

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Iva Čanak

**Ispitivanje uloge Kex2p proteaze u procesiranju proteina
Scw4p kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

Zagreb, 2012.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Renate Teparić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011/2012.

SADRŽAJ

1.UVOD	1
1.1. GRAĐA STANIČNE STIJENKE	1
1.2. POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE	2
1.3. PROTEINI STANIČNE STIJENKE	3
1.3.1. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke	4
1.3.2. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke	4
1.4. SEKRETORNI PUT	6
1.5. PROTEOLITIČKI ENZIMI UKLJUČENI U PROCESIRANJE PROTEINA STANIČNE STIJENKE	7
1.5.1. Protein Kex2p i njegova fiziološka uloga u stanici	7
1.5.2. Proteaze iz porodice japsina i njihova fiziološka uloga u stanici	9
1.5.3. Fiziološka uloga proteina Scw4p i Scw10p u staničnoj stijenci kvasca	13
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	14
3. MATERIJALI I METODE RADA	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Kemikalije	15
3.1.2. Hranjive podloge i uvjeti uzgoja stanica kvasca	15
3.1.3. Hranjive podloge i uvjeti uzgoja bakterija	16
3.1.4. Sojevi kvasca	16
3.1.5. Sojevi bakterija	17
3.1.6. Plazmidi	17

3.1.7. Oligonukleotidi	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Izolacija DNA iz agaroznog gela	19
3.2.2. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima	19
3.2.3. Ligacija	19
3.2.4. Transformacija kompetentnih stanica <i>E. coli</i>	19
3.2.5. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije <i>E. coli</i> iz malog volumena podloge	19
3.2.6. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	20
3.2.7. Uvođenje mutacije u gen <i>SCW4</i> metodom "megapočetnice"	20
3.2.8. Transformacija stanica kvasca	22
3.2.9. Izolacija staničnih stijenki	23
3.2.10. Izolacija nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke	23
3.2.11. Izolacija kovalentno vezanih proteina stanične stijenke	23
3.2.12. SDS-elektroforeza po Laemmli-u	24
3.2.13. Prijenos proteina na nitrocelulozu i njihovo specifično obilježavanje	24

4. REZULTATI

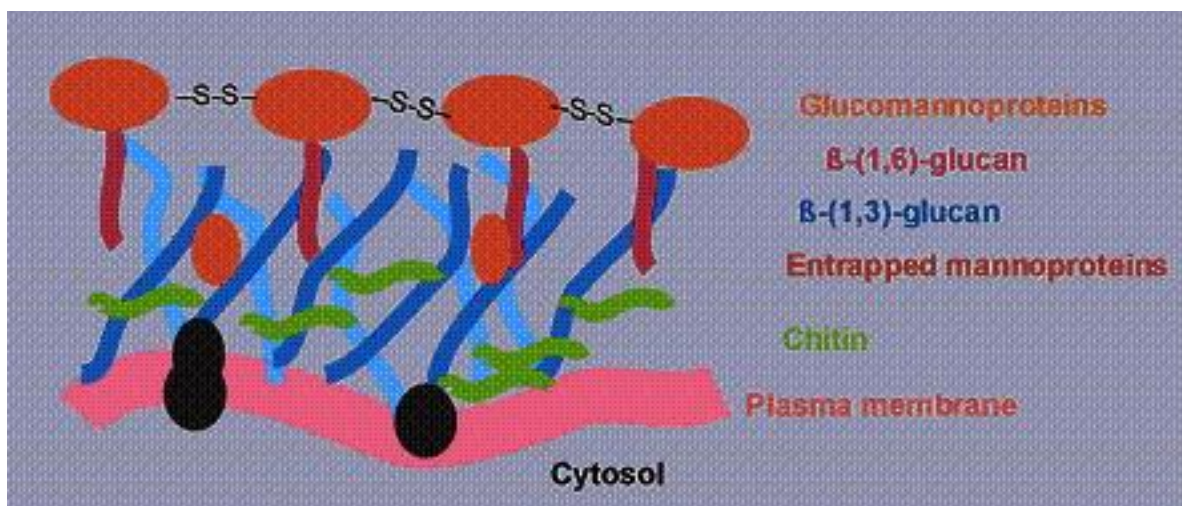
4.1. Usporedba načina vezanja Scw4p-HA u staničnoj stijenci divljeg tipa i <i>kex2</i> mutanta	26
4.2. Uvođenje mutacije u <i>SCW4</i> u regiji koja odgovara mjestu za postranslacijsko procesiranje proteina Kex2p proteazom	27
4.3. Procesiranje i raspodjela nativnog i mutiranog Scw4p-HA u staničnoj stijenci divljeg tipa kvasca i <i>kex2</i> mutanta	29
4.4. Procesiranje i raspodjela nativnog i mutiranog Scw4p-HA u staničnoj stijenci divljeg tipa kvasca i <i>kex2</i> mutanta tijekom uzgoja pri pH 4 i pH 7	30

5. RASPRAVA	32
6. ZAKLJUČCI	35
7. ZAHVALE	36
8. POPIS LITERATURE	37
9. SAŽETAK	48
10. SUMMARY	49
11. ŽIVOTOPIS	50

1. UVOD

1.1. GRAĐA STANIČNE STIJENKE

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je čvrsta ali elastična struktura koja omogućuje fizičku zaštitu i određuje oblik stanice. Sastoji se od unutarnjeg sloja odgovornog za mehaničku i osmotsku stabilnost, kojeg čine β -1,3-glukan (50%), β -1,6-glukan (5%) i hitin (1-2%), te vanjskog koji određuje površinska svojstva stijenke, a sastoji se od manoproteina (35%) (Teparić, R., 2005). Ovaj omotač također ograničava propusnost za molekule iz okoline stanica. Stanična stijenka je visoko elastična i kad stanicu kvasca uronimo u hipertoničnu otopinu dolazi do njegovog brzog skupljanja, pri čemu stanica može izgubiti i više od 60% svog početnog volumena (Klis i sur., 2002). Ova elastičnost je najvjerojatnije posljedica elastičnih svojstava lanaca β -1,3-glukana.



Slika 1. Shematski prikaz građe stanične stijenke (<<http://www.sbthai.com>>.Pristupljeno 02.travnja.2012.)

1.2. POLISAHARIDI STANIČNE STIJENKE

Stanična stijenka kvasca se sastoji od unutarnjeg omotača izgrađenog od polisaharida na koji se nadograđuje zaštitni vanjski sloj od manoproteina. Unutarnji sloj određuje oblik i strukturu stanične stijenke, dok vanjski sloj čije se komponente protežu u staničnu okolinu ima protektivnu ulogu.

β -1,3-glukan

Lanci β -1,3-glukana sa stupnjem polimerizacije od \approx 1500 jedinica glukoze/lancu imaju strukturu heliksa, te daju staničnoj stijenci elastičnost i čvrstoću. Kovalentno je vezan na ostale stanične komponente pri čemu su njegovi nereducirajući krajevi unakrsno vezani s reducirajućim krajevima hitinskih lanaca preko β -1,4 glikozidne veze (Lesage i Bussey, 2006). U stacionarnoj fazi rasta su u staničnoj stijenci nađene molekule β -1,3-glukana sastavljene od 1500 monomernih jedinica glukoze, međutim potvrđeno je kako stupanj polimerizacije može varirati ovisno o okolišnim čimbenicima, fazi rasta ili izvoru ugljika (Klis i sur., 2002)

Sintezu β -1,3-glukana katalizira β -1,3-glukan sintaza koja se sastoji od dvije podjedinice: Fks1 i Gsc2/Fks2. Obje su transmembranski proteini neophodni za sintezu ove stanične komponente (Cabib i sur., 1998). Nepoznato je da li se kod kvasca *S. cerevisiae* rastući β -1,3-glukanski lanac produljuje na reducirajućem ili nereducirajućem kraju. Međutim, otkriveno je da se β -1,3-glukan iz gljive *Sclerotium rolfisii* produljuje na nereducirajućem kraju (Batra i sur., 1969).

Budući se β -1,3-glukanski lanac sintetizira kao ravna molekula, prisutnost razgranjenja implicira postojanje enzima za modificiranje β -1,3-glukana. Također mogu biti potrebni dodatni enzimi za ugradnju novosintetiziranog β -1,3-glukana u rastuću stijenku tijekom rasta stanica. Potencijalni enzimi uključeni u ovaj korak su Gas1-endotransglikozilaza koja može biti uključena u produljenje i preuređivanje β -1,3-glukanskog lanca (Popolo i Vai, 1999; Mouyna i sur., 2000), Bgl2 (Goldman i sur., 1995; Cappellaro i sur., 1998), Crh1 (Rodriguez-Pena i sur., 2000) te proteini SUN porodice (Cappellaro i sur., 1998; Mouassite i sur., 2000) Njihova točna funkcija *in vivo* još uvijek nije potpuno proučena.

β -1,6-glukan

β -1,6-glukan je u svom prirodnom obliku visoko razgranati, vodotopljiv polimer koji se sastoji od prosječno 130 glukoernih jedinica. Koristi se u staničnoj stijenci za povezivanje GPI proteina stijenke i β -1,3-glukanske mreže. Može imati i ulogu akceptora za vezanje hitina, posebno u slučaju staničnog stresa. Uočeno je da na razinu β -1,6-glukana znatno utječu različiti proteini Golgijevog tijela, endoplazmatskog retikuluma i oni s površine stanice (Klis i sur., 2002).

Hitin

Hitin se pojavljuje u obliku linearnih lanaca u hitinskom prstenu u i oko ožiljaka pupova te u manjoj mjeri ravnomjerno raspršen u bočnom zidu stanice majke. Lanci hitina izolirani iz ožiljaka pupova sastoje se od oko 190 N-acetilglukozamin monomera, ali je nepoznato da li to isto vrijedi i za hitin u bočnim zidovima (Holan i sur., 1981). Sintaza hitina u *S.cerevisiae* uključuje tri hitin sintaze i strogo je regulirana. U normalnim uvjetima ugradnja hitina se odvija nakon citokineze. To rezultira relativno visokom razinom hitina u bočnim zidovima: 0.1-0.2% izuzimajući ožiljke pupova, te 1-2% uključujući ožiljke (Shaw i sur., 1991). U stanicama s oslabljenom stijenkama, sintaza hitina je aktivirana kao dio spašavajućeg mehanizma, a razina u bočnim zidovima takvih stanica može biti i do 20% suhe mase stijenke (Dallies i sur., 1998; Garcia-Rodriguez i sur., 2000)

1.3. PROTEINI STANIČNE STIJENKE

Dosad je u staničnoj stijenci *S. cerevisiae* identificirano više od 30 različitih manoproteina. Može ih se podjeliti u tri grupe ovisno o načinu vezivanja na glukan. Neki proteini su vezani na glukansku mrežu nekovalentno i mogu se izolirati vrućim SDS-om i β -merkaptetanolom. Druga grupa obuhvaća proteine vezane na β -1,6-glukan/ β -1,3-glukan mrežu preko ostatka glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra. Obično se iz stijenke ekstrahiraju djelovanjem β -1,6- ili β -1,3-glukanaza. Treću grupu predstavljaju sekvencijski srodni Pir proteini (Proteins with internal repeats) vezani 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)

Funkcija manoproteina je u velikoj mjeri još uvijek nepoznata. Nekoliko njih je pokazalo ulogu u staničnim interakcijama tijekom parenja i flokulacije, ali većina ostalih se može ukloniti iz stanične stijenke bez ikakve štete za stanicu (Teparić i sur., 2010).

1.3.1. Nekovalentno vezani protein stanične stijenke

Iako fiziološka uloga većine nekovalentno vezanih proteina stijenke još uvijek nije u potpunosti objašnjena, čini se kako većina do sad opisanih proteina sadrži značajan nivo homologije primarne strukture u odnosu na glukan hidrolaze ili transglikozidaze, što vodi do zaključka da imaju ulogu u pupanju, održavanju ili pregradnji glukana u stijenci tijekom rasta, parenja, sporulacije i ostalih staničnih događaja uključenih u promjene stanične stijenke (Teparić i sur., 2010). Prvi protein ove grupe izoliran iz stijenke i s razjašnjenom primarnom strukturom je bio Bgl2p, protein koji pokazuje endoglukanaznu ili transglikozidaznu aktivnost u *in vitro* testu, ovisno o koncentraciji supstrata (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 su glukan-remodelirajući enzimi. Međutim, enzimska aktivnost ovih proteina nije dokazana *in vitro*. Scw3p/Sun4p protein je pronađen u SDS-topivoj frakciji proteina stijenke, te je utvrđeno kako sudjeluje u pregrađivanju i ostalim morfogenetskim promjena u stijenci *S.cerevisiae* i *C. albicans*.

