. UVOD

Protein Scw4p je jedan od najzastupljenijih nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke. Fiziološka uloga ovog proteina u staničnoj stijenci još uvijek nije poznata. Cappellaro i sur. (1998) su objavili da stanice *scw4scw10* mutanta, kojima je deletiran gen za protein Scw4p i njegov strukturni analog Scw10p, rastu sporije i oslobađaju puno više proteina iz stijenke djelovanjem DTT-a, da su osjetljiviji na djelovanje inhibitora sinteze stijenke i da imaju defekt u parenju. Sve ove karakteristike ukazuju na oslabljenost stijenke, tj. na promjene u strukturi glukana ovog mutanta. U ovom radu su u svrhu daljnjeg ispitivanja moguće fiziološke uloge Scw4p korištene stanice mutanata koje produciraju prekomjernu količinu Scw4p. To je postignuto tako da je u stanice kvasca unesen gen *SCW4* pod kontrolom promotora za galaktozidazu na plazmidu pBG1805 koji se u stanici umnožava u velikom broju kopija, pa se posljedično i protein Scw4p u stanici sintetizira u velikom broju kopija i to samo u uvjetima uzgoja na galaktozi kao jedinom izvoru ugljika, dok tijekom uzgoja na glukozi stanice sintetiziraju normalnu količinu Scw4p. Budući da se pretpostavlja da Scw4p ima ulogu u remodeliranju glukanskog sloja stijenke očekuje se da se njegov suvišak odrazi na vijabilnosti stanica i/ili na njihovu otpornost prema djelovanju enzima za razgradnju glukanskog sloja stijenke. U dosadašnjim ispitivanjima provedenim u ovom laboratoriju je ustanovljeno da se protein Scw4p u stijenci nalazi u dvije forme koje se razlikuju po molekulskoj masi. Pretpostavlja se da forma proteina manje molekulske mase podliježe procesiranju koje vrši Kex2p proteaza ili japsinske proteaze. Osim toga je ustanovljeno da pH podloge utječe na procesiranje Scw4p, tako da pri pH 4 prevladava procesirana forma proteina, dok je kod pH 7 veći udio neprocesirane forme proteina, pogotovo u stanicama *kex2* i *5ypsΔ* mutanata, kojima nedostaju geni za Kex2p proteazu, odnosno za jaspinske proteaze. Pretpostavlja se da bi procesiranje osim na način vezanja moglo utjecati i na aktivnost Scw4p. U ovom radu je ispitivan utjecaj prekomjerne produkcije proteina Scw4p na stabilnost stanične stijenke divljeg tipa kvasca (wt) te mutanta *kex2* i *5ypsΔ* praćenjem vijabilnosti i osjetljivosti stanica na djelovanje hidrolitičkog enzima zimolijaze.

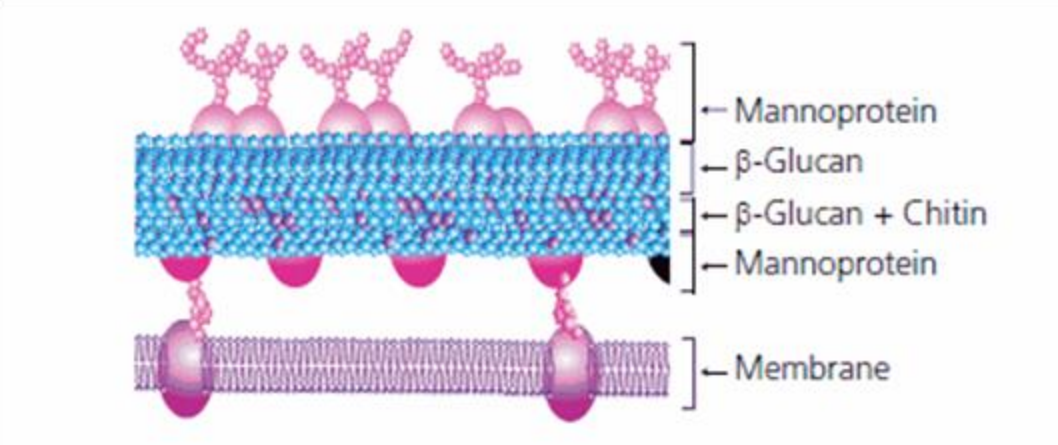
2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Građa stanične stijenke kvasaca

Glavne funkcije stanične stijenke kvasca su održavanje oblika stanice, stabilizacija osmotskih uvjeta unutar stanice, zaštita od mehaničkog stresa te uloga nosača za mnoge proteine na površini stanice. Stanična stijenka čini 10-25% suhe tvari stanice, a njezine glavne komponente su manoproteini (30-50% suhe tvari) i β-1,3 i β-1,6 glukani (50–60% suhe tvari), dok hitin čini vrlo mali udio (1,5-6% suhe tvari) (Aguilar-Uscanga i sur., 2003). Izgradnja stanične stijenke je strogo kontrolirana. Glavne komponente stanične stijenke su polisaharidi i glikoproteini. Sastav polisaharida, struktura i debljina stanične stijenke najviše ovise o uvjetima okoliša u kojem se stanica nalazi (Aguilar-Uscanga i sur., 2003). Ekspresija većine gena koji kodiraju za proteine stanične stijenke je regulirana ovisno o staničnom ciklusu (Bähler., 2005.). Nivo kisika također jako utječe na razinu ekspresije pojedinih proteina stanične stijenke. Stanična stijenka kvasca se sastoji od unutarnjeg sloja izgrađenog od polisaharida na koji se nadograđuje zaštitni vanjski sloj od manoproteina (slika 1.). Unutarnji sloj određuje oblik i strukturu stanične stijenke, dok vanjski sloj čije se komponente protežu u staničnu okolinu ima protektivnu ulogu. Stanična stijenka kvasca se sastoji uglavnom od polisaharida građenih od tri šećera, glukoze, manoze i N-acetilglukozamina. Glavni polisaharid stanične stijenke je β-1,3-glukan, polimer glukoze, koji ima fleksibilnu i helikalnu strukturu. Molekule β-1,3-glukana se povezuju vodikovim vezama, što rezultira stvaranjem kontinuirane, trodimenzionalne mreže. Nereducirajući krajevi β-1,3-glukana funkcioniraju kao mjesta kovalentnog vezanja drugih polisaharida. Na vanjskoj strani mreže β-1,3-glukana su pronađeni visoko razgranati, u vodi topljivi lanci β-1,6-glukana na koje mogu biti kovalentno vezani i manoproteini preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra (Kollar i sur., 1997.). β-1,6-glukan iako ga ima malo je vrlo važan zbog unakrsnog povezivanja komponenata stanične stijenke. Na unutarnjoj strani β-1,3-glukanske mreže vežu se hitinski lanci, ali tek nakon citokineze. Isto tako, hitin može biti vezan i na β-1,6-glukanske lance, pogotovo kao odgovor na mehanički stres kojem je podvrgnuta stanična stijenka. U staničnoj stijenci je identificirano oko 30 različitih manoproteina stijenke. Neki od njih su za stijenku vezani nekovalenentim interakcijama i moguće ih je izolirati vrućim SDS-om uz reducirajući reagens, poput β-merkaptoetanola i zato ih zovemo topljivi proteini stanične stijenke. Većina proteina stanične stijenke je kovalentno vezana za glukanski sloj te obzirom

na to razlikujemo dvije grupe proteina. Prva grupa kovalentno vezanih proteina se naziva GPI- proteini stanične stijenke i oni se vežu na β-1,3-glukan preko kratkih β-1,6-glukanskih mostova (De Groot i sur., 2005). Ova grupa proteina se iz stijenke može izolirati uz pomoć β-glukanaza. Drugu grupu kovalentno vezanih proteina čine Pir proteini (Proteins with internal repeats), vezani direktno na β-1,3-glukan (Kapteyan i sur.,1999., Ecker i sur.,2006), a iz stijenke se mogu izolirati pomoću 30 mM NaOH.

