

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Lucija Lulić

**Uvođenje mutacija u gen *SCW4* s ciljem ispitivanja načina vezanja
proteina Scw4p u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Renate Teparić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015/2016.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2. GRAĐA STANIČNE STIJENKE.....	1
1.2.1. Polisaharidi stanične stijenke.....	2
1.2.2. Proteini stanične stijenke.....	4
1.2.2.1. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke.....	5
1.2.2.2. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke.....	7
1.3. PROTEAZE KOJE SUDJELUJU U PROCESIRANJU Scw4p PROTEINA STANIČNE STIJENKE.....	8
1.3.1. Uloga Scw4p proteina u stanicama kvasca.....	8
1.3.2. Uloga Kex2p proteaze u stanicama kvasca.....	9
1.3.3. Uloga japsinskih proteaza u stanicama kvasca.....	10
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Kemikalije.....	13
3.1.2. Oligonukleotidi.....	14
3.1.3. Plazmidi.....	15
3.1.4. Soj bakterije.....	18
3.1.5. Hranjiva podloga za uzgoj bakterije.....	18
3.1.6. Sojevi kvasaca.....	18
3.1.7. Hranjiva podloga za uzgoj kvasaca.....	19
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Lančana reakcija polimeraze.....	20
3.2.2. Uvođenje mutacije u gen <i>SCW4</i> metodom „megapočetnice“.....	22
3.2.3. Pročišćavanje fragmenata DNA umnoženih PCR-om.....	26
3.2.4. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu.....	26
3.2.5. Izolacija DNA iz agaroznog gela.....	26
3.2.6. TA-ligacija fragmenata DNA umnoženih PCR-om u plazmid pGEM-T Easy.....	26

3.2.7. Transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>Escherichia coli</i>	27
3.2.8. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije <i>Escherichia coli</i> („mini-prep“).....	27
3.2.9. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima.....	27
3.2.10. Ligacija fragmenata DNA i plazmida YEp351.....	27
3.2.11. Transformacija kvasca LiAc metodom.....	28
3.2.12. Izolacija staničnih stijenki kvasca.....	28
3.2.13. Izolacija nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke.....	29
3.2.14. SDS-elektroforeza po Laemmli-u.....	29
3.2.15. Prijenos proteina na nitrocelulozu i njihovo specifično obilježavanje.....	30
4. REZULTATI.....	31
4.1. Uvođenje mutacije u gen <i>SCW4</i> metodom lančane reakcije polimerazom.....	32
4.2. Restrikcija pGEM-T Easy i YEp351 plazmida.....	34
4.3. Izolacija mutiranih <i>SCW4</i> fragmenata i odgovarajućeg fragmenta YEp351 plazmida iz agaroznog gela i njihova ligacija u plazmid prikladan za transformaciju kvasca	35
4.4. Provjera uspješnosti ekspresije mutiranog oblika <i>Scw4p</i> proteina u staničnoj stijenci.....	36
5. RASPRAVA.....	37
6. ZAKLJUČCI.....	41
7. ZAHVALE.....	42
8. POPIS LITERATURE.....	43
9. SAŽETAK.....	46
10. SUMMARY.....	47

1. UVOD

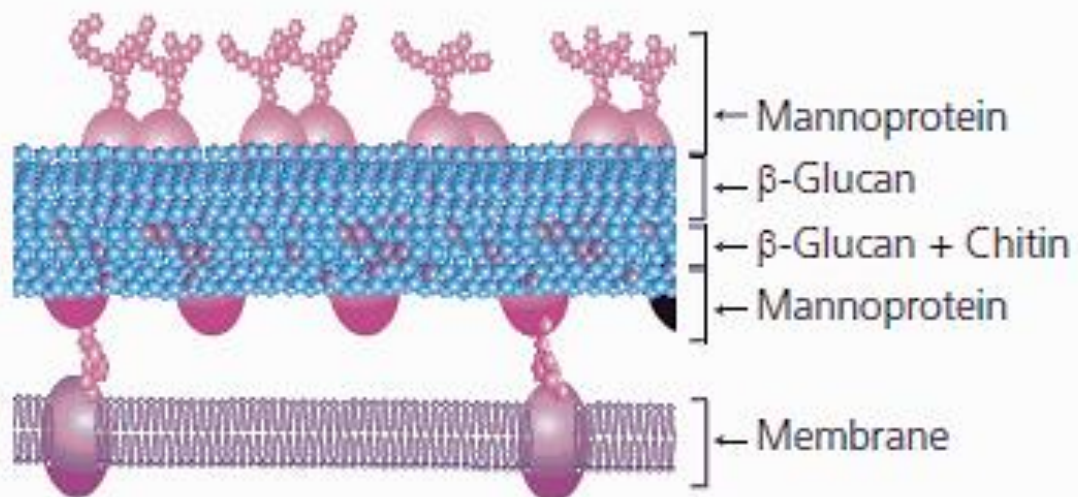
1.1. KVASAC *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je kvasac iz carstva *Fungi* kojem pripadaju i višestanični organizmi poput viših gljiva te plijesni. To je robustan kvasac koji ima visoku učinkovitost fermentacije, brzog rasta i korištenja šećera. Osim toga, tolerantan je i na visoke koncentracije etanola te niske razine kisika, a aktivan je i u kiselom okruženju.