Druga grupa nekovalentno vezanih proteina obuhvaća dvije egzoglukanaze, Exg1p i Spr1p, koje su funkcionalno slične trećoj, GPI-usidrenoj egzoglukanazi Exg2p (Larriba i sur., 1995). Treća glikozidazna aktivnost detektirana u staničnoj stijenci potječe od dvije hitinaze, Cts1p i Cts2p (Kuranda i Robbins, 1991). Cts1p ima ulogu u dijeljenju stanice, dok je Cts2p homologan s hitinazama i uključen u sporulaciju (Dünkler i sur., 2008).

1.3.2. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke

Proteini vezani preko GPI sidra

Fiziološka funkcija većine GPI-vezanih proteina je još uvijek neotkrivena. Neki od njih, kao što su 5 članova GAS obitelji, imaju glukan-remodelirajuću aktivnost (Ram i sur., 1995; Popolo i Vai, 1999). Proteini su intenzivno O- i N-glikozilirani i imaju C-terminalnu

domenu stabiliziranu disulfidnim vezama, važnu za pravilno smatanje cijele molekule. Ostali GPI-usidreni proteini stijenke s enzimskom aktivnosti uključuju egzoglukanazu Exg2p i dva proteina, Crh1p i Utr2p/Crh2p, koji imaju transglikozidaznu aktivnost potrebnu za unakrsno vezanje β -1,3-glukana s hitinom.

Dva seta GPI-vezanih proteina su potrebna za interakcije između stanica u različitim uvjetima. Obitelj FLO proteina (Flo1p, Flo5p, Flo9p, Flo10p), tzv. flokulini, su lektinima slični proteini potrebni za flokulaciju, dok su Aga1p/Aga2p kompleks i Sag1p aglutinini. Drugi set proteina stijenke vezanih preko GPI sidra obuhvaća članove TIR obitelji koji se različito eksprimiraju u anaerobnim uvjetima. Dva člana ove obitelji, Cwp1p i Cwp2p su represibilni, dok su Dan1p, Dan4p, Tir1p-Tir4p i Tip1p inducibilni (Abramova i sur., 2001). Unatoč činjenici da su Cwp1p i Cwp2p prvi opisani GPI-vezani proteini u kvascu malo se zna o fiziološkoj funkciji članova TIR obitelji. Nedavno je utvrđeno kako su transkripcija i inkorporacija u staničnu stijenku Cwp1p, Cwp2p i Tip1p regulirane staničnim ciklusom. (Smits i sur., 2006).

PIR obitelj

Alkalna ekstrakcija biotinom označenih proteina stijenke rezultirala je oslobađanjem proteina tzv. Pir porodice: Pir1p/Ccw6p, Hsp150/Pir2p/Ccw7p, Pir3p/Ccw8p i Cis3p/Pirp4/Ccw5p. Ovi proteini su strukturno slični, bogati su serinom i treoninom, te intenzivno O-manozilirani. Svi članovi ove porodice sadrže N-terminalni signalni peptid za upućivanje u sekretorni put, mjesto za cijepanje Kex2p endoproteazom i ponavljajuće regije. Na temelju do sada ispitanih svojstava raličitih mutanata u Pir proteinima smatra se da ovi proteini imaju ulogu u održavanju integriteta stanice i stanične stijenke, iako još nije točno definirano na koji način. Ustanovljeno je da su stanice *ccw6ccw7ccw8* mutanata osjetljivije na djelovanje biljnog antifungalnog proteina osmotina, dok prekomjerna ekspresija *CCW7/PIR2* rezultira povećanom rezistencijom na osmotin (Yun i sur., 1997). Vongsamphanh i suradnici (2001) su detektirali Ccw6p/Pir1p kao protein koji se povezuje sa Apn1p endonukleazom (koja uklanja AP mutacije u DNA) i upravlja translokacijom Apn1p u mitohondrij kako bi se održala genetska stabilnost mitohondrijske DNA (Vongsamphanh i sur., 2001). Apn1p se u stanicama *ccw6/pir1* ne transportira u mitohondrij već samo u nukleus. Ekspresija *PIR* gena se aktivira u G1 fazi staničnog ciklusa, a primijećeno je i da se geni ove porodice pojačano eksprimiraju u uvjetima staničnog stresa (Terashima i sur., 2000; Jung i Levin., 1999).

3.4. SEKRETORNI PUT

Svi proteini stanica osim onih citoplazmatskih, sadrže signal koji određuje njihovu konačnu lokalizaciju u stanici. Kod ekstracelularnih proteina taj slijed čini 15 do 30 aminokiselina, koje se nalaze na njihovom amino-terminalnom kraju i čine signalnu sekvenciju (Briggs i Gierasch, 1985). Sekvencija je građena od 3 dijela: obično polarnije C-terminalne regije građene od 4 do 7 aminokiselinskih ostataka, središnje hidrofobne regije te bazične N-terminalne regije (Von Heijne, 1986).

Sinteza ekstracelularnih proteina započinje na slobodnim ribosomima u citoplazmi. Signalnu sekvenciju prepoznaje citoplazmatska struktura građena od RNA i proteina, tzv. SRP («signal recognition particle»), koja se preko specifičnih receptora veže na membranu endoplazmatskog retikuluma. SRP i njen receptor posreduju u vezanju ribosoma s rastućim polipeptidnim lancem na endoplazmatski retikulum (Walter i Blobel, 1981; Meyer i sur., 1982). Kroz membranu ovog organela translocira se sintetizirani dio polipeptida, te se njegova sinteza nastavlja u lumen, gdje signalnu sekvenciju uklanja signalna peptidaza (Blobel i Dobberstein, 1975; Kreil i sur., 1980). U endoplazmatskom retikulumu dolazi do smatanja proteina u biološki aktivnu konformaciju (Gething i Sambrook, 1992.) i tu počinju postsintetske modifikacije koje u kvascu uključuju vezanje glikozil-fosfatidilinozitola i glikozilaciju. Protein se dalje transportira u Golgi kompleks gdje se modificira ugljikohidratni dio glikoproteina i eventualno dolazi do njegovog proteolitičkog procesiranja. Iz Golgi-a se proteini usmjeravaju prema staničnoj membrani. Transport je iz jednog organela u drugi posredovan transportnim vezikulama. (Pffefer i Rothman, 1987).

Faktori koji utječu na konačnu lokalizaciju ekstracelularnih proteina nakon njihovog prolaska kroz staničnu membranu još uvijek nisu u potpunosti poznati. Neki od tih proteina, kao invertaza i kiselina fosfataza su lokalizirani u periplazmatskom prostoru u topivom obliku (Barbarić i sur., 1984; Goldstein i Lampen, 1975), neki se ugrađuju u staničnu stijenk, dok se neki izlučuju u okolni medij, kao npr. hitinaza (Cts1p), egzoglukanaza (Exg1p) te fiziološki aktivni peptidi α - i α -faktor (Goldstein i Lampen, 1975).

3.5. PROTEOLITIČKI ENZIMI UKLJUČENI U PROCESIRANJE PROTEINA STANIČNE STIJENKE

1.5.1. Protein Kex2p i njegova fiziološka uloga u stanici

Kex2p je Ca^{2+} ovisna serinska proteaza u procesiranju proproteina (Fuller i sur., 1989a). Najistraživaniji je predstavnik konzervirane obitelji pro-hormonskih i pro-proteinskih konvertaza nađenih u sekretornom putu (Rockwell i Thorner, 2004). Sudjeluje u aktivaciji proteina kao što je slučaj s pro-peptidom i neophodnim kod parenja. Stanice *kex2* -

afinitetom za katalizu reže iza para Lys-Arg sa omjerom k_{cat}/K_m i do $1.1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ inkovitom sa $t_{1/2}$ i da je u jako maloj koncentraciji (Wilcox i Fuller, 1991). Temperaturnim pomakom sa 30°C na 37°C vrijeme poluživota Kex2p pada na 42 min, a kada na toj temperaturi kvasac raste šest generacija vrijeme poluživota smanjuje se na 30 min (Wilcox i sur., 1992).

Kex2p se translacija kao inaktivni prekursor građen od više domena koje podliježu modifikacijama. Kex2 zimogen se sastoji od N-terminalne signalne sekvence za endoplazmatski retikulum, pro-domene koja je neophodna

koj domeni smatanje u aktivnu konformaciju. Odsutnost pro-domene na glikozilaciju i stabilnost i rezultira zadržavanjem enzima u ER (Lesage i sur., 2000).

ko djelovanje in vivo, Ser/Thr bogata domena koja je visoko glikozilirana, transmembranska domena i citosolni „rep“ koji sadrži TGN (Trans Go

ite dijelove stanice i retrogradnim (Griffiths i Simons, 1986). Mutacija TGN signala (TLS) na C-terminusu uzrokuje brzi tranzit Kex2p u vakuole i degradaciju, umjesto kruženja između TGN (Trans Golgi Network=kasni Golgi) i kasnog endosoma (Brickner i Fuller, 1997).

Aktivacija Kex2p se odvija u više koraka reakcijama na N-terminal inje sa kotranslacijskim odcjepljivanjem signalne sekvence u ER te N- i O-glikozilacijom. Ubrzo slijedi autoproceniranje pro-regije od 89 aminokiselina, što je neophodan korak za stvaranje zrelog, aktivnog enzima. Pro-domena se odcjepljuje -

ki aktivan (Wilcox i Fuller, 1991; Germain i sur., 1993). Slijedi intenzivna N- i O-gli 13p dipeptilaminopeptidazom te lociranje zrelog proteina u kasnom Golgiju (Brenner i Fuller, 1992).

ne stijenke (Brickner i Fuller, 1997), prote njih hifa (Wösten i sur., 1996), feromona α -faktora i killer toksina (Julius i sur., 1984), zimogena sekretornih proteaza (homolog Kex2p u *Candida tropicalis* procesira aspartil proteazu Sapt1) (Enderlin i Ogrydziak 1994, Togni i sur., 1996), lipaza (Pignede i sur., 2000) i autokatalizira svoju proteolizu s ciljem nastanka aktivne forme enzima (Germain i sur., 1993). Newport i sur. (2002) su kompjuterskom analizom sekvenci proteina predvidjeli aspartil proteaze YPS1 i YPS3 kao potencijalne supstrate Kex2p.

Prm1p („Pheromone regulated membrane protein 1“), proteinom važnim za fuziju stanica prilikom parenja (Heiman i sur., 2007).

procesiranja α -faktora slijedilo je iscrpno istraživanje Kex2p u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Homolog Kex2p u bakterijama je subtilizin, a u patogenu *Candida albicans* homolog ovog enzima je faktor virulentnosti (Newport i sur., 2002). Njegovi homolozi u sisavaca su furin i PC („prohormone convertase“) porodica koja procesira hormonske (inzulin, glukagon) i neuropeptidne prekursore, faktore rasta, receptore, metalo- i aspartil-proteaze, glikoproteine ovojnice virusa (HIV) i toksine bakterija (Zhou i sur., 1999; Thomas, 2002). Defekti u ovim genima imaju za posljedicu nastanak bolesti poput dijabetesa i raka, npr. furin procesira metaloproteaze potrebne za širenje stanica raka (Bassi i sur., 2001).

1.5.2. Proteaze iz porodice japsina i njihova fiziološka uloga u stanici

Japsini su proteini iz porodice aspartatnih proteaza koju kod *S.cerevisiae*

ne aminokiseline što su Bourbonnais i sur. (199

na pro-regija. Pro-regija

in vivo (van den Hazel i

sur., 1993).

japsin pravilno lokalizira

ine dva aspartatna aminokiselinska ostatka, po jedan u visoko konzerviranoj sekvenci Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb gdje su Xaa hidrofobni aminokiselinski ostatci ka domena se sastoji od dva dijela koje povezuje disulfidni most između kojih se nalazi slobodni dio polipeptidnog lanca u obliku petlje tzv. „loop insertion“ (Rawlings i sur., 2004). „Loop insertion“ nije prisutna u

ini jedan polipeptidni lanac, kao kod Yps3p (Olsen i sur., 1999). Japsini kvasca *S. cerevisiae* ke domene slijedi regija bogata Ser/Thr aminokiselinskim ostatcima koja je intenzivno O-glikozilirana, a funkcij ena (Gagnon-Arsenault i sur., 2006).

noj stijenci. Do otpuštanja Yps1p i Yps2p sa površine stanice došlo je nakon tretmana stanica bakterijskom fosfatidilinozitol-fosfolipazom C (Komano i Fuller, 1995). Delecija C-terminalnog dijela Yps2, koji nosi signal za vezanje GPI sidra, uzrokovala je gubitak aktivnosti enzima što ukazuje da je za funkciju ove proteaze esencijalna lokalizacija u plazma membrani (Komano i Fuller, 1995).

ke domene negativno nabijeni (Richter i sur., 1998).