Slika 1. Građa stanične stijenke kvasca (www.sigmaaldrich.com.Pristupljeno 29.svibnja 2014.)



2.2. Proteini stanične stijenke

Proteini stanične stijenke imaju nekoliko funkcija, neki omogućuju komunikaciju između stanice i molekula u okolini, omogućuju opskrbu nutrijentima, te pomažu vezanje na druge stanice kao u procesima flokulacije, stvaranje biofilma i aglutinacije. Drugi imaju strukturalnu ulogu, omogućuju unakrsno povezivanje jer se mogu vezati i na glukane i na manane. Glavnina nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke ima aktivnost sintaza, glikozidaza i transglikozidaza. Proteini odgovorni za sintezu i remodeliranje stanične stijenke su potencijalne mete za antifungalne lijekove.

2.2.1. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke

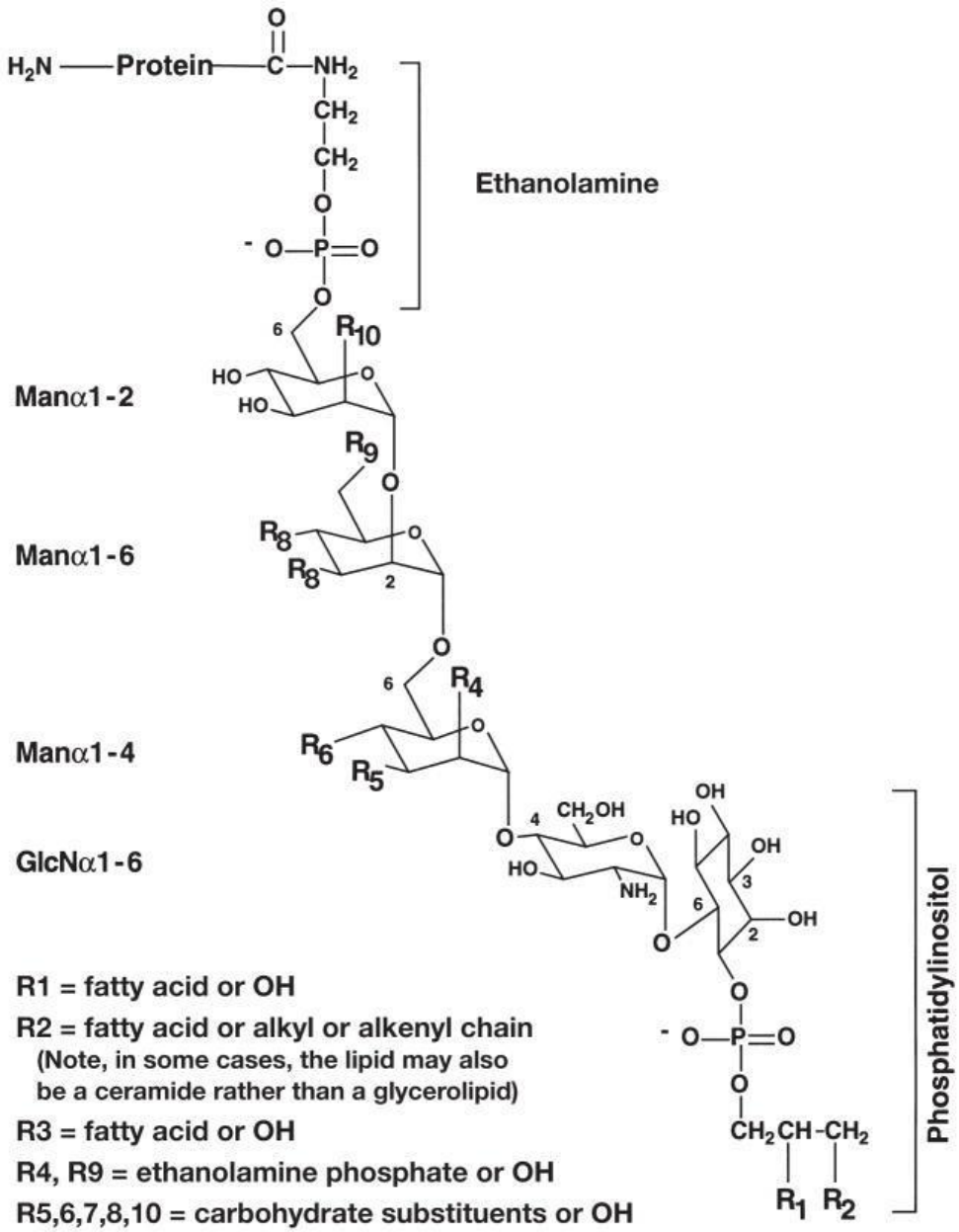
Prvi protein ove grupe izoliran iz stijenke i s razjašnjenom primarnom strukturom je bio Bgl2p protein. U *in vitro* testu ovisno o koncentraciji supstrata pokazuje endoglukanaznu ili transglukozidaznu aktivnost (Goldman i sur., 1995). Bgl2p pokazuje značajan nivo homologije s tri druga nekovalentno vezana proteina stanične stijenke: Scw4p, Scw10p i Scw11p, za koje se prema tome pretpostavlja da imaju glukanaznu aktivnost (Capellaro i sur.,1998.). Sedam najznačajnih Scw (Scw = soluble cell wall proteins) proteina je pročišćeno i identificirano sekvencioniranjem N-terminalnog kraja, pri čemu se pokazalo da je Scw4p jedan od najzastupljenijih među njima. Za Scw4p i Scw10p proteine nije dokazana enzimska aktivnost *in vitro* (Capellaro i sur.,1998.).