Genom kvasca *S. cerevisiae* prvi je eukariotski sekvencionirani genom pa služi kao modelni organizam te za konstrukciju različitih mutanata koji se, osim u tradicionalne uporabe u pekarstvu, pivarstvu te vinarstvu, upotrebljavaju u razne biotehnološke, medicinske i druge svrhe kao što su proizvodnja heterolognih i nukleokapsidnih proteina.

1.2. GRAĐA STANIČNE STIJENKE

S. cerevisiae sadrži dvoslojnu staničnu stijenku koja čini gotovo 30% suhe tvari stanice i omogućuje kvascu preživljavanje u stresnim uvjetima, daje mu čvrstoću i određuje oblik. Unutarnji sloj građen je od polisaharida β -1,3-glukana (50%), manana (35%), β -1,6-glukana (5%) te hitina (1-2%), a osigurava osmotsku i mehaničku stabilnost (Mrša i sur.,1997). Vanjski sloj građen je od manoproteina koji određuju površinska svojstva stanične stijenke i ograničavaju propusnost stijenke za molekule iz okoline.



Slika 1. Komponente stanične stijenke kvasca *S.cerevisiae* (<http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 5.4.2016.)

1.2.1. Polisaharidi stanične stijenke

Polisaharidi stanične stijenke su polimeri β -1,3-glukan i β -1,6-glukan (građeni od glukoze), hitin (građen od N-acetilglukozamina), koji određuju oblik stanice, te manan (građen od manoze) koji čini ugljikohidratni dio manoproteina stijenke.

β -1,3-glukan

β -1,3-glukan je ravnolančani polimer glukoze koji nastaje povezivanjem oko 1500 glukoznih jedinica uz pomoć multienzimskog kompleksa β -1,3-glukan sintaze. β -1,3-glukan sintaza je protein smješten u staničnoj membrani (Qadota, 1996.). Građen je od dvije katalitičke (Fks1p i Fks2p) i jedne regulatorne podjedinice (Rho1p GTPaza). Senzorni protein Wsc1p s površine stanice aktivira β -1,3-glukan sintazu preko Rom2p proteina dok je Lrg1p, protein iz grupe Rho1p proteina, inhibira (Watanabe i sur., 2002.).

Nerazgranati lanci β -1,3-glukana formiraju strukturu uzvojnice čime osiguravaju čvrstoću i osmotsku stabilnost stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*. β -1,3-glukan se u staničnoj stijenci kovalentno povezuje s β -1,6-glukanom i hitinom pri čemu je 40-50% hitina reducirajućim krajem povezano β -1,4 glikozidnom vezom s nereducirajućim krajem β -1,3-glukana (Lesage i Bussey, 2006.).

β -1,6-glukan

β -1,6-glukan je razgranati polimer glukoze s mjestima grananja na prosječno svakoj petoj glukoznoj jedinici. Nastaje povezivanjem oko 130 monomernih glukoznih jedinica uz pomoć UDP-glukoza ovisnog enzima β -1,6-glukan sintaze (Orlean, 2012.). β -1,6-glukan stabilizira staničnu stijenkicu jer povezuje ostale komponente, ali njegov biosintetski put i struktura nisu još potpuno razjašnjeni. Poznato je da za biosintezu β -1,6-glukana kodira više od 20 gena iz *KRE* grupe uključujući i njihove homologe *SKNI* i *KNHI* te da na njegovu količinu u staničnoj stijenci utječu brojni proteini lokalizirani u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevom tijelu i staničnoj membrani (Aimanianda i sur., 2009.).

Hitin

Hitin je linearni polimer N-acetilglukozamina koji nastaje povezivanjem oko 190 monomernih jedinica. Ima strukturu sličnu α -celulozi te dolazi u obliku dva antiparalelna lanca povezana vodikovim vezama koji se nereducirajućim krajevima vežu za β -1,3-glukan i β -1,6-glukan. Amidne grupe su povezane vodikovim vezama što dodatno stabilizira kristalnu strukturu, a zajedno s hidrofobnim jezgrama formiranim od acetamidometilnih grupa sprječavaju ulazak vode i topljenje tih kristala (Lipke i Ovalle, 1998.). Sinteza hitina i ugradnja u staničnu stijenu odvija se odmah nakon citokineze što rezultira razinom hitina od 2% u bočnim zidovima stijenke te ožiljcima stanice majke (Shaw i sur., 1991.).

S. cerevisiae ima tri hitin sintaze - hitin sintaza I (Chs1), hitin sintaza II (Chs2) i hitin sintaza III (Chs3). Iako potječu iz hrapavog endoplazmatskog retikuluma, Chs proteini su aktivni u staničnoj membrani, a za transport i aktivaciju Chs2 i Chs3 proteina zaslužni su brojni pomoćni enzimi. Chs1, Chs2 i Chs3 proteini pripadaju GT2 grupi invertirajućih glikoziltransferaza koje kao donore monomernih jedinica koriste UDP-N-acetilglukozamin. Chs3 protein sintetizira hitin oko pupa, a nakon odvajanja stanica, ostaje na matičnoj stanici kao komponenta ožiljka. Chs2 i Chs3 proteini imaju važnu ulogu u primarnom formiranju pupa i citokinezi jer mutacije u oba gena na stanicu djeluju letalno (Shaw i sur. 1991.).

Manan