Aktivacija zimogena događa se kada projapsin dođe u kiseli okoliš gdje dolazi do odbijanja pozitivnih naboja u prosegmentu i protoniranja Asp u katalitičkoj domeni što destabilizira njihove interakcije. To dovodi do autokatalitičke aktivacije zimogena. Ovaj model nije važeći za sve japsine kod kojih se događa proteoliza katalizirana drugim proteazama. Primjeri su β -sekretaza aktivirana (konvertaza slična Kex2p) (Benett i sur., 2000) i Pep4p koji se aktivira ulaskom u vakuole proteazom B (Wolff i sur., 1996). No čini se da je autokataliza alternativa posredovanoj proteolizi jer je kod ova dva proteina utvrđena autoaktivacija zimogena u kiselom pH (Wolff i sur., 1996; Lin i sur., 2000). Cijepanje prosegmenta događa se iza jedne ili dvije bazične aminokiseline, a to je karakteristična sekvenca za djelovanje japsina i Kex2p.

Ekspresija japsina ovisna je o uvjetima okoline. Uočeno je da se ekspresija povećava 12 puta kod temperaturnog pomaka sa 24°C na 37°C što implicira da japsini sudjeluju u odgovoru na temperaturni stres (Ash i sur., 1995). Dvostruki mutant s disruptiranim YPS1 i

kompensira defekt u rastu kod *5yps1Δ*. To znači da ove dvije proteaze imaju slične funkcije i supstrate *in vivo* (Komano i Fuller, 1995). Na 37°C dolazi

do smanjenja umanjuje smrtnost. To dokazuje da su japsini neophodni za održavanje integriteta stanične stijenke (Krysan i sur., 2005). Japsini su pojačano eksprimirani u periodu aktivne sinteze i remodeliranja stanič

zimolijazom, Congo Red-om i Calcofluor White-om te SDS-om i Ca^{2+} i Na^+ solima, a disruptant *yps1Δyps2Δ* je najosjetljiviji (Krysan i sur., 2005). *5yps1Δ* pokazuje jaku osjetljivost na Congo Red i Calcofluor White. Yps1p je važan za homeostazu β -1,3-glukana jer *yps1Δ* mutant pokazuje značajnu osjetljivost na kaspofungin, inhibitor sinteze β -1,3-glukana i Congo Red koji uzrokuje nepravilnosti u formiranju β -1,3-glukanskog sloja (Krysan i sur., 2005). *5yps1Δ* i *yps1Δyps2Δ* imaju izmjenjen udio polisaharida stijenke, smanjen udio glukana, a pošto su japsini važni za uspostavljanje pravilne strukture stijenke. Ekspresija YPS1 je dio transkripcijskog odgovora stanice na stres u sklopu PKC1-MAPK1 signalne kaskade (Krysan i sur., 2005) za koju je poznato da sudjeluje u održavanju integriteta stanične stijenke u uvjetima stresa (Heinisch i sur., 1999). YPS1 i FKS2 (inducibilna podjedinica β -1,3-glukan sintetaze) geni inducirani su pri odgovoru na stres što sugerira da Yps1p promovira zadrž

sintezu glukana kao odgovora na stanični stres. Tada bi japsini mogli sudjelovati zadrž

avanje sinteze. Pretpostavlja se da su glukanaze i transglukozidaze stanične stijenke supstrat japsinima. Tako bi japsini održavali ravnotežu u

procesima sinteze i degradacije glukana stijenke (Krysan i sur., 2005).

U slučaju jednostrukih mutanata, jedino *yps1Δ* i *yps7Δ* pokazuju značajno izmjenjen fenotip što znači da imaju vrlo važne uloge u procesima vezanim za staničnu stijenku (Krysan i sur., 2005).

noj membrani (Frieman i sur.,

noj stijenci (Hamada i sur., 1999) što bi znač

iji skup supstrata i veliku važnost u procesima održavanja strukture stijenke (Krysan i sur., 2005).

Yps3p, iako pojačano eksprimiran u uvjetima stresa, ne utječe na fenotip u istima. Smatra se da se *YPS2* konstitutivno eksprimira i da je stalno aktivan, dok je ekspresija *YPS1* inducirana s

ima

enzimsku aktivnost u različitim dijelovima stanice, gdje je različit pH št
cijepa supstrate na površini stanice pri širokom spektru promjena pH okoliša (Gagnon-Arsenault i sur., 2006).

Yps1p najistraživaniji je predstavnik obitelji japsina, a homolog u sisavaca mu je proopomelanokortin konvertaza s kojim ima veliku strukturnu i funkcionalnu sličnost. *Yps1p* procesira *in vivo* proopiomelanokortin u staničnoj liniji sisavaca PC12 (Cool i sur., 1996). Zreli *Yps1p* (*Yap3*) je heterodimer stabiliziran intramolekularnim disulfidnim mostom. Između dvije podjedinice zimogena nalazi se „loop“ regija koja je karakteristična za japsine no još uvijek nepoznate funkcije (Gagnon-Arsenault i sur., 2006). U predjelu „loop-a“ kod *Yps1p* dolazi do autoproteolize čime se generira enzim od dvije podjedinice. Ovisno o vanjskom pH ovo cjepanje se događa iza različitih bazičnih aminokiselina zbog čega se generiraju različite dužine podjedinica kod pH 3.0 i 6.0 (Gagnon-Arsenault i sur., 2008). Pro-regija je neophodna za pravilno smatanje enzima i lokalizaciju, no tek je enzim bez pro-regije u aktivnoj konformaciji. Eksperimenti u kojima je *Yps1p* eksprimiran bez pro-regije pokazuju da je lokaliziran intracelularno i bez aktivnosti. Cawley i suradnici (1998) smatraju da je odcjepljenje pro-regije *Yps1p* autokatalizirano, neovisno o *Kex2p*, *Yps2p* i drugim molekulama *Yps1p*. Ovisno o vanjskom pH, Gagnon-Arsenault i sur. (2008) predlažu model autokatalize u kiselom pH 3.0, dok kod pH 6.0 pretpostavljaju katalizu posredovanu drugim peptidazama. Pri kiselijem pH događa se odcjepljivanje proregije iza više različit

drugih peptidaza (Gagnon-Arsenault i sur., 2008).

Smatra se da Yps1p sudjeluje u aktivaciji periplazmatskih enzima i enzima koji sudjeluju u izgradnji i remodeliranju stanične stijenke (Ash i sur., 1995; Cawley i sur., 1995), ali i da odcjepljuje proteine vezane u staničnu stijenku (Gagnon-Arsenault i sur., 2008). Supstrati Yps1p su glukanoziltransferaza Gas1p, manoprotein Pir4p i sam Yps1p (Gagnon-Arsenault i sur., 2008).

Fenotipske karakteristike *kex2*

α -feromona (J

(Komano i Fuller, 1995). Kod takvog soja

overekspresijom *YPS1*

α -feromona (Egel-Mitani

i sur., 1990), kao i overekspresijom *YPS2* gena, koji kompenzira i osjetljivost

(Komano i Fuller, 1995). Procesiranje α -feromona sa Yps1p alternativni je put jer se kod *yps1Δ* mutanta procesiranje α -feromona odvija normalno, kao i sve druge fiziološke funkcije (Egel-Mitani i sur., 1990). Yps1p i Yps2p su 53% identični i specifično režu iza bazičnih aminokiselina Lys i Arg i čini se da imaju zajedničke supstrate sa Kex2p *in vivo* (Cawley i sur., 1998). Ostale nejapsinske aspartatne proteaze režu iza hidrofobnih aminokiselina (Kay i Dunn, 1992). Yps1p je jedini japsin sposoban proteolitički cijepati vezu između dvije bazične aminokiseline (Komano i sur., 1999). Disrupcija *YPS1* i *YPS2* gena uzrokuje usporen rast na 37°C, što implicira da je aktivnost japsina važna pri rastu na 37°C. Istraživanja Komano-a i Fuller-a (1999) pokazuju da Yps1p, Yps2p i Kex2p imaju sinergističko djelovanje i potrebni su za normalan rast stanice te da disruptanat *yps1yps2kex2*

Homolozi japsina u *Candida albicans* su faktori virulentnosti (Albrecht i sur., 2006) pa bi stoga dizajn inhibitora japsina mogao dovesti do razvoja novih antifungalnih lijekova. Cawley i suradnici (2003) sintetizirali su potencijalni kompetitivni inhibitor CaYps1p na temelju analoga kolecistokinina.

1.5.3. Fiziološka uloga proteina Scw4p i Scw10 u staničnoj stijenci kvasca

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*. Takav je slučaj i sa njegovim homologom iste molekulske mase s kojim dijeli 63% identičnosti, Scw10p. Mutanti *scw4scw10* pokazuju sinergističko djelovanje te produljeno gen -a.

Zanimljivo je da kod takvih mutanata, dodatnom disrupcijom *BGL2* gena, takav fenotip biva kompenziran (Cappellaro i sur., 1998). Kako bi se uočile eventualne razlike, analiziran je sadržaj ugljikohidrata stanične stijenke soja *scw4scw10*, no udio pojedinih komponenata nije promjenjen što dovodi do zaključka da ovi proteini sudjeluju u kompleksnijim promjenama u stijenci (Cappellaro i sur., 1998). Ova dva proteina sinergistički djeluju i na sposobnost parenja. Naime, parenje haploida *scw4scw10* x *scw4scw10* prilično je bezuspješno, a fenomen djelomično kompenzira disrupcija *BGL2* gena (Cappellaro i sur., 1998). Nadalje, kod ovog mutanta je znatno smanjena količina glukanazama ekstrahiranih proteina i pojačana osjetljivost na Calcofluor White. S obzirom na fenomen da dvostruk

količinu nekovalentno vezanih proteina u stijenci koja se smanjuje delecijom *BGL2*

4p i Scw10p transglukozidaze. Njihova disrupcija destabilizira staničnu stijenku, a efekt pojačava funkcionalni Bgl2p koji kao endoglukozidaza degradira netransglukozilirane lance glukana. Stoga disrupcija *BGL2* gena donekle stabilizira stijenku (Cappellaro i sur., 1998). Ekspresija *SCW4* gena je konstantna u svim fazama staničnog ciklusa, dok je kod *SCW10* gena maksimalna u G1 fazi (Spellman i sur., 1998). Prisutnost ijednog od ta dva proteina je dovoljna za normalno funkcioniranje stanične stijenke (Šestak i sur.,2004).

Također su konstruirani i mutanti kvasca sa prekomjernom produkcijom Scw4p ili Scw10p k

, 2010). Fenotipska karakteristika stanica sa prekomjernom produkcijom Scw4p i Scw10 pokazuje pojavu velikih stanica sa oslabljenom stijenkom i stanica koje su izgubile stanični sadržaj (tzv. ghost , 2010).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

U ovom radu će se usporediti način vezanja Scw4p-HA u staničnu stijenku divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta. Zatim će se ispitati utjecaj uvođenja mutacije u regiju za procesiranje Scw4p na raspodjelu Scw4p-HA u staničnoj stijenci, te utjecaj uzgoja pri različitim uvjetima pH (pH 4 i pH 7) na procesiranje Scw4p kod divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanata.