2.2.2 Proteini stijenke vezani preko ostatka GPI sidra

Proteini stijenke vezani preko ostatka GPI sidra, tzv. GPI proteini su dobili naziv po glikozilfosfatidilinozitol sidru koje je funkcionalna skupina glikofosfolipida i ima ulogu vezanja hidrofilnih proteina u stanične membrane (Sampaio i sur., 1999.). GPI sidro se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu (ER) u slijedu reakcija u kojima sudjeluje više od 20 proteina. Osnovnu okosnicu GPI sidra gotovo kod svih organizama čini: protein-CO-NH-(CH2)-PO4-6Man1–2Man1–6Man1–4GlcNH2-inositol-PO4-lipid (slika 2.). Etanolamin fosfat se nalazi na većini ostataka sidra GPI proteina (Imhof i sur.,2004.). Razlike u sastavu GPI sidra, ovisno o organizmu, mogu činiti grupe vezane za manozu i mogu biti različiti lipidi, a najčešći lipid u sidrima kvasaca je ceramid. GPI sidro se veže na proteine koji ga transportiraju kroz membranu ER i vežu ga na odgovrajuće vezne sekvence u C-terminalnom dijelu proteina (Orlean i Menon, 2007). Proteini koji trebaju dobiti GPI sidro moraju sadržavati dvije informacije u svom primarnom translacijskom produktu. Prva informacija je N-terminalna signalna sekvenca koja omogućuje ulazak u lumen ER-a. Druga je da mora sadržavati GPI signalnu sekvencu na C-terminalnom kraju. Za velik broj poznatih GPI proteina stanične stijenke poput Ccw12p, Ccw14p i Cwp2p se pokazalo da su jako O-manozilirani (Mrša i sur.,1999.), iako mogu biti i N- glikozilirani. Ostali GPI proteini stanične stijenke sadrže domene bogate serinskim i treoninskim ostatcima, što su mjesta O-manozilacije. Ccw12p je manoprotein građen od 133 aminokiseline sa signalom za transport u

endoplazmatski retikulum (aminokiseline 1-18) i mjestom za vezanje GPI sidra. Ccw12p je O–manoziliran i sadrži tri potencijalna mjesta za N–glikolizaciju (Asn-21, Asn-81, Asn-97).

Slika 2. Struktura GPI sidra (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>pristupljeno 28.svibnja 2014.)



2.2.3. Pir proteini

Pir porodica proteina je manja grupa proteina koja se veže direktno na β-1,3-glukansku mrežu preko esterske veze za koju je poznato da je alkalno osjetljiva. Izoliraju se inkubacijom staničnih stijenki, nakon prethodne ekstrakcije SDS-om, 16 sati u 30mM NaOH na 4°C (Mrša i sur.,1997). Pir proteini su jednoliko distribuirani kroz unutarnji sloj stanične stijenke, za razliku od GPI proteina koji se nalaze s vanjske strane stijenke. Dokazano je da se ekspresija određenih Pir proteina jako inducira kao odgovor na stres stanične stijenke, što ukazuje na njihovu moguću strukturnu ulogu u pojačavanju stanične stijenke (Boorsma i sur.,2004.). Ovi proteini su strukturno slični, bogati su serinom i treoninom, te intenzivno O-manozilirani. Također, svi članovi ove porodice sadrže N-terminalni signalni peptid za upućivanje u sekretorni put, mjesto za cijepanje Kex2p endoproteazom i karakteristične ponavljajuće regije, po kojima je porodica i dobila ime, a koja ima važnu ulogu u vezanju proteina u stijenku. Pir proteini se vežu na β-1,3-glukan preko labilne esterske veze između γ-karboksilne grupe specifičnog ostatka glutaminske kiseline unutar ponavljajuće sekvence proteina i hidroksilne grupe glukoze (Ecker i sur., 2006).

2.3. Protein Scw4p

Funkcija Scw4p u staničnoj stijenci još uvijek je nejasna. Unatoč visokom stupnju homologije sa glukanazama funga i viših biljaka, ta katalitička aktivnost nikad nije dokazana *in vitro*. Proteini Scw4p i Scw10p imaju vrlo visok stupanj sličnosti. Teparić i suradnici (2004.) su došli do zaključka da proteini Scw4p, Scw10p i Bgl2p djeluju sinergistički u izgradnji stanične stijenke, dok Scw11p djeluje antagonistički prema prvoj grupi proteina. Cappellaro i sur. (1998) su objavili da stanice *scw4scw10* mutanta rastu sporije i oslobađaju puno više proteina iz stijenke djelovanjem DTT-a, da su osjetljiviji na djelovanje inhibitora sinteze stijenke i da imaju defekt u parenju. Sve ove karakteristike ukazuju na oslabljenost stijenke, tj. na promjene u strukturi glukana ovog mutanta. Protein Scw4p je iz stanične stijenke moguće izolirati na dva načina, i to ekstrakcijom pomoću SDS-a te izolacijom pomoću NaOH. Protein Scw4p se u ova dva ekstrakta nalazi u dvije forme koje se razlikuju po molekulskoj masi (neobjavljeni podatci). Pretpostavlja se da forma proteina manje molekulske mase, koja se dobija u SDS ekstraktu, podliježe procesiranju koje vrši Kex2p proteaza ili japsinske proteaze, budući da Scw4p ima karakteristična mjesta za djelovanje ovih proteaza (Mrša i

sur., 1997; Cappellaro i sur., 1998). Veća forma proteina je kovalentno vezana u stijenku, za sada još nepoznatim mehanizmom i vjerojatno ne podliježe proteolitičkom procesiranju.

2.4. Ispitivanje fiziološke uloge proteina stijenke

Ispitivanje fiziološke uloge proteina stijenke provodi se na više načina. Najneposredniji i najtočniji, ali tehnički najteže izvediv način je izolacija proteina i ispitivanje njegove aktivnosti *in vitro*. Drugi način, koji posredno ukazuje na moguću fiziološku ulogu određenog proteina u stijenci je praćenje fenotipskih karakteristika mutiranih stanica kvasaca koje produciraju povećanu količinu tog proteina ili ga uopće ne proizvode. Povećana produkcija proteina se postiže na način da se u stanice kvasca unese gen za taj protein na plazmidu koji se u stanici umnožava u velikom broju kopija, pa se posljedično i protein za koji taj gen kodira u stanici sintetizira u velikom broju kopija. Pri tome se gen na plazmidu može staviti pod kontrolu nekog inducibilnog promotora, kao što je promotor za galaktozidazu, čime se omogućuje kontrola ekspresije gena. Naime, kada se stanice uzgajaju u podlozi koja sadrži glukozu ne dolazi do ekspresije gena pod kontrolom promotora za galaktozidazu, koji je u takvim uvjetima reprimiran, pa stanice iako nose u sebi plazmid sintetiziraju normalnu količinu proteina (samo sa genomske kopije gena). Međutim, kada takve stanice rastu u podlozi bez glukoze, već sa galaktozom kao izvorom ugljika dolazi do indukcije promotora za galaktozidazu, a time i gena pod njegovom kontrolom, pa se protein sintetizira u velikoj količini. Mutanti koji uopće ne sintetiziraju neki protein dobiju se tako da im se u genomu deletira gen koji kodira za taj protein. Rezultati dobiveni ispitivanjem fenotipa ovako dobivenih mutanata posredno upućuju na moguću fiziološku ulogu proteina u stanici. Mutanti u proteinima stanične stijenke tako mogu pokazivati promjene u fenotipskim svojstvima koja ovise o funkciji stijenke, odnosno pojedinih njenih dijelova kao što su npr. smanjena ili povećana brzina rasta, sposobnost preživljavanja (vijabilnost), sposobnost preživljavanja u uvjetima osmotskog stresa, osjetljivost na djelovanje različitih hidrolitičkih enzima ili inhibitora koji ometaju sintezu pojedinih struktura stanične stijenke.