Pojedinačni ciljevi za ostvarenje krajnjeg cilja istraživanja jesu:

Usporediti način vezanja Scw4p-HA u staničnoj stijenci divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta “Western blot” metodom

Uvesti mutaciju u *SCW4* u regiji koja odgovara mjestu za postranslacijsko procesiranje proteina Kex2p proteazom pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR)

Sekvencioniranjem provjeriti da li je mutacija dobro uvedena

Transformirati divlji tip kvasca pripremljenim plazmidom

Izolirati stanične stijenke divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta transformiranih s nativnim *SCW4* te stijenke divljeg tipa kvasca transformiranog s mutiranim *SCW4* i usporediti procesiranje i raspodjelu nativnog i mutiranog Scw4p-HA u staničnoj stijenci “Western blot” metodom

Usporediti procesiranje i raspodjelu nativnog i mutiranog Scw4p-HA u staničnoj stijenci divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta prilikom uzgoja u različitim uvjetima, tj. pri pH4 i pH7

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- agar, kvaščev ekstrakt, pepton, baktotripton i kvaščeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) – Biolife (Milano, Italija)
- histidin, uracil, leucin, triptofan, lizin i etidijev bromid –Merck (Darmstadt, Njemačka)
- ECL-otopine za razvijanje blota, standardi za proteinsku elektroforezu, λ DNA standard za elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- amonijev persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, Triton X-100, β -merkaptotanol i N-dodecilsulfat (SDS) – Fluka (Buchs, Švicarska)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Ponceau S i polietilenglikol 4000 (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 uvjeti uzgoja stanica kvasca

Za submerzni uzgoj stanica kvasca korištena je selektivna YNB podloga. YNB podloga sastoji se od 6,7g/L YNB (Yeast Nitrogen Base, bez aminokiselina), 2g/L smjese aminokiselina i vitamina (drop out) koja sadrži sve aminokiseline potrebne za rast kvasca osim onih preko kojih se vrši selekcija auksotrofnih ($\phi = 0,02$) (Sambrook i Russel, 2001). Kao izvor ugljika korištena je glukoza (50%), i galaktoza (20%). Ovisno o auksotrofnosti soja u podlogu se dodaju histidin (80mg/L), uracil (80mg/L), triptofan (80mg/L) i leucin (160mg/L) sterilizirani autoklaviranjem.

Smjesa aminokiselina i vitamina (drop out):

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

, uz dodatak 15 g/L agara.

121°C i tlaku od 1atm.

3.1.3. Hranjive podloge i uvjeti uzgoja bakterija

E. coli uzgajana je u tekućoj LB podlozi (baktotripton ($\varphi = 0,01$), kvaščev ekstrakt ($\varphi = 0,05$), NaCl ($\varphi = 0,05$)), odnosno na krutoj LB podlozi (baktotripton ($\varphi = 0,01$), kvaščev ekstrakt ($\varphi = 0,05$), NaCl ($\varphi = 0,05$), agar ($\varphi = 0,015$)). Za uzgoj stanica nakon transformacije plazmidima koji nose gen za rezistenciju na ampicilin u tekuću LB podlogu dodavan je ampicilin u koncentraciji 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a u krutu LB podlogu u koncentraciji 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.1.4. Sojevi kvasca

U radu su korišteni laboratorijski sojevi kvasca.

Tablica 1. Pregled korištenih laboratorijskih sojeva kvasca

Soj kvasca	Genotip
BY4741	MAT a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0
YNL238W	BY4741; <i>kex2::kanMX4</i>
YRWS4	BY4741 + pBG1805 <i>SCW4-HA</i>
YRKS4	YNL238W + pBG1805 <i>SCW4-HA</i>
YRMS4	BY4741 + pRMS4

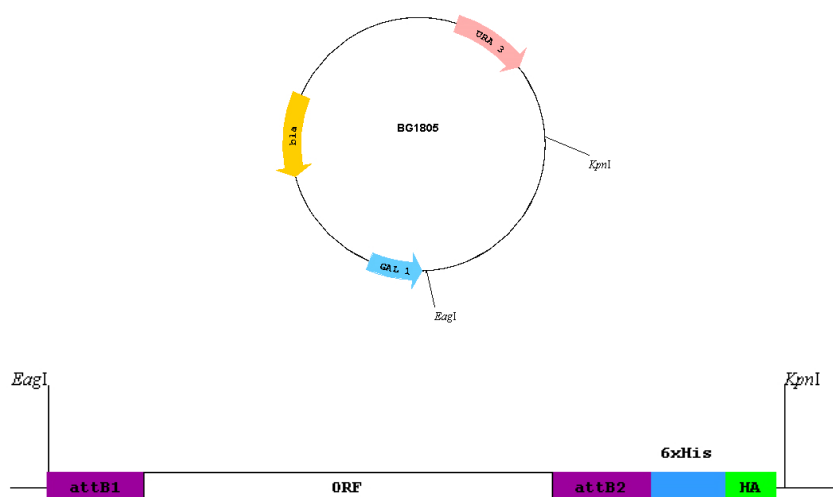
3.1.5. Sojevi bakterija

Korišten je soj *Escherichie coli* slijedećeg genotipa:

DH5 α 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. Plazmidi

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 *URA* gen koji omogućuje selekciju transformiranih stanica kvasca na hranjivim podlogama bez uracila. *SCW4* gen je stavljen pod kontrolu promotora *GAL*, a iza gena se nalaze nastavci HA i 6xHis (Slika 2.)



Slika 2. Plazmid pBG1805 (Stuparević, 2010).

Drugi korišteni plazmid je pRMS4 dobiven uvođenjem mutacije unutar sekvence *SCW4* gena u prethodno opisanom plazmidu pBG1805 *SCW4-HA*. Uvedena mutacija je zamjena dijela sekvence koja kodira za K₂₉R₃₀ (mjesto za procesiranje Scw4p pomoću Kex2p proteaze) u A₂₉A₃₀. Mutacija je uvedena pomoću PCR-a metodom "megapočetnice" (poglavlje 4.2.7.).

3.1.7. Oligonukleotidi

Tablica 2. Oligonukleotidi korišteni za uvođenje mutacije u gen *SCW4* PCR metodom. Žuto je u označena regija za cijepanje restriksijskim enzimom SacI, zeleno za cijepanje sa HindIII. Plavo označene regije u početnicama KRuAAfor1 i KRuAArev1 su unesene mutacije koje rezultiraju zamjenom K₂₉R₃₀ u A₂₉A₃₀.

naziv početnice	Sekvenca
primer F	5' CAA AAG CTG GAG CTC CAC CGC GGG AAC G 3'
primer R	5' GAA CTA GAG GAA G AA GCT T GG GAG GAA GAG GAA G 3'
KRuAAfor1	5' CAC AAG GAC GCG GCG GCT GTG GTC 3'
KRuAArev1	5'GAC CAC AGC CGC CGC GTC CTT GTG 3'

3.2. METODE RADA

3.2.1. 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).

3.2.2. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Cijepanja DNA provedena su restrikcijskim enzimima SacI i HindIII prema uputama proizvođača restrikcijskih enzima („New England Biolabs“ Ipswich, MA, SAD).

3.2.3. Ligacija plazmidne DNA

Ligacijska smjesa ukupnog volumena od 10 μ l se sastojala od 50 ng plazmida (prethodno pripremljenog restrikcijom pomoću enzima SacI i HindIII), 25 ng fragmenta (prethodno pripremljenog restrikcijom pomoću enzima SacI i HindIII), 1 μ L 10x koncentriranog pufera za T₄ ligazu i 2.5 U T₄ ligaze. U ligaciji je korišten molarni odnos plazmida i fragmenta 1:3. Smjesa je inkubirana na 4°C preko noći.

3.2.4. Transformacija kompetentnih stanica *E. coli*

U hladne kivete od 1,5 mL doda se 100 μ L suspenzije stanica i do 10 μ L DNA, te se kivete stave u led 20 min. Nakon toga se 20 sekundi inkubiraju pri 42 °C i ponovno vrata u led ("heatshock") na 2 minute, zatim se doda 1 mL tekuće LB-podloge i sve inkubira 1 sat pri 37 °C. Po 200 μ L od ove suspenzije i prvog decimalnog razrijedenja, nacijepi se na krute LB-ploče s ampicilinom i inkubira preko noći na 37 °C.

3.2.5. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *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 °C u 3 mL LB podloge uz dodatak ampicilina u koncentraciji 100 μ g/mL.

3.2.6. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza DNA je provedena u 1% agaroznom gelu pripremljenom s TAE -puferom (40 mmol/L TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol/L EDTA). Elektroforeza je provedena pri naponu 5 V/cm gela, a po njenom završetku gel je uronjen u otopinu etidij-bromida na 15 minuta nakon čega su vrpce DNA su vizualizirane pomoću UV svjetla na transiluminatoru (Hofer, Macrovue UVis-20).

3.2.7. Uvođenje mutacije u gen *SCW4* metodom "megapočetnice"

Za uvođenje mutacije K₂₉R₃₀ u A₂₉A₃₀ u *SCW4* gen PCR metodom "megapočetnice" (Huges, S., Moody, A., 2007) korišteni su oligonukleotidi prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Oligonukleotidi korišteni za uvođenje mutacije u gen *SCW4* PCR metodom. Žuto je u označena regija za cijepanje restriksijskim enzimom SacI, zeleno za cijepanje sa HindIII. Plavo označene regije u početnicama KRuAAfor1 i KRuAArev1 su unesene mutacije koje rezultiraju zamjenom K₂₉R₃₀ u A₂₉A₃₀.

naziv početnice	Sekvenca
primer F	5' CAA AAG CTG GAG CTC CAC CGC GGG AAC G 3'
primer R	5' GAA CTA GAG GAA G AA GCT TGG GAG GAA GAG GAA G 3'
KRuAAfor1	5' CAC AAG GAC GCG GCG GCT GTG GTC 3'
KRuAArev1	5'GAC CAC AGC CGC CGC GTC CTT GTG 3'

U prvom koraku je PCR-om koristeći plazmid pBG1805 *SCW4-HA* kao kalup uz upotrebu parova početnica "primer F" i "KRuAArev1" umnožen dio promotorske regije i početak *SCW4* gena pri čemu je u produkt (1. PCR produkt) unesena željena mutacija. U drugom koraku je koristeći plazmid pBG1805 *SCW4-HA* kao kalup uz upotrebu parova početnica "primer R" i "KRuAAfor1" umnožen dio *SCW4* gena nizvodno od mjesta na koje se unosi mutacija i mutirana regija (2. PCR produkt) (slika 3).

Reakcijska smjesa volumena 50 µL bila je sljedećeg sastava:

pBG1805 *SCW4-HA* kao kalup 4,00 ng/µL

početnice 1,00 pmol/µL

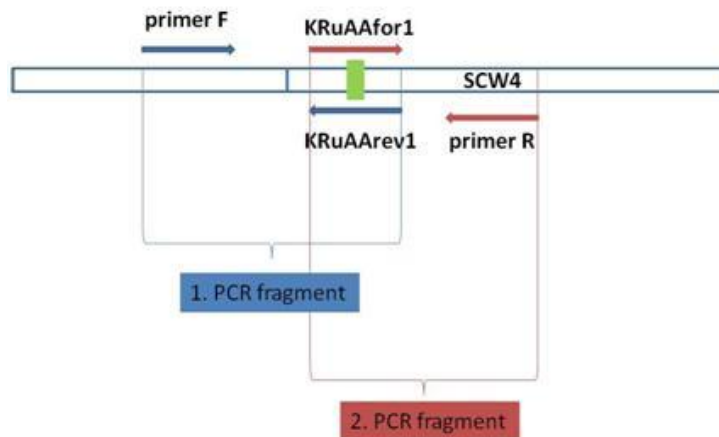
pufer za Taq polimerazu (10x koncentriran) 5,00 µL

smjesa deoksiribonukleozid-trifosfata (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 4 x 0,2 µM

Taq polimeraza jedna jedinica

sterilna deionizirana voda do 50,00 μ L

Reakcijska smjesa je denaturirana 5 minuta pri 95°C, te je provedeno 30 ciklusa umnažanja. Jedan ciklus sastojao se od denaturacije dvolančane DNA (45 sekundi pri 95°C), komplementarnog sparivanja klica s kalupom (90 sekundi pri 70°C) i sinteze DNA (42 sekundi pri 72°C).

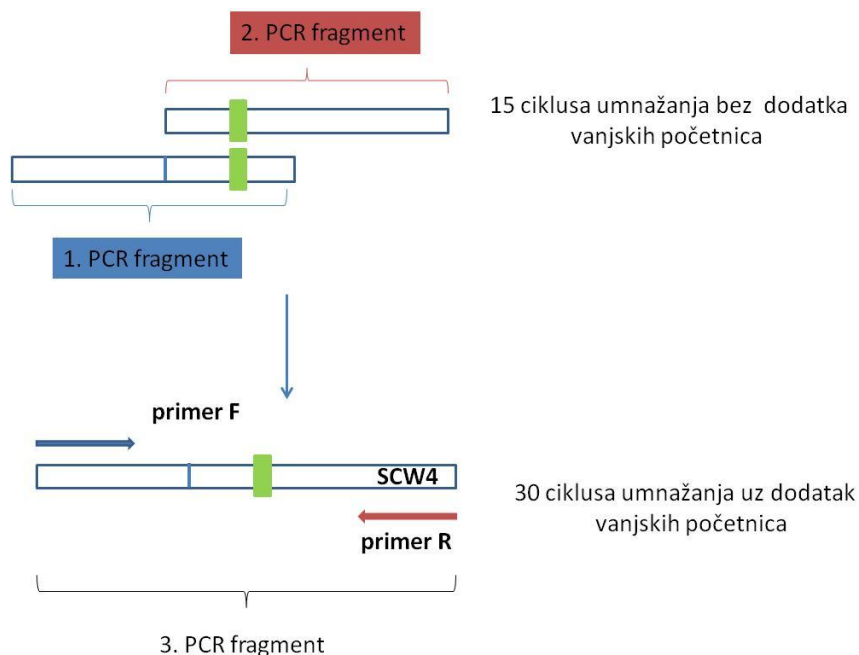


Slika 3. Unošenje mutacije u SCW4 gen metodom PCR-a - 1. stupanj. Zelenim pravokutnikom je označena regija u koju je unesena mutacija koja rezultira zamjenom K₂₉R₃₀ u A₂₉A₃₀.

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

Pročišćeni produkti su zatim upotrebljeni za drugi krug PCRa, gdje su korišteni kao kalup za umnažanje umjesto pBG1805 *SCW4-HA* (slika 4). U reakcijsku smjesu su uzete ekvimolarne količine PCR produkta 1 i 2 (po 100 nmola svakog PCR produkta), pufer za Taq polimerazu (10x koncentriran), smjesa deoksiribonukleozid-trifosfata, voda i Taq polimeraza u količinama kao i u prvom krugu PCRa. Reakcijska smjesa je denaturirana 5 minuta pri 95°C, te je provedeno 15 ciklusa umnažanja. Jedan ciklus sastojao se od denaturacije dvolančane DNA (45 sekundi pri 95°C), komplementarnog sparivanja PCR produkata 1. i 2. u regijama koje se preklapaju (90 sekundi pri 70°C) i sinteze DNA (58 sekundi pri 72°C). 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 početnice "primer F" i "primer R" u koncentraciji 1,00 pmol/ μ L i umnažanje je nastavljeno u jednakim uvjetima još 30 ciklusa.

Dobiveni produkt (3. PCR fragment) je pročišćeni pomoću kita za pročišćavanje PCR produkata (QIAquick PCR purification Kit; „Qiagen“, Valencia, CA, USA).



Slika 4. Unošenje mutacije u SCW4 gen metodom PCR-a - 2. stupanj. Zelenim pravokutnikom je označena regija u koju je unesena mutacija koja rezultira zamjenom K₂₉R₃₀ u A₂₉A₃₀.

3.2.8. Transformacija stanica kvasca

Jedna kolonija kvasca s krute kompletne podloge prenese se u 10 mL tekuće kompletne podloge i preko noći uz aeraciju inkubira na rotacijskoj tresilici pri 28 do 30 °C tako da vrijednost OD₆₀₀ bude između 1 i 2 (tada je kvasac u logaritamskoj fazi rasta). Stanice se izdvoje centrifugiranjem 5 minuta pri 3000 x g, isperu s 30 mL sterilne deionizirane vode, a zatim se isperu sa sterilnim TE puferom. Nakon ispiranja, talog stanica resuspendira se u sterilnom TE puferu tako da OD₆₀₀ suspenzije u TE puferu bude između 50 i 60, dodaje se volumen 0,2 mol/L Li-acetata jednak volumenu TE pufera te se suspenzija inkubira inkubira 60 min na 30 °C na tresilici uz blago miješanje. Nakon inkubacije, u 100 µL suspenzije stanica dodaje se 1-10 µL plazmidne DNA i inkubira daljnjih 30 min na 30 °C bez miješanja. Ovoj se suspenziji, nakon laganog protresanja, dodaje 145 µL 60%-tne otopine PEG-4000 (prethodno sterilizirane kuhanjem na 95 °C kroz 5-10 min i ohlađene na oko 30 °C) tako da konačna koncentracija PEG-4000 u suspenziji bude 35%. Suspenzija se snažno protrese i inkubira daljnjih 60 min na 30 °C bez miješanja. Stanice se nakon toga podvrgnu toplinskom šoku pri 42 °C tijekom 6 min, nakon čega se suspenziji dodaje 1 mL sterilne hladne vode.

Stanice se odvoje centrifugiranjem 1 min na 8000 x g, talog se ispere s 1 mL sterilne vode te se resuspendira u 120 μ L sterilne vode i nacijepi na krutu selektivnu podlogu. Ploče se nakon nacijepljivanja inkubiraju u termostatu na 30 °C dok ne izrastu kolonije (48-96 sati).

3.2.9. Izolacija staničnih stijenki

Stanice kvasca odvojene su od podloge centrifugiranjem 5 minuta na 3000 o/min. Talog je ispran dva puta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu pH 8.0, a stanice su resuspendirane u što manjem volumenu istog pufera. Stanice su potom razbijene na vorteks mješalici, uz dodatak staklenih kuglica promjera 0.4 – 0,6 mm u vremenu od 10 minuta i povremeno hlađenje na ledu. Nakon razbijanja, stijenke su od staničnog ekstrakta odvojene centrifugiranjem 5 minuta na 3000 x g. Talog staničnih stijenki ispran je četiri puta s 50 mM kalij-fosfatnim puferom pH 8.0.

3.2.10. Izolacija nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Stanične stijenke su tretirane Laemmli puferom (50mM Tris-HCl pufer pH 6,8, 2 mM Na-EDTA, 2% SDS, 10% glicerol, 0,001% bromfenol plavo i 5% β -merkaptoetanol) 10 minuta pri temperaturi 95-100° C. Centrifugiranjem tretirane suspenzije stijenki, 5 minuta na 3000 o/min, odvojen je i sačuvan supernatant koji sadrži izolirane proteine koji su u stijenku bili vezani nekovalentnim vezama.

3.2.11. Izolacija kovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Nakon izolacije nekovalentno vezanih proteina stijenke su isprane 4 puta 50 mM K-fosfatnim puferom pH8 i jedan put vodom te

. Nakon toga suspenzija je centrifugirana 5 minuta na 3000 o/min i odvojen je supernatant koji sadrži izolirane proteine.

3.2.12. 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 μ l SDS i NaOH ekstrakata proteina dodano 5 μ l pufera za uzorke za elektroforezu po Laemmli-u (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2% SDS, 10% glicerol, 0,001% bromfenol plavo i 5% β -merkaptotanol). Uzorci su nanešeni 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' - metilenbisakrilamida, 0,1% SDS-a, 0,075% N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina (TEMED) i 7.5% amonij-persulfata (APS) u 0,5 M Tris-HCl puferu pH 6.8. 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 (25mM TRIS-glici

, a elektroforeza je zaustavljena kada boja dosegne rub ploče.

3.2.13. Prijenos proteina na nitrocelulozu i njihovo specifično obilježavanje

Nakon završene elektroforeze proteini iz poliakrilamidnog gela elektroforetski su prenešeni na nitroceluloznu membranu. Prijenos je proveden u natrij-karbonatnom puferu (10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃ i 20% metanol), uz stalnu jakost struje od 380 mA tijekom 90 minuta u za to namjenjenom uređaju (Hoefler Pharmacia Biotech Inc). Nakon završenog prijena nitroceluloza je bojena bojom Ponceau S (0,1% Ponceau S u 5%-tnoj octenoj kiselini). Obojeni standardi označeni su grafitnom olovkom, a boja je isprana destiliranom

vodom.

Za detekciju proteina označenih HA antitijelima, 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% obrano proteinima. Slijedila je inkubacija u puferu za blokiranje uz dodatak anti-HA antitijela (3 μ l komercijalnog preparata u 10 ml pufera za blokiranje). Nakon 90 minuta inkubacije, nitroceluloza je isprana tri puta po 10 minuta puferom za blokiranje. Na tako pripremljenu nitrocelulozu nanesen je 0,5 ml ECL-Amersham otopine za razvijanje, a kemilumini

4. REZULTATI

U okviru prijašnjih istraživanja ustanovljeno je da Scw4p protein stanične stijenke kvasca u svojoj sekvenci posjeduje mjesto za posttranslacijsko procesiranje Kex2p proteazom (Slika 5) te da se u stijenku veže na dva načina tj. da se može detektirati i u frakciji kovalentno i u frakciji nekovalentno vezanih proteina stijenke (, 2007). Nadalje je ustanovljeno da se neprocesirana forma Scw4p pretežno nalazi u frakciji kovalentno vezanih proteina, a neprocesirana u frakciji nekovalentno vezanih proteina (Stuparević, 2010). Stoga je moguće da način ugradnje proteina u stijenku ovisi upravo o njegovom procesiranju. Kako se pretpostavlja da do procesiranja dolazi djelovanjem Kex2p proteaze u ovom radu se prvo ispitalo procesiranje i raspodjela Scw4p u staničnim stijenkama divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta kojem u stanicama nedostaje Kex2p.

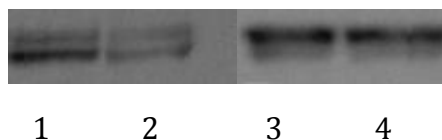
<p>Scw4p MRLSNLIASASLLSAATLAAPANHEHKDKRAVVTTTVQKQTTIIVNGAASPVAALEENAVVNSAPAAATSTTSSAASV ATAAASSSENNSQVSAASPASSAATSTQSSSSSQASSSSSGEDVSSFASGVRGITYTPYESSGACKSASEVASDLAQL TDFPVIRLYGTDCNQVENVFKAKASNQKVFLGIYYVDQIQDGVNTIKSAVESYGSWDDVTTVSIGNELVNGNQATPS QVGQYIDSGRSALKAAAGYGPVVSVDTFIAVINNPELSDYSDYMAVNAHAYFDKNTVAQDSGKWLLEQIQRVWTAC DGKKNVVITESGWPSKGETYGVAVPSKENQKDAVSAITSSCGADTFLFTA FN DYWKADGAYGVEKYWGILSNE*</p>
--

Slika 5 . Sekvenca proteina Scw4p. Crveno je označena signalna sekvenca, a zeleno mjesto za cijepanje Kex2p proteazom

4.1. Usporedba načina vezanja Scw4p-HA u staničnoj stijenci divljeg tipa i *kex2* mutanta

Divlji tip kvasca i *kex2* mutant, kojem nedostaje Kex2p proteaza, transformiran je plazmidom BG1805 koji sadrži gen *SCW4* pod kontrolom jakog inducibilnog *GAL* promotora što omogućuje prekomjernu produkciju proteina Scw4p u uvjetima uzgoja na galaktozi. Nakon uzgoja kvasca izolirani su proteini stanične stijenke ekstrakcijom vrućim SDS-om te 30mM NaOH kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Protein Scw4p u uzorcima je detektiran pomoću reakcije hemaglutininskog nastavka i specifičnih antitijela (anti-HA) „Western blot“ metodom (opisano u poglavlju Materijali i metode). Rezultati potvrđuju da je Scw4p u stijenku vezan na dva načina. U SDS ekstraktima, u kojima su izolirani nekovalentno vezani proteini stijenke, vidljive su dvije proteinske vrpce. Donja vrpca predstavlja kraću formu proteina za koju se pretpostavlja da nastaje procesiranjem ovog proteina s Kex2p. Gornja vrpca predstavlja neprocesiranu formu koja zbog prevelike produkcije proteina sa plazmida ostaje nespecifično vezana na stijenku nekovalentnim

interakcijama. NaOH ekstrakti sadrže proteine koji su bili kovalentno vezani u stijenku, gdje se može vidjeti da prevladavaju vrpce neprocesirane forme proteina. Ovakava rezultat se ne slaže sa prethodno dobivenim rezultatima (Stuparević, 2010) jer se kod *kex2* mutanta očekivalo da nema procesirane forme Scw4p niti u jednom ekstraktu.