Budući da je jedna od najvažnijih funkcija stijenke održavanje osmotske i mehaničke stabilnosti stanice, što ovisi prvenstveno o strukturi glukanskog sloja stijenke, svaka promjena u strukturi ovog sloja može uzrokovati smanjenje ili povećanje osmotske stabilnosti i posljedično povećanje ili smanjenje vijabilnosti stanica, kao i promjenu u osjetljivosti stanica

na djelovanje hidrolitičkih enzima kojima je ovaj sloj stijenke supstrat. Nedostatak ili suvišak proteina stijenke koji imaju ulogu u sintezi ili pregradnji glukanskog sloja stijenke odrazit će se prema tome na navedene karakteristike stanica. Slabljenjenje glukanskog sloja stijenke, bilo zbog smanjene sposobnosti sinteze i ugradnje glukana u stijenku, ili zbog pojačane aktivnosti enzima koji razgrađuju i remodeliraju glukan tijekom različitih faza staničnog ciklusa uzrokovat će smanjenu osmotsku stabilnost stanica, što će se očitovati u povećanom broju mrtvih stanica u kulturi i promjenom osjetljivosti na djelovanje hidrolitičkog enzima zimolijaze.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

U eksperimentima su korištene navedene kemikalije:

- glukoza, rafinoza, galaktoza - Difco Laboratories (Detroit, USA)
- kvaščeva dušična baza YNB, agar – Biolife (Milano, Italija)
- sorbitol, histidin, uracil, triptofan, leucin -Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Zimolijaza 100 T - ICN Biomedicals Inc. (Costa Mesa)
- metilensko modrilo - Sigma (St. Louis, SAD)

3.1.2. Hranjive podloge i uvjeti uzgoja kvasca

Za submerzni uzgoj kvasaca korištena je YPD podloga (0,67% YNB; 2% glukoze, rafinoze ili galaktoze) puferirana sa 10 mM citrat-fosfatnim puferom pH 4 ili pH 7. Za površinski uzgoj, kao kruta podloga, korištena je YPD podloga uz dodatak 20 g/L agara. Uzgoj na krutoj podlozi je provođen u termostatu na 30°C, a u tekućoj na tresilici pri temperaturi od 30°C.
Ovisno o auksotrofnosti soja u podlogu je dodavan histidin (80mg/L), uracil (80mg/L), triptofan (80mg/L) i leucin (160mg/L). Podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121°C i tlaku od 1 atm u trajanju od 40 minuta.

3.1.3. Sojevi kvasaca

Tablica 1. Korišteni sojevi kvasca

Soj kvasca	Genotip
wt+*SCW4*	Mat a, *his3*Δ, *leu2*Δ, *met15*Δ, *ura3*Δ + pBG1805 *SCW4*
kex2+SCW4	Mat a, *his3*Δ, *leu2*Δ, *met15*Δ, *ura3*Δ, *kex2::kanMX*+ pBG1805 *SCW4*
*5yps*Δ*+SCW4*	Mat a; *ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 can1-100 yps1::LEU2 yps2::HIS3 yps3::kan yps6::kan yps7::kan* + pBG1805 *SCW4*

3.2. METODE

3.2.1. Indukcija gena pod kontrolom promotora za galaktozidazu

Stanice kvasca uzgojene su preko noći u tekućoj YNB podlozi sa 2% rafinoze, na tresilici pri temperaturi od 30°C. Nakon toga su precijepljene u svježu tekuću puferiranu YNB podlogu sa 2% rafinoze na početni OD_{600} 0,5 i uzgajane 4 sata na tresilici pri temperaturi od 30°C, kako bi ušle u logaritamsku fazu rasta. Zatim je uzgojenim stanicama inokulirana tekuća puferirana YNB podloga sa 2% galaktoze kako bi došlo do indukcije gena pod kontrolom promotora za galaktozidazu, pri čemu je početni OD_{600} podešen na 0,4, a uzgoj je proveden preko noći na tresilici pri temperaturi od 30°C.

3.2.2. Bojanje stanica metilenskim modrilom

Nakon prekonoćnog uzgoja stanica kvasca u odgovarajućoj tekućoj podlozi uzeto je 5 µl suspenzije stanica i na predmetnici pomješano sa 5 µl otopine metilenskog modrila (0,1% metilenskog modrila u 2%-tnoj otopini Na-citrata). Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi ovako pripremljen preparat je promatran pod mikroskopom, pri čemu je izbrojan ukupni broj stanica u vidnom polju, te udio plavo obojanih stanica među njima (mrtve

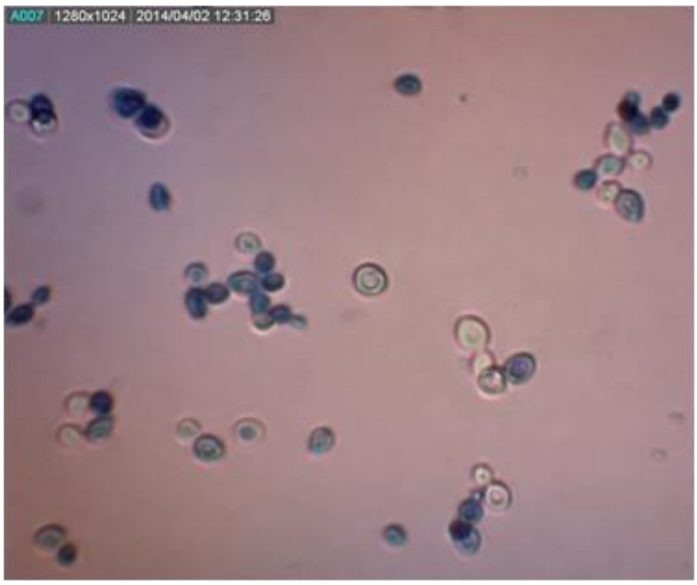
stanice). U svakom eksperimentu prebrojeno je najmanje 500 stanica, a eksperiment je ponavljan tri puta.

3.2.3. Ispitivanje osjetljivosti stanica kvasca na djelovanje zimolijaze

Suspenzija stanica kvasca se centrifugira 5 minuta pri 3000 rpm kako bi se stanice izdvojile iz hranjive podloge, nakon čega se stanice isperu u 10 mM fosfatnom puferu pH 6,8, te resuspendiraju u istom puferu tako da se OD_{600} suspenzije stanica podesi na približno 0,7. Zatim se po 2,5 mL suspenzije kvasca odpipetira u 3 kivete. Jedna kiveta služi kao kontrola (bez dodatka zimolijaze), a u druge dvije kivete se doda 10 µL otopine zimolijaze koncentracije 1 mg/mL. Zatim se izmjeri početni OD_{600} (t_0) te se kivete inkubiraju na tresilici na temperaturi od 30°C. Svakih 30 minuta, tijekom 3 sata mjeri se OD_{600}.