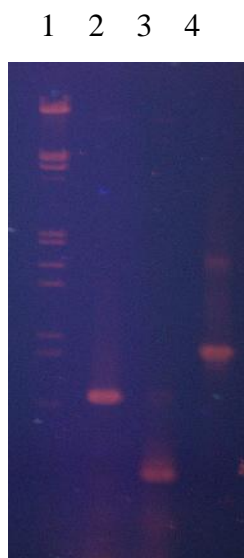


Slika 6. Raspodjela Scw4p-HA na procesiranu i neprocesiranu formu. Scw4p-HA je nakon izolacije iz stanične stijenke analiziran Western blot metodom pomoću antitijela specifičnih na HA oznaku. Linija: 1. Scw4p u SDS ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 2. Scw4p u SDS ekstraktu stijenki *kex2* mutanata; 3. Scw4p u NaOH ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 4. Scw4p u NaOH ekstraktu stijenki *kex2* mutanata.

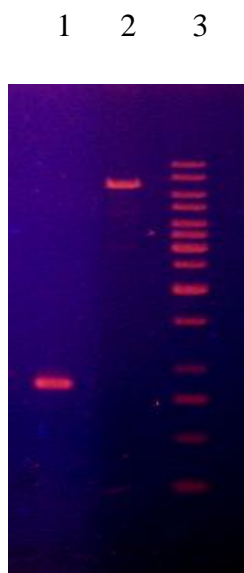
4.2. Uvođenje mutacije u *SCW4* u regiji koja odgovara mjestu za postranslacijsko procesiranje proteina Kex2p proteazom

Rezultat prethodnog eksperimenta koji pokazuje da u *kex2* mutantu ipak dolazi do procesiranja Scw4p otvara pitanje sudjelovanja Kex2p proteaze u procesiranju. Kako bi se dodatno ispitali i potvrdili rezultati dobiveni sa *kex2* mutantom uvedena je mutacija u *SCW4* gen u regiji specifičnoj za cijepanje Kex2p proteazom, kojom je dio sekvence koja kodira za K₂₉R₃₀ (mjesto za procesiranje Scw4p pomoću Kex2p proteaze) zamjenjem sekvencom koja kodira za A₂₉A₃₀. (Slika 5). Mutacija je uvedena pomoću PCR-a metodom "megapočetnice" kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Veličina dobivenih PCR produkata prikazana je slici 7. Sljedeći korak bio je restrikcija plazmida pBG1805 *SCW4-HA* i PCR fragmenta sa unesenom mutacijom enzimima SacI i Hind III, te pročišćavanje i izolacija fragmenata iz gela (Slika 8). Nakon toga je provedena ligacija plazmida i fragmenta kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode, te transformacija *E.coli* ligacijskom smjesom (opisno u poglavlju Materijali i metode). Iz kolonija *E.coli* koje su porasle na selektivnoj podlozi nakon transformacije izolirani su plazmidi (kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode) a uspješnost ligiranja fragmenta u plazmid je provjerena restrikcijom dobivenih plazmida pomoću enzima SacI i HindIII. Uspješnost ugradnje fragmenta sa unesenom mutacijom u

plazmid se vidi po tome što su nakon restrikcije izoliranog plazmida dobiveni fragmenti koji veličinom odgovaraju vrpci plazmida i PCR fragmenta koji su stavljeni na ligaciju (slika 9.).

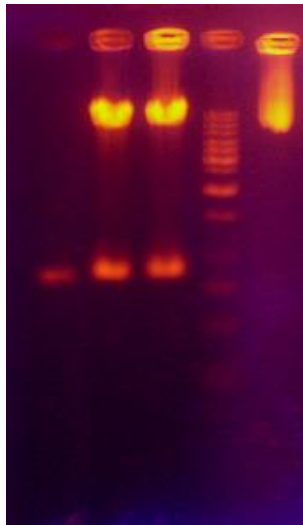


Slika 7. Elektroforetska analiza fragmenata umnoženih PCR-om. Uzorak: **1.** standardi λ HindIII/EcoRI; **2.** 1. PCR fragment dobiven korištenjem početnica "primer F" i "KRuAArev1" ; **3.** 2. PCR fragment dobiven korištenjem početnica "primer F" i "KRuAAfor1" ; **4.** 3. PCR fragment dobiven metodom "megapočetnice" (poglavlje Materijali i metode).



Slika 8. Elektroforetska analiza fragmenata pripremljenih za ligaciju. Uzorak: **1.** PCR fragment pripremljen za ligaciju restrikcijom sa SacI i HindIII i izolacijom iz gela; **2.** plazmid pripremljen za ligaciju restrikcijom sa SacI i HindIII i izolacijom iz gela; **3.** standardi (Fermentas, 1 kb DNA Ladder, 0.1 mg DNA/mL)

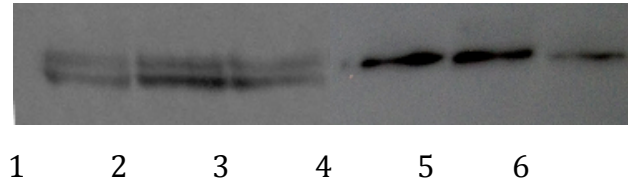
1 2 3 4 5



Slika 9. Elektroforetska analiza plazmida dobivenih ligacijom. Uzorak: 1. PCR fragment pripremljen za ligaciju restrikcijom sa SacI i HindIII; 2. plazmid koji je uspješno ugradio fragment analiziran restrikcijom sa SacI i HindIII; 3. plazmid koji je uspješno ugradio fragment analiziran restrikcijom sa SacI i HindIII; 4. standardi (Fermentas, 1 kb DNA Ladder, 0.1 mg DNA/mL); 5. plazmid pripremljen za ligaciju restrikcijom sa SacI i HindIII.

4.3. Procesiranje i raspodjela nativnog i mutiranog Scw4p-HA u staničnoj stijenci divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta

Nakon što je primjenom PCR metode dobiven mutirani gen *SCW4* sekvenciranjem plazmida (Servis za sekvenciranje DNA, Institut Ruđer Bošković) je potvrđeno da je mutacija sekvence KDKR u KDAA uspješno provedena. Nakon toga su stanice divljeg tipa kvasca transformirane pripremljenim plazmidom i uzgojne u mediju na galaktozi kako bi došlo do ekspresije mutiranog *SCW4*. Iz staničnih stijenki stanica divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta transformiranih plazmidom koji je nosio nativni *SCW4* i stanica divljeg tipa transformiranih plazmidom koji je nosio mutirani oblik *SCW4* izolirani su proteini SDS odnosno NaOH ekstrakcijom. Rezultati su pokazali da unatoč uvedenoj mutaciji i dalje dolazi do procesiranja Scw4p, što se uočava kao prisustvo dviju vrpce u SDS ekstraktu proteina stijenke (slika 10). Na osnovu ovog rezultat može se pretpostaviti da u procesiranju Scw4p mora sudjelovati neka druga proteaza, dok Kex2p najvjerojatnije ne sudjeluje direktno u procesiranju.



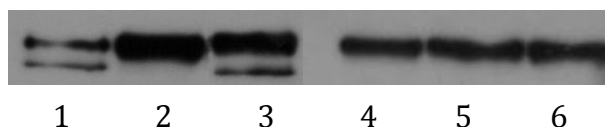
Slika 10. Raspodjela Scw4p-HA na procesiranu i neprocesiranu formu. Scw4p-HA je nakon izolacije iz stanične stijenke analiziran Western blot metodom pomoću antitijela specifičnih na HA oznaku. Linija: 1. nativni Scw4p u SDS ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 2. mutirani Scw4p u SDS ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 3. nativni Scw4p u SDS ekstraktu stijenki *kex2* mutanata; 4. nativni Scw4p u NaOH ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 5. mutirani Scw4p u NaOH ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 6. nativni Scw4p u NaOH ekstraktu stijenki *kex2* mutanata.

4.4. Procesiranje i raspodjela nativnog i mutiranog Scw4p-HA u staničnoj stijenci divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta tijekom uzgoja pri pH 4 i pH 7

Kako je prethodnim eksperimentom ustanovljeno da se Scw4p procesira unatoč nedostatku Kex2p u stanici, te unatoč mutaciji unutar sekvence karakteristične za cijepanje Kex2p proteinom, u sljedećem se eksperimentu pokušalo ustanoviti koji bi proteolitički enzim mogao biti odgovoran za procesiranje Scw4p. U literaturi su pronađeni podaci da praktički jednaku aminokiselinsku sekvencu za procesiranje koriste i proteaze iz porodice japsina te da im je dovoljno i prisustvo samo jednog bazičnog ostatka za procesiranje (Komano i sur., 1999). Budući da je u mutiranoj formi ostao jedan bazični ostatak (KDAA) unutar sekvence za procesiranje postoji mogućnost da su japsinske proteaze te koje provode procesiranje. U literaturi je također objavljena i pretpostavka da se japsinske proteaze aktiviraju procesiranjem pomoću Kex2p (Komano i Fuller, 1995) dok u kiselom mediju (pH <4) podliježu i autokatalitičkoj aktivaciji (Wolff i sur., 1996; Lin i sur., 2000).

Stoga se u sljedećem eksperimentu proveo uzgoj stanica divljeg tipa transformiranih plazmidom koji je nosio nativni odnosno mutirani *SCW4*, te *kex2* mutanta transformiranih plazmidom koji je nosio nativni *SCW4* u različitim pH uvjetima tj. pri pH 4 i pH 7. Nakon izolacije i provedene analize proteina izoliranih iz stijenki ustanovljeno je da pri uzgoju stanica u kiselim uvjetima (pH 4) dolazi do procesiranja i nativnog i mutiranog Scw4p

jednako kao i tijekom uzgoja u nepuferiranom mediju, što je bilo i za očekivati obzirom da stanice kvasca tijekom rasta u nepuferiranom mediju spuštaju pH medija na pH 3 - 4. Međutim, nakon uzgoja stanica pri pH 7 ustanovljeno je da u SDS ekstraktu proteina stijenki *kex2* mutanta prevladava neprocesirani oblik proteina, dok se mutirani oblik Scw4p pri ovom pH uopće nije procesirao (slika 11).



Slika 11. Raspodjela Scw4p-HA na procesiranu i neprocesiranu formu tijekom uzgoja pri pH 7. Scw4p-HA je nakon izolacije iz stanične stijenke analiziran Western blot metodom pomoću antitijela specifičnih na HA oznaku. Linija: 1. nativni Scw4p u SDS ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 2. mutirani Scw4p u SDS ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 3. nativni Scw4p u SDS ekstraktu stijenki *kex2* mutanata; 4. nativni Scw4p u NaOH ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 5. mutirani Scw4p u NaOH ekstraktu stijenki divljeg tipa kvasca; 6. nativni Scw4p u NaOH ekstraktu stijenki *kex2* mutanata.

5. RASPRAVA

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* u kojega se tradicionalno proučavaju biokemijski procesi eukariotske stanice. Njegovu vanjsku ovojnici čine polisaharidi glukan i hitin te oko tridesetak različitih manoproteina za koje se smatra da sudjeluju u izgradnji i promjenama stijenke tijekom rasta. Stanična stijenka je vrlo dinamič

. Neki proteini stijenke sudjeluju u aglutinaciji haploidnih stanica prilikom parenja te u flokulaciji, a mnogima je funkcija još uvijek nepoznata. Proteini su u stijenku vezani na najmanje tri različita načina, a dijele se na nekovalentno i kovalentno vezane protei

no enzimi s glikozidaznom ili transglikoz , a ovaj nač

inu vezanja u stijenku. Prvu skupinu čini dvanaest proteina vezanih za β -1,6-glukan preko ostatka glikozilfosfatidil-inozitol (GP

jedino pripravcima glukanaza. Drugu skupinu kovalentno vezanih proteina čini porodica PIR (Proteins with Internal Repeats) proteina. U stijenku su vezani esterskom vezom između -

- - u 30 mM NaOH. Disrupcijom sva četiri PIR gena, u NaOH ekstraktu zaostaje proteinska vrpca veličine 67 kD što odgovara molekulskoj masi Scw4p i Scw10p, koji su ranije detektirani među nekovalentno vezanim proteinima. Disrupcijom *SCW4* gena u četverostrukom PIR mutantu pokazano je da je protein koji zaostaje u NaO , 2007), što znači da je vezan u stijenku na dva nač bi značilo da mora postojati četvrti nač , 2010). Scw4p i Scw10 e sekvencu karakterističnu za procesiranje proteazom Kex2p (Mrša i sur., 1997) i nekovalentnim interakcijama su u stijenku vezani , 2010; Yin , 2005).