4. REZULTATI

U ovom radu se ispitivao utjecaj prekomjerne produkcije proteina Scw4p na stabilnost stanične stijenke divljeg tipa kvasca te mutanta *kex2*, koji nema Kex2p proteazu i mutanta *5ypsΔ* koji nema japsinske proteaze u svojim stanicama. Ovi mutanti su korišteni jer se na osnovu literaturnih podataka i prijašnjih rezultata dobivenih u ovom laboratoriju pretpostavlja da Kex2p i japsinske proteaze imaju ulogu u procesiranju proteina Scw4p, te da utječu na način ugradnje ovog proteina u stijenku (kovalentno ili nekovalentno), a time vjerojatno i na njegovu aktivnost. Stabilnost stijenke se ispitivala praćenjem vijabilnosti stanica, te ispitivanjem njihove osjetljivosti na zimolijazu. Vijabilnost stanica je određivana bojanjem kulture stanica metilenskim modrilom (kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode) pri čemu se mrtve stanice oboje plavo, a žive ostanu neobojene (slika 3.)

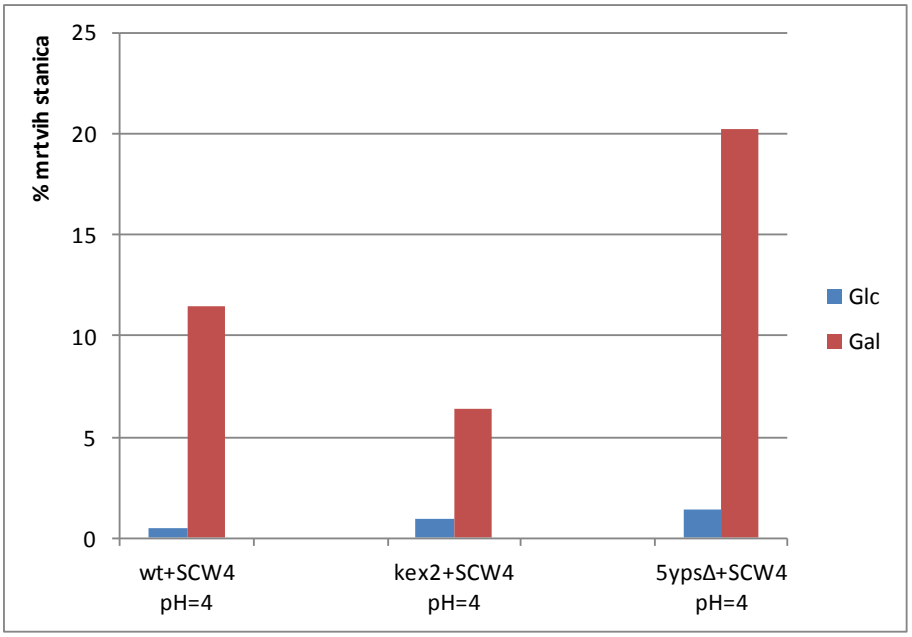


Slika 3. Mikroskopska slika stanica kvasca nakon bojanja metilenskim modrilom

Stanice su uzgajane u podlogama puferiranim na pH4 ili pH7 jer je u prijašnjim ispitivanjima ustanovljeno da pH podloge utječe na procesiranje Scw4p, tako da pri pH 4 prevladava procesirana forma proteina, dok je kod pH 7 veći udio neprocesirane forme proteina, pogotovo u stanicama *kex2* i *5ypsΔ* mutanata.

4.1. Ispitivanje utjecaja povećane sinteze Scw4p na vijabilnost stanica divljeg tipa, *kex2* mutanta i japsinskog mutanta pri pH4

Stanice divljeg tipa (wt), *kex2* i *5ypsΔ* mutanta transformirane plazmidom pBG1805 koji nosi gen *SCW4* koji je pod kontrolom promotora za galaktozidazu uzgajane su u podlozi puferiranoj na pH4 uz galaktozu kao izvor ugljika, kako bi došlo do indukcije gena *SCW4*. Istovremeno je proveden i uzgoj na podlozi sa glukozom kako bi se rezultati dobiveni uz povećanu količinu Scw4p usporedili sa onima pri normalnoj razini Scw4p u stijenci. Udio mrtvih stanica u kulturi određen je bojanjem stanica metilenskim modrilom, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode.

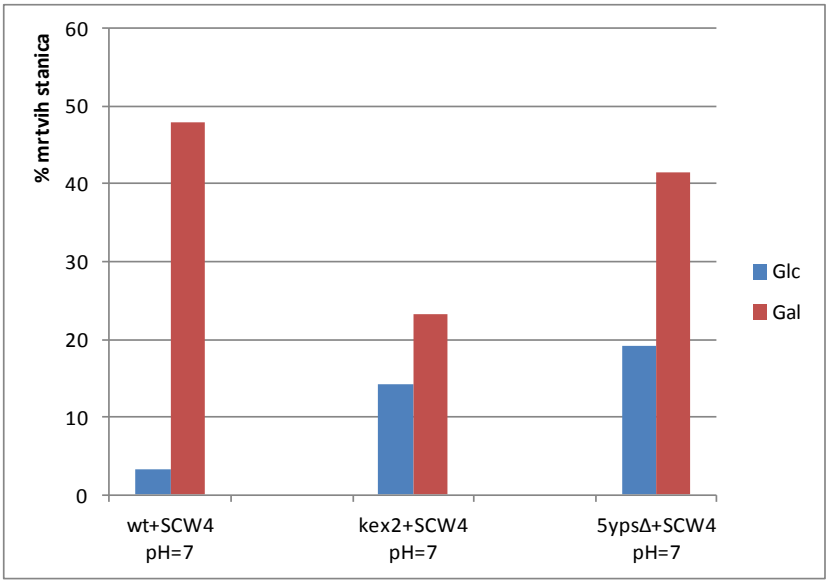


Slika 4. Udio mrtvih stanica u kulturi wt, *kex2* i *5ypsΔ* mutanta transformiranih plazmidom pBG1805 *SCW4* nakon uzgoja na glukozi ili galaktozi pri pH4. Udio mrtvih stanica određen je bojanjem metilenskim modrilom.

Rezultati ovog eksperimenta (slika 4.) pokazali su značajno povećanje broja mrtvih stanica u kulturama sva tri soja kvasca nakon uzgoja na galaktozi tj. kada je u stanicama povećana količina sintetiziranog proteina Scw4p. Najmanji porast udjela mrtvih stanica opažen je kod *kex2* mutanta, a najveći kod divljeg tipa (wt) u odnosu na uvjete kada je razina Scw4p normalna tj. tijekom uzgoja stanica na glukozi.