Ovaj rad predstavlja nastavak istraž ina ugradnje Scw4p u stijenku, pri čemu se pretpostavlja da je različit način ugradnje najvjerojatnije posljedica procesiranja ovoga proteina. Obzirom na prisustvo sekvence karakteristične za procesiranje Kex2p proteazom prvo je ispitano procesiranje i raspodjela Scw4p u staničnim stijenkama divljeg tipa kvasca i

kex2 mutanta. Divlji tip kvasca je transformiran plazmidom BG1805 koji sadrži gen *SCW4* proteina Scw4p u uvjetima uzgoja na galaktozi. Ovaj konstrukt iza *SCW4*

nim

antitijelima za taj nastavak Western blot metodom. Nakon izolacije kovalentno i nekovalentno vezanih proteina stijenke, potvrđeno je da je Scw4p vezan u stijenku na dva načina tj. i kovalentnim i nekovalentnim interakcijama. U SDS ekstraktima, koji sadrže nekovalentno vezane protein, nalaze se dvije vrpce Scw4p. Donja vrpca predstavlja kraću formu proteina koja nastaje procesiranjem Scw4p proteina s Kex2p ili nekom drugom proteazom, dok je prisustvo veće, neprocesirane forme proteina vjerojatno posljedica prevelike produkcije proteina sa plazmida koji se u stanici nalazi u velikom broju kopija (Slika 6.). U NaOH ekstraktima (Slika 6.) koji sadrže kovalentno vezane proteine prisutni su tek tragovi donje vrpce, dok je izrazito vidljiva samo gornja vrpca, tj. neprocesirana forma. Ovakava rezultat se ne slaže sa prethodno dobivenim rezultatima (Stuparević, 2010) jer se kod *kex2* mutanta očekivalo da nema procesirane forme Scw4p niti u jednom ekstraktu. Na osnovu ovakvog rezultata postavlja se pitanje da li Kex2p proteaza uopće sudjeluje u procesiranju Scw4p. Kako bi potvrdili i razjasnili rezultate dobivene u prvom eksperimentu sljedeći korak u ovom radu bio je uvođenje mutacije u *SCW4* gen u regiju koja je specifična za cijepanje Kex2p proteazom. Upotrebom PCR metode u *SCW4* gen je uvedena mutacija kojom je zamjenjen dio sekvence koja kodira za K₂₉R₃₀ sa sekvencom koja kodira za A₂₉A₃₀, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Nakon što je sekvencioniranjem gena potvrđeno da je mutacija uspješno provedena, stanice kvasca divljeg tipa su transformirane dobivenim plazmidom te uzgojene u mediju s galaktozom kako bi došlo do ekspresije mutiranog *SCW4*. Proteini izolirani iz stijenki divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta transformiranog s nativnim *SCW4*, te divljeg tipa kvasca transformiranog s mutiranim *SCW4* analizirani su Western blot analizom. Dobiveni rezultati pokazuju kako i unatoč mutaciji uvedenoj u mjesto za procesiranje s Kex2p dolazi do procesiranja Scw4p, što se vidi u obliku dvije vrpce u SDS ekstraktu proteina (Slika 10). Prisutnost proteinske vrpce koja odgovara procesiranoj formi Scw4p i u *kex2* mutantu kao i u slučaju kad je mjesto za procesiranje ovom proteazom izmjenjeno znači da je za procesiranje odgovorna neka druga proteaza, odnosno da Kex2p proteaza najvjerojatnije ne sudjeluje direktno u procesiranju Scw4p proteina. Stoga se u sljedećem koraku pokušalo ustanoviti koji bi proteolitički enzim mogao biti odgovoran za procesiranje Scw4p. Pretraživanjem literature ustanovljeno je da praktički istu aminokiselinsku sekvencu koriste i proteaze iz porodice japsina, ali da imaju sposobnost cijepanja polipeptidnog lanca i iza samo

jednog bazičnog ostatka (Komano i sur., 1999). Obzirom da je u mutiranoj formi *SCW4* dobivenoj zamjenom sekvence koja kodira za $K_{27}D_{28}K_{29}R_{30}$ sa sekvencom koja kodira za $K_{27}D_{28}A_{29}A_{30}$ u ovoj regiji ostao jedan bazični lizinski ostatak (KDAA) postoji mogućnost da su japsinske proteaze odgovorne za procesiranje Scw4p iza tog preostalog ostatka. Nadalje u literaturi je objavljena i pretpostavka da se japsinske proteaze aktiviraju procesiranjem pomoću Kex2p (Komano i Fuller, 1995) dok su u kiselom mediju ($pH < 4$) podložne autokatalitičkoj aktivaciji (Wolff i sur., 1996; Lin i sur., 2000). Stoga bi Kex2p mogla biti indirektno uključena u procesiranje Scw4p, a na procesiranje bi mogao utjecati i pH medija u kojem se kvaca uzgaja. Stoga je u sljedećem eksperimentu proveden uzgoj stanica divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta transformiranih s nativnim *SCW4* te stanica divljeg tipa kvasca transformiranih s mutiranim *SCW4* u različitim uvjetima pH, tj. pri pH4 i pH7. Nakon izolacije stijenki i provedene analize proteina, ustanovljeno je da prilikom uzgoja stanica kvasca u kiselom mediju (pH4) dolazi do procesiranja nativnog i mutiranog Scw4p što se očituje kroz pojavu dviju vrpce u SDS ekstraktu (nije prikazano.). Ovi rezultati se podudaraju s onima dobivenim prilikom uzgoja stanica kvasca u nepuferiranom mediju (Slika 6.) što se i moglo očekivati obzirom da stanice tijekom rasta spuštaju pH medija na pH 3-4. Rezultati dobiveni prilikom uzgoja stanica kvasca pri pH7 pokazuju kako u SDS ekstraktu proteina stijenki *kex2* mutanta prevladava neprocesirani oblik proteina (Slika 11.) što bi moglo biti posljedica nedostatka Kex2p koja bi aktivirala japsinske proteaze i izazvala procesiranje, dok autokatalitička aktivacija japsina pri ovom pH nije moguća. Mutirani oblik Scw4p pri ovom pH se uopće nije procesirao što se vidi iz pojave praktički samo jedne vrpce u SDS ekstraktu proteina stijenke (Slika 11.). U SDS ekstraktu proteina stijenki divljeg tipa kvasca s nativnim *SCW4* prisutna je procesirana forma, budući da je Kex2p proteaza prisutna te može aktivirati japsine.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti kako su u procesiranje Scw4p najvjerojatnije uključene japsinske proteaze koje za procesiranje koriste praktički jednak aminokiselinski slijed kao i Kex2 proteaza. Pri tome izgleda da je za procesiranje dovoljan i samo jedan bazični aminokiselinski ostatak, ali da je efikasnost cijepanja tada smanjena obzirom da kod pH 7 praktički nema procesiranja mutiranog oblika Scw4p koji ima samo jedan bazični ostatak. Ovi rezultati se slažu sa literaturnim podacima da se aktivacija japsinskih proteaza u neutralnom mediju odvija djelovanjem Kex2p, dok u kiselom mediju dolazi do njihove autokatalitičke aktivacije.

U daljnjim istraživanjima je potrebno ove rezultate potvrditi konstruiranjem *SCW4* sa

potpuno izmjenjenom sekvencom za procesiranje (KDKR u AAAA) te ekspresijom mutiranih oblika Scw4p u *kex2* mutantu i mutantima kvasca kojima su deletirani geni koji kodiraju za japsinske proteaze.

6. ZAKLJUČCI

Scw4p se u staničnoj stijenci nalazi u procesiranoj i neprocesiranoj formi pri čemu se procesirana forma u stijenu ugrađuje nekovalentnim, a neprocesirana kovalentnim vezama.

Ulogu u procesiranju Scw4p imaju japsinske proteaze i Kex2p.

Na osnovu dobivenih rezultata može se pretpostaviti da Kex2p sudjeluje u aktivaciji japsinskih proteaza koje zatim procesiraju Scw4p.

Za procesiranje Scw4p je dovoljna i prisutnost samo jednog bazičnog aminokiselinskog ostatka u regiji za procesiranje, ali je efikasnost procesiranja tada smanjena.

7. ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Renati Teparić što mi je omogućila rad u Laboratoriju za biokemiju i sticanje radnih navika u laboratoriju. Zahvaljujem joj se također na ukazanom povjerenju, nesebičnim savjetima i podršci tijekom izvođenja ovog rada.

Također se zahvaljujem asistenticama dipl.ing Sanji Musladin i dipl.ing. Antoniji Grbavac na bezbrojnim savjetima kojima su mi pomogle tijekom eksperimentalnog dijela rada.

8. LITERATURA

Abramova, N., Sertil, O., Mehta, S., Lowry, C.V. (2001) Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **183**, 2881–2887.

Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J.R., Schaller, M., de Groot, P., Maccallum, D., Odds, F.C., Schäfer, W., Klis, F., Monod, M., Hube, B. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* **281**, 688-694.

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.* **270**, 20847-20854.

Barbarić, S., Kozulić, B., Ries, B. i Mildner, P. (1984) Physicochemical and kinetic properties of acid phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **259**, 878-883.

Batra, K.K., Nordin, J.H. and Kirkwood, S. (1969) Biosynthesis of the L-D-glucan of *Sclerotium rolfsii* SACC. Direction of chain propagation and the insertion of the branch residues. *Carbohydr. Res.* **9**, 221-229.

Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Magloogi, H., Zucker, S., Thomas, G., Klein-Szanto, A.J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10326-10331.

Bennett, B.D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D.B., Kahn, S., Louis, J.C., Citron, M., Vassar, R. (2000) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta-secretase. *J. Biol. Chem.* **275**, 37712–37717.

Blobel, G., Dobberstein, B. (1975) Transfer to proteins across membranes.II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components,*J. Cell Biol.* **67**, 852-862.

Bourbonnais, Y., Ash, J., Daigle, M., Thomas, D.Y. (1993) Isolation and characterization of yeast *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in somatostatin expression: cloning and a functional role of a gene encoding an aspartyl protease in precursor processing at monobasic cleavage sites. *EMBO J.* **12**, 285-294.

Bourbonnais, Y., Germain, D., Ash, J., Thomas, D.Y. (1994) Cleavage of prosomstatins by the yeast Yap3 and Kex2 endopeptidase. *Biochemie* **96**, 226-233.

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**, 23-36.

Briggs, M.S i Gierasch, L.M. (1985) Molecular mechanisms of protein secretion: The role of the signal sequence, *Adv. Protein Chem.* **38**, 109.

Cabib, E., Drgonova, J. and Drgon, T. (1998) Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 307-333.

Cappellaro, C., Mrsa, 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., Wong, M., Pu, L.P., Tam, W., Loh, Y.P. (1995) Secretion of yeast aspartic protease 3 is regulated by its carboxy-terminal tail: characterization of secreted YAP3p. *Biochemistry* **34**, 7430-7437.

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.

Cawley, N.X., Chino, M., Maldonado, A., Rodriguez, Y.M., Loh, Y.P., Ellman, J.A. (2003) Synthesis and characterization of the first potent inhibitor of yapsin 1. Implications for the study of yapsin-like enzymes. *J. Biol. Chem.* **278**, 5523–5530.

Cool, D.R., Louie, D.Y., Loh, Y.P. (1996) Yeast aspartic protease 3 is sorted to secretory granules and activated to process proopiomelanocortin in PC12 cells. *Endocrinology* **137**, 5441-5446.

Dallies, N., Francois, J. and Paquet, V. (1998) A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1297-1306.

Dünkler, A., Jorde, S., Wendland, J. (2008) An *Ashbya gossypii* *cts2* mutant deficient in a sporulation-specific chitinase can be complemented by *Candida albicans* *CHT4*. *Microbiol. Res.* **163**, 701–710.

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.

Egel-Mitani, M., Flygenring, H.P., Hansen, M.T. (1990) A novel aspartyl protease allowing KEX2-independent MF alpha propheromone processing in yeast. *Yeast* **6**, 127–137.