4.2. Ispitivanje utjecaja povećane sinteze Scw4p na vijabilnost stanica divljeg tipa, *kex2* mutanta i japsinskog mutanta pri pH7

Stanice divljeg tipa, *kex2* i *5ypsΔ* mutanta transformirane plazmidom koji nosi gen *SCW4* pod kontrolom promotora za galaktozidazu uzgajane su u podlozi puferiranoj na pH7 uz galaktozu kao izvor ugljika, kako bi došlo do indukcije *SCW4*. Istovremeno je proveden i uzgoj na podlozi sa glukozom kako bi se rezultati dobiveni uz povećanu količinu Scw4p usporedili sa onima pri normalnoj razini Scw4p u stijenci. Udio mrtvih stanica u kulturi određen je bojanjem stanica metilenskim modrilom, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode.

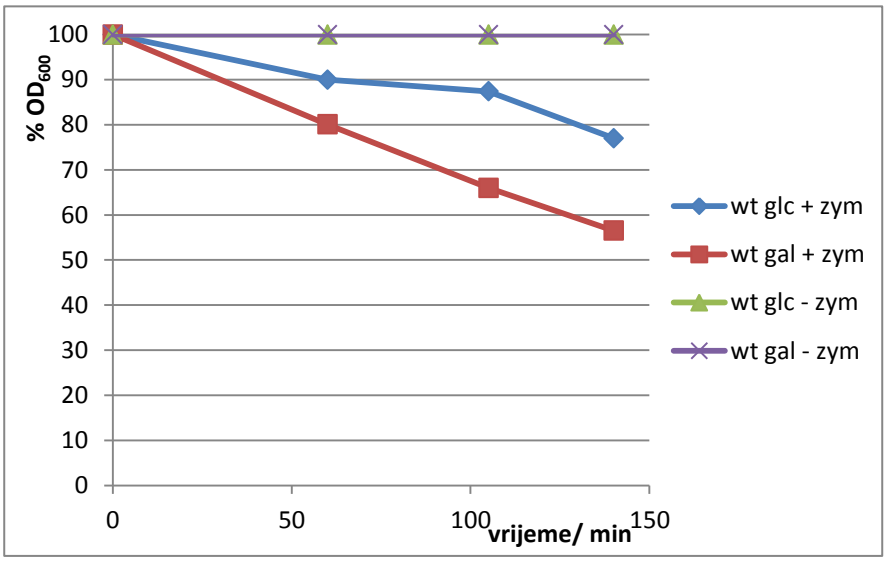


Slika 5. Udio mrtvih stanica u kulturi wt, *kex2* i *5ypsΔ* mutanta transformiranih plazmidom pBG1805 *SCW4* nakon uzgoja na glukozi ili galaktozi pri pH7 . Udio mrtvih stanica određen je bojanjem metilenskim modrilom.

Ovim eksperimentom je ustanovljeno da tijekom uzgoju stanica pri pH 7 također dolazi do povećanje broja mrtvih stanica u kulturama sva tri soja kvasca nakon uzgoja na galaktozi tj. kada je u stanicama povećana količina sintetiziranog proteina Scw4p (slika 5.). Međutim, za razliku od rezultata dobivenih pri pH4, u ovim uvjetima je povećan i broj mrtvih stanica u kulturama uzgajanim na glukozi, što upućuje na negativan utjecaj samog medija na preživaljavanje stanica. Udio mrtvih stanica *kex2* i *5ypsΔ* mutanata koji sintetiziraju povećanu količinu Scw4p je oko dva puta veći nego u uvjetima kada je razina Scw4p normalna tj. tijekom uzgoja stanica na glukozi, dok je kod stanica divljeg tipa udio mrtvih stanica nakon uzgoja na galaktozi znatno veći nego na glukozi.

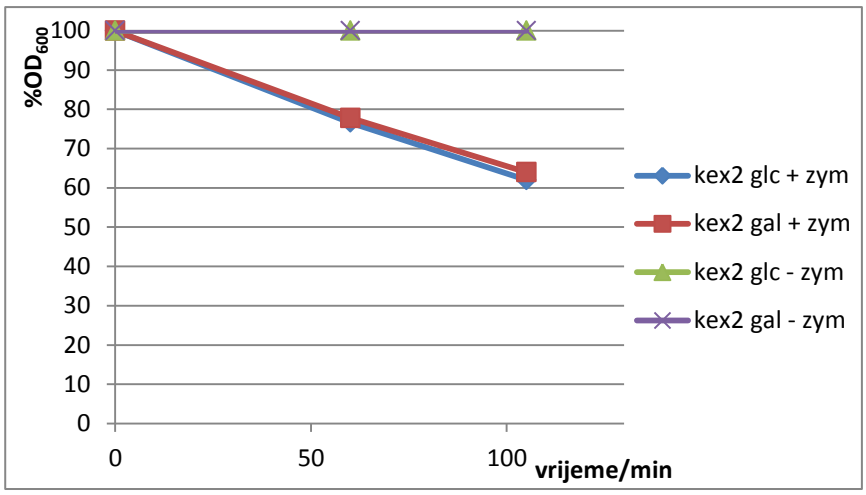
4.3. Ispitivanje utjecaja povećane sinteze Scw4p na osjetljivosti stanica divljeg tipa, *kex2* mutanta i japsinskog mutanta na djelovanje zimolijaze

Stanice divljeg tipa, *kex2* i *5Δyps* mutanta transformirane plazmidom koji nosi gen *SCW4* pod kontrolom promotora za galaktozidazu uzgajane su uz galaktozu kao izvor ugljika. Istovremeno je proveden i uzgoj na podlozi sa glukozom kako bi se rezultati dobiveni uz povećanu količinu Scw4p usporedili sa onima pri normalnoj razini Scw4p u stijenci. Zatim je ispitana osjetljivost uzgojenih stanica na djelovanje zimolijaze kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode.

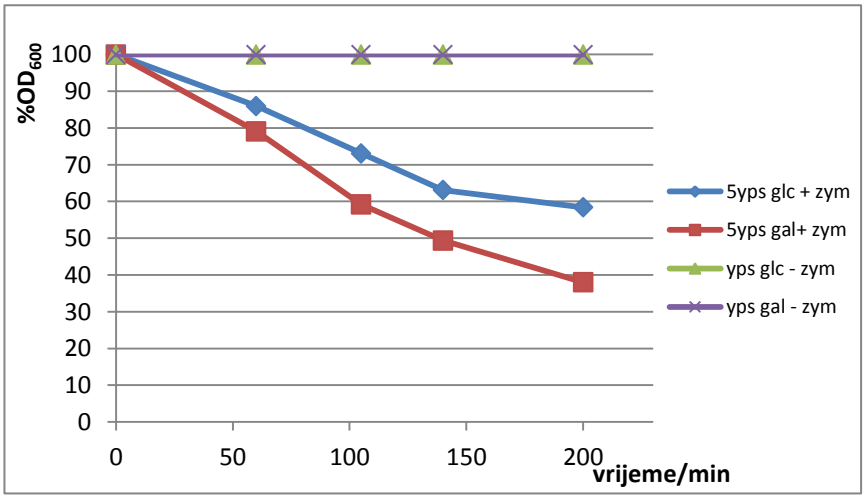


Slika 6. Liza stanica divljeg tipa wt kvasca zimolijazom. Stanice su uzgojene na glukozi ili galaktozi pri pH4 nakon čega je ispitana njihova osjetljivost na djelovanje zimolijaze. Tijek liziranja stanica je praćen mjerenjem OD_{600} suspenzije kroz 3 sata i izražen kao % vrijednosti OD_{600} prije početka djelovanja zimolijaze.

Rezultati dobiveni sa divljim tipom kvasca pokazuju povećanu osjetljivost stanica na djelovanje zimolijaze nakon uzgoja stanica na galaktozi tj. pri povećanom nivou sinteze Scw4p, u odnosu na normalnu razinu Scw4p u stanici (slika 6.). Stanice *kex2* mutanta ne pokazuju promjenu osjetljivosti na djelovanje zimolijaze nakon uzgoja stanica na galaktozi (slika 7.), dok rezultati dobiveni sa *5ypsΔ* mutantom pokazuju povećanu osjetljivost stanica na djelovanje zimolijaze nakon uzgoja stanica na galaktozi (slika 8.).



Slika 7. Liza stanica *kex2* mutanta zimolijazom. Stanice su uzgojene na glukozi ili galaktozi pri pH4 nakon čega je ispitana njihova osjetljivost na djelovanje zimolijaze. Tijek liziranja stanica je praćen mjerenjem OD_{600} suspenzije kroz 3 sata i izražen kao % vrijednosti OD_{600} prije početka djelovanja zimolijaze.



Slika 8. Liza stanica *5ypsΔ* mutanta zimolijazom. Stanice su uzgojene na glukozi ili galaktozi pri pH4 nakon čega je ispitana njihova osjetljivost na djelovanje zimolijaze. Tijek liziranja stanica je praćen mjerenjem OD_{600} suspenzije kroz 3 sata i izražen kao % vrijednosti OD_{600} prije početka djelovanja zimolijaze.

5. RASPRAVA

Protein Scw4p je jedan od najzastupljenijih nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke. Fiziološka uloga ovog proteina u staničnoj stijenci još uvijek nije poznata. Unatoč visokom stupnju homologije sa glukanazama funga i viših biljaka, katalitička aktivnost ovog proteina nikad nije dokazana *in vitro* niti *in vivo*. Potencijalnu fiziološku ulogu određenog proteina u stijenci moguće je posredno predvidjeti ispitivanjem fenotipskih karakteristika mutiranih stanica kvasaca koje produciraju povećanu količinu tog proteina ili ga uopće ne proizvode. Cappellaro i sur. (1998) su objavili da stanice *scw4scw10* mutanta, kojima je deletiran gen za protein Scw4p i njegov strukturni analog Scw10p, rastu sporije i oslobađaju puno više proteina iz stijenke djelovanjem DTT-a, da su osjetljiviji na djelovanje inhibitora sinteze stijenke i da imaju defekt u parenju. Sve ove karakteristike ukazuju na oslabljenost stijenke, tj. na promjene u strukturi glukana ovog mutanta. U ovom radu su u svrhu daljnjeg ispitivanja moguće fiziološke uloge Scw4p korištene stanice mutanata koje produciraju prekomjernu količinu Scw4p. To je postignuto tako da je u stanice kvasca unesen gen *SCW4* na plazmidu pBG1805 koji se u stanici umnožava u velikom broju kopija, pa se posljedično i protein Scw4p u stanici sintetizira u velikom broju kopija. Osim toga, na plazmidu je gen *SCW4* stavljen pod kontrolu jakog inducibilnog promotora za galaktozidazu, tako da do indukcije dolazi samo u uvjetima uzgoja na galaktozi kao jedinom izvoru ugljika, dok tijekom uzgoja na glukozi stanice sintetiziraju normalnu količinu Scw4p. Budući da se pretpostavlja da Scw4p ima ulogu u remodeliranju glukanskog sloja stijenke očekuje se da se njegov suvišak odrazi na osmotsku stabilnost stanica, što se može očitovati u povećanom ili smanjenom broju mrtvih stanica u kulturi tj. smanjenju ili povećanju vijabilnosti stanica, i/ili na otpornost prema djelovanju enzima za razgradnju glukanskog sloja stijenke, što se može očitovati u promjeni brzine liziranja stanica tijekom djelovanja zimolijaze. U dosadašnjim ispitivanjima provedenim u ovom laboratoriju je ustanovljeno da se protein Scw4p iz stijenke može izolirati na dva načina, i to ekstrakcijom pomoću SDS-a te izolacijom pomoću NaOH. Protein Scw4p se u ova dva ekstrakta nalazi u dvije forme koje se razlikuju po molekulskoj masi (neobjavljeni podatci). Pretpostavlja se da forma proteina manje molekulske mase, koja se dobiva u SDS ekstraktu, podliježe procesiranju koje vrši Kex2p proteaza ili japsinske proteaze, budući da Scw4p ima karakteristična mjesta za djelovanje ovih proteaza (Mrša i sur., 1997; Cappellaro i sur., 1998). Veća forma proteina je kovalentno vezana u stijenku, za sada još nepoznatim mehanizmom i vjerojatno ne podliježe proteolitičkom procesiranju. Osim toga je ustanovljeno da pH podloge utječe na procesiranje Scw4p, tako da pri pH 4 prevladava