Elorza, M.V., Rico, H., Sentandreu R. (1983) Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol.* **129**, 1577-1582.

Enderlin, C.S., Ogrydziak, D.M. (1994) Cloning, nucleotide sequence and functions of XPR6, which codes for a dibasic processing endopeptidase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **10**, 67-70.

Frieman, M.B., Cormack, B.P. (2003) The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol. Microbiol.* **50**, 883-896.

Fuller, R.S., Brake, A., Thorner, J. (1989a) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca^{2+} -dependent serine protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1434-1438.

Fuller, R.S., Brake, A., Thorner, J. (1989b) Intracellular targetting and structural conservation of a pro-hormone processing endoprotease. *Science* **246**, 482-486.

Gagnon-Arsenault, I., Tremblay, J., Bourbonnais, Y. (2006) Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. *FEMS Yeast Res.* **6**, 966-978.

Gagnon-Arsenault, I., Parisé, L., Tremblay, J., Bourbonnais, Y. (2008) Activation mechanism, functional role and shedding of glycosylphosphatidylinositol-anchored Yps1p at the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface. *Mol. Microbiol.* **69**, 982-93.

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.

Gething, M.J. i Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell wall, *Nature* **355**,33-45.

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.

Goldstein, A. i Lampen, J.O. (1975) u *Methods in Enzymology* (Wood, W.A., ured.) vol. **42**, Academic Press, San Diego, 504.

Griffiths, G., Simons, K. (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-443.

Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N., Kitada, K. (1999) Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J. Bacteriol.* **181**, 3886-3889.

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.

Heinisch, J J., Lorberg, A., Schmitz, H.P., Jacoby, J.J. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces* requires the use of a yeast strain lacking genes encoding the Yap3 and Mkc7 endoproteases found in the secretory pathway. *Biochem. J.* **330**, 1333–1340.

Holan, Z., Pokorny, V., Beran, K., Gemperle, A., Tuzar, Z. and Baldrian, J. (1981) The glucan-chitin complex in *Saccharomyces cerevisiae*.V. Precise location of chitin and glucan in bud scar and their physico-chemical characterization. *Arch. Microbiol.* **130**, 312-318.

Huges, S.,Moody, A. (2007) *PCR*, Scion Publishing Limited, Oxfordshire.

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.

Kay, M., Dunn, B. M., (1992) Substrate specificity and inhibitors of aspartic proteinases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **52** (Suppl. 210), 23-30.

Klis,F.M. et al.(2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **26**,239-256.

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.

Komano, H., Rockwell, N., Wang, G.T., Krafft, G. A., Fuller, R.S. (1999) Purification and characterization of the yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored, monobasic-specific aspartyl protease yapsin 2 (Mkc7p). *J. Biol. Chem.* **274**, 24431–24437.

Kreil, G., Mollay, C., Kashnitz, R., Vilas, U. i Haiml, L. (1980) Prepromelittin: specific cleavage of the pre-and the propeptide in vitro, *Ann. N.Y.Acad.Sci.* **343**, 338-346.

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.

Kuranda,M.J.,Robbins,P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **266**,19758–19767.

Larriba,G.,Andaluz,E.,Cueva,R.,Basco,R.D.(1995) Molecular biology of yeast exo- lucanases. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 121–126.

Lesage, G., Prat, A., Lacombe, J., Thomas, D., Seidah, N., Boileau, G. (2000) The Kex2p proregion is essential for the biosynthesis of an active enzyme and requires a C-terminal basic residue for its function. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 1947-1957.

Lesage,G.,Bussey,H. (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* **70**, 318-322.

Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., Tang, J. (2000) Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the betasecretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1456–1460.

Lipke, P.N., wojciechowicz, D., Kurjan, J. (1989) AG alpha 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol. Cell. Biol.* **9**,3155-3165.

Meyer, D.I., Krause, E. i Dobberstein, B. (1982) Secretory protein translocation across membranes-the role of the «docking protein», *Nature* **29**, 647-650.

Mouassite, M., Camougrand, N., Schwob, E., Demaison, G., Laclau, M. and Guerin, M. (2000) The 'SUN' family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation. *Yeast* **16**, 905-919.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P. and Latge, J.P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**, 14882-14889.

Mrša, V., Seidl, T., Gentsch, 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.

Newpot, G., Kuo, A., Flattery, A., Gill, C., Blake, J.J., Kurtz, M., Abruzzo, G., Agabian, N. (2002) Inactivation of Kex2p diminishes virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **278**, 1713-1720.

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.

Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M., Nicaud, J.M. (2000) Characterization of extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **182**, 2802-2810.

Pfeffer, S.R. i Rothman, J.E. (1987) Biosynthetic Protein Transport and Sorting by the ER and Golgi, *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 829-852.

Popolo, L. and Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 385-400.

Ram,A.F., Brekelmans,S.S., Oehlen,L.J., Klis,F.M. (1995) Identification of two cell cycle regulated genes affecting the β -1,3- glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* **358**,165–170.

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

Richter, C., Tanaka, T., Yada, R.Y. (1998) Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem J.* **335**, 481-490.

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.

Rodriguez-Pena, J.M., Cid, V.J., Arroyo, J.& Nombela, C. (2000) A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3245-3255.

Roy, A., Lu, C.F., Marykwas., D.L., Lipke, P.N., Kurjan, J. (1991) The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4196-4206.

Sambrock, J., Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.

Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Duran, A. and Cabib, E.(1991) The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* **114**,111-123.

Smits,G.J.,Schenkman,L.R., Brul,S., Pringle,J.R., Klis,F.M.(2006) Role of cell cycle-regulated expression in the localized incorporation of cell wall proteins in yeast, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 3267–3280.

Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., Fuster, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3273- 3297.

Steiner, D. F. (1969) Proinsulin and the biosynthesis of insulin. *New Engl. J. Med.* **280**, 1106- 1113.

, I. (2010) Identifikacija i uloga proteina stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izoliranih alkalnom ekstrakcijom. *Doktorska disertacija*, 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 *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **150**, 3197-3208.

Tammi, M., Ballou, L., Taylor, A. & Ballou, C. E. (1987) Effect of glycosylation on yeast invertase oligomer stability. *J. Biol.Chem.* **262**, 4395-4401.

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.

Teparić, R. (2005) Proteini stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: mehanizam ugradnje u stijenku i moguće fiziološke funkcije. *Doktorska disertacija*, Sveučilište u Zagrebu.

Teparić, R. i sur., (2010) Proteins in the *S.cerevisiae* Cell Wall. *Food Technol.Biotechnol.* **48**, 317-328.

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 crevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 64-74.

Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 753-766.

Togni, G., Sanglard, D., Quadroni, M., Foundling, S. I., Monod, M. (1996) Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: functional analysis of preproregion clavages in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **142**, 493–503.

Van den Hazel, H.B., Kielland-Brandt, M.C., Winther, J.R. (1993) The propeptide is required for in vivo formation of stable active yeast proteinase A and can function even when not covalently linked to the mature region. *J. Biol. Chem.* **268**, 18002-18007.

Von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites, *Nucleic Acids Res.* **14**, 4683-4690.

Vongsamphanh R., Fortier P.K. and Ramotar D. (2001) Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1647-1655.

Walter, P. I Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein, *J. Cell Biol.* **91**, 551-556.

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.

Wilcox, C.A., Redding, K., Wright, R., Fuller, R.S., (1992) Mutation of a tyrosine localization signal in a cytosolic tail of yeast Kex2 protease disrupts Golgi retention and results in default transport to the vacuole. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1353-1371.

Wolff, A. M., Din, N., Petersen, J. G. (1996) Vacuolar and extracellular maturation of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast* **12**, 823–832.

Wösten, H.A., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Bölker, 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.

Yun, D. J., Zhao, Y., Pardo, J.M., Narasimhan, M.L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1997) Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**,7082–7087.

Yin, Q.Y., de Groot, P.W., Dekker, H.L., de Jong, L., Klis, F.M., de Koster, C.G. (2005) Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of protein covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J. Biol. Chem.* **274**, 20745-20748

Zhou, A., Webb, G., Zhou, X., Steiner, D.F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 20745-20748.

(Specialty Yeast Product from Specialty BioTech.)
<<http://www.sbtthai.com>>.Pristupljeno 02.travnja.2012.)

9.SAŽETAK

Iva Čanak

Ispitivanje uloge Kex2p proteaze u procesiranju proteina Scw4p kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je složena struktura, koja stanici daje oblik i čvrstoću te selektivno propušta različite molekule u i iz stanice. To je ekstracelularna organela građena od polisaharida glukana i hitina te više od tridesetak različitih manoproteina. Većina proteina se može ukloniti iz stijenke bez letalnih posljedica za stanicu ili utjecaja na oblik stanice i njenu osmotsku stabilnost. Scw4p je karakteriziran kao nekovalentno vezan protein stijenke kojega je moguće ekstrahirati u prisutnosti SDS-a u određenim uvjetima (Mrša i sur., 1997), no jedna frakcija proteina je kovalentno vezana u stijenci kvasca i izolacija je moguća u 30mM NaOH (Mrša i sur., 2007). Nekovalentno vezana forma ima manju molekulsku masu od kovalentno vezane, pa se pretpostavlja da je razlika u načinu ugradnje u stijenku posljedica procesiranja (Mrša i sur., 2010). Fragment koji se odcjepljuje sadrži 11 aminokiselina na N-terminalnom kraju proteina, a odcjepljuje se iz karakteristične Lys₂₉-Arg₃₀ (K₂₉R₃₀) sekvence. Upravo je ta sekvenca supstrat proteaze Kex2p, ali i japsinskim proteazama.

U ovom radu je uspoređen način vezanja Scw4p-HA u staničnu stijenku divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanta. Zatim je ispitan utjecaj uvođenja mutacije zamjenom sekvence koja kodira za K₂₇D₂₈K₂₉R₃₀ sa sekvencom koja kodira za K₂₇D₂₈A₂₉A₃₀ u regiji za procesiranje Scw4p na raspodjelu Scw4p-HA u staničnoj stijenci divljeg tipa i *kex2* mutanta, te na koji način uzgoj pri različitom pH utječe na procesiranje Scw4p kod divljeg tipa kvasca i *kex2* mutanata.

Ključne riječi: stanična stijenka kvasca, proteini, Kex2p, mutant

10. SUMMARY

Iva Čanak

The role of Kex2 protease in processing Scw4p protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

The cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a complex structure, which gives the cell shape, strength and selectivity. This is the organelle made up of chitin and glucan polysaccharides and more than thirty different manoproteins. Most proteins can be removed from the cell wall without lethal consequences for the cell or impact on the cell shape or osmotic stability. Scw4p is classified as a noncovalently linked protein which is possible to extract with hot SDS under reducing conditions (Mrsa *et al.*, 1997), but one fraction of Scw4p is shown to be covalently bound to the yeast cell wall (Teparic *et al.*, 2007). Noncovalently bound form has smaller molecular weight than covalently bound one, s

, 2010). Processing occurs after first 11 aminoacids at N-terminal end of protein, after characteristic sequence Lys₂₉-Arg₃₀ (K₂₉R₃₀). This sequence is substrate for both Kex2p and yapsin proteases.

In this work the binding mode of Scw4p-HA in the cell wall of wild-type and *kex2* mutant yeast was compared. After that mutation was introduced in *SCW4* by replacing sequence that encodes K₂₇D₂₈K₂₉R₃₀ with sequence that encodes K₂₇D₂₈K₂₉A₃₀ in the region for processing. Finally, the impact of that mutation on the distribution of Scw4p-HA in the cell wall was examined, as well as the impact of different pH of growing media on processing Scw4p in wild-type yeast and *kex2* mutant.

Key words: yeast cell wall, proteins, Kexp, mutant

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25.12.1989. u Zadru gdje sam završila osnovnu školu i MIOC. Također sam učila njemački i talijanski jezik kao izvanškolske aktivnosti. 2008. godine sam se upisala na preddiplomski studij Biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Završni rad naslova "Utjecaj inhibitora sinteze stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na njenu poroznost" sam izradila u Laboratoriju za biokemiju, pod mentorstvom doc.dr.sc. Renate Teparić 2011. godine. Kao redovita studentica po završetku preddiplomskog studija 2011. godine sam upisala diplomski studij Bioprocenog inženjerstva na Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, gdje sam nastavne obveze uspješno uskladila s vremenom provedenim u Laboratoriju za potrebe izrade ovog rada.