procesirana forma proteina, dok je kod pH 7 veći udio neprocesirane forme proteina, pogotovo u stanicama *kex2* i *5ypsΔ* mutanata, kojima nedostaju geni za Kex2p proteazu, odnosno za jaspinske proteaze. Kako procesiranje utječe na način vezanja, moguće je i da utječe na aktivnost Scw4p. Stoga se u ovom radu ispitivao utjecaj prekomjerne produkcije proteina Scw4p na stabilnost stanične stijenke divljeg tipa kvasca te mutanta *kex2* i *5ypsΔ*. Rezultati dobiveni ispitivanjem utjecaja povećane sinteze Scw4p na vijabilnost stanica divljeg tipa, *kex2* mutanta i japsinskog mutanta pri pH4 (slika 4.) pokazali su značajno povećanje broja mrtvih stanica u kulturama sva tri soja kvasca nakon uzgoja na galaktozi tj. kada je u stanicama povećana količina sintetiziranog proteina Scw4p. Najmanji porast udjela mrtvih stanica opažen je kod *kex2* mutanta (oko 7 puta više mrtvih stanica), a najveći kod divljeg tipa kvasca (oko 23 puta), dok je kod *5ypsΔ* mutanta udio mrtvih stanica u kulturi porastao oko 15 puta u odnosu na uvjete kada je razina Scw4p normalna tj. tijekom uzgoja stanica na glukozi. Tijekom uzgoja stanica pri pH 7 također dolazi do povećanje broja mrtvih stanica u kulturama sva tri soja kvasca nakon uzgoja na galaktozi (slika 5.). Međutim, za razliku od rezultata dobivenih pri pH4, u ovim uvjetima je povećan i broj mrtvih stanica u kulturama uzgajanim na glukozi, što upućuje na negativan utjecaj samog medija na preživljavanje stanica. Udio mrtvih stanica *kex2* i *5ypsΔ* mutanata koji sintetiziraju povećanu količinu Scw4p je oko 2 puta veći nego u uvjetima kada je razina Scw4p normalna tj. tijekom uzgoja stanica na glukozi, dok je kod stanica divljeg tipa udio mrtvih stanica nakon uzgoja na galaktozi znatno veći nego na glukozi (oko 15 puta). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je enzimski aktivna najvjerojatnije procesirana forma Scw4p, budući da je pri oba pH najveći pad vijabilnosti uočen kod wt kvasca, dok mutanti kojima nedostaju bilo Kex2p ili japsinske proteaze pokazuju znatno manji pad vijabilnosti u oba pH područja. Pri tome izgleda da Kex2p ima veći utjecaj na produciranje enzimski aktivne forme jer u uvjetima pri pH4 udio mrtvih stanica u *kex2* mutantu (u kojem su aktivne japsinske proteaze) povećan samo 7, dok je kod *5ypsΔ* mutanta (u kojem je aktivna Kex2p) taj udio 14 puta veći. U uvjetima pri pH7 imamo podjednak efekt u *kex2 i 5ypsΔ* mutantima, tj. udio mrtvih stanica se povećao svega oko 2 puta dok je u istim uvjetima u wt soju (u kojem su sve ove proteaze aktivne) udio mrtvih stanica porastao oko 15 puta. Rezultati dobiveni ispitivanjem osjetljivost stanica na djelovanje zimolijaze sa divljim tipom kvasca i *5ypsΔ* mutantom pokazuju povećanu osjetljivost nakon uzgoja stanica na galaktozi tj. pri povećanom nivou sinteze Scw4p, u odnosu na normalnu razinu Scw4p u stanici (slika 6. i slika 8.), dok stanice *kex2* mutanta ne pokazuju promjenu osjetljivosti na djelovanje zimolijaze nakon uzgoja stanica na galaktozi (slika 7.). Ovi rezultati se slažu sa rezultatima prethodnog eksperimenta jer pokazuju

povećanu osjetljivost stanica, tj. slabiju strukturu stijenke u uvjetima povećane produkcije Scw4p, pa se stanice brže liziraju djelovanjem zimolijaze. Naprotiv, kod *kex2* mutanta nije uočena promjene osjetljivosti, što znači da u nedostatku Kex2p ima manje aktivne forme Scw4p, tj. da je struktura stijenke unatoč povećanoj produkciji Scw4p ostala nepromijenjena. Na osnovu svih ovih rezultata može se zaključiti da protein Scw4p ima glukanaznu aktivnost, jer pri njegovoj povećanoj sintezi dolazi do slabljenja stanične stijenke, stanicama opada vijabilnost i osjetljivije su na djelovanje hidrolitičkih enzima iz okoline. Međutim, da bi Scw4p bio enzimski aktivan potrebno ga je procesirati, što pokazuje i rezultat da je veće smanjenje vijabilnosti postignuto u uvjetima pri pH4, za koje je poznato da u stanicama prevladava procesirana forma Scw4p. Konačno, jači efekt aktivacije Scw4p daje procesiranje Kex2p proteazom, a slabiji efekt procesiranje djelovanjem japsinskih proteaza.

6. ZAKLJUČCI

Prekomjerna sinteza Scw4p u stanicama divljeg tipa kvasca, *kex2* mutanta i japsinskog mutanta dovodi do smanjenja vijabilnosti stanica sva tri soja kvasca, pri čemu je veće smanjenje vijabilnosti postignuto pri pH4 nego pri pH7.

Prekomjerna sinteza Scw4p u stanicama divljeg tipa kvasca i japsinskog mutanta dovodi do povećanja osjetljivosti na djelovanje zimolijaze, dok kod stanica *kex2* mutanta nema efekta.

Protein Scw4p djeluje kao glukanaza, jer pri njegovoj povećanoj sintezi dolazi do slabljenja stanične stijenke, stanicama opada vijabilnost i osjetljivije su na djelovanje hidrolitičkih enzima iz okoline.

Enzimski aktivna forma je procesirana forma Scw4p, pri čemu jači efekt aktivacije ima procesiranje Scw4p sa Kex2p proteazom, a slabiji efekt procesiranje Scw4p japsinskim proteazama.

7. POPIS LITERATURE

Aguilar-Uscanga B. and Francois JM. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation, *Lett Appl Microbiol* **37**, 268–274

Bähler J. (2005) Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet* **39**, 69–94.

Boorsma, A., De Nobel, H., Ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, KJ., Klis, FM., (2004) Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **21**: 413–427

Cappellaro, C., Mrsa, V., Tanner, W., 1998. New potential cell wall glucanases of Saccharomyces cerevisiae and their involvement in mating. *J Bacteriol* **180**: 5030–5037

De Groot, P. W., Ram, A. F., 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 β-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage, *J. Biol.Chem.* **281**, 11523–11529.

Goldman, R.C., Sullivan, P.A., Zakula, D. and Capobianco, J.O.(1995) Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the BGL2 gene. *Eur. J. Biochem*. **227**, 372-378.

Imhof, I., Flury, I., Vionnet,C., Roubaty,C., Egger,D., Conzelmann, A. (2004) Glycosylphosphatidylinositol (GPI) proteins of *Saccharomyces cerevisiae* contain ethanolamine phosphate groups on the α1,4-linked mannose of the GPI anchor. *J. Biol. Chem.* **279**, 19614-19627.

Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H., Klis, F. M. (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 373–383.

Kollar, R., Reinhold, BB., Petrakova, E., Yeh, HJ., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, JC., Klis, FM., Cabib, E. (1997) Architecture of the yeast cell wall. *β*(1–6)-glucan interconnects mannoprotein, *β*(1–3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**, 17762–17775.

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.

Mrša, V., Ecker, M., Strahl-Bolsinger, S., Nimtz, M., Lehle, L., Tanner, W. (1999) Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* **181**, 3076-*3086.*

Orlean, P., Menon, A.K. (2007) GPI anchoring of proteins in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycophospholipids. *J.of Lipid Research* **48**, 993-1011.

Sampaio, G., Bordineaud, J., Laquin, G. (1999) A constutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Molecular Biology* **34**, 247-256.

Teparić, R., Stuparević, I., Mrša, V., (2004) Increased mortality of Saccharomyces cerevisiae cell wall protein mutants. *Microbiology* **150**, 3145–3150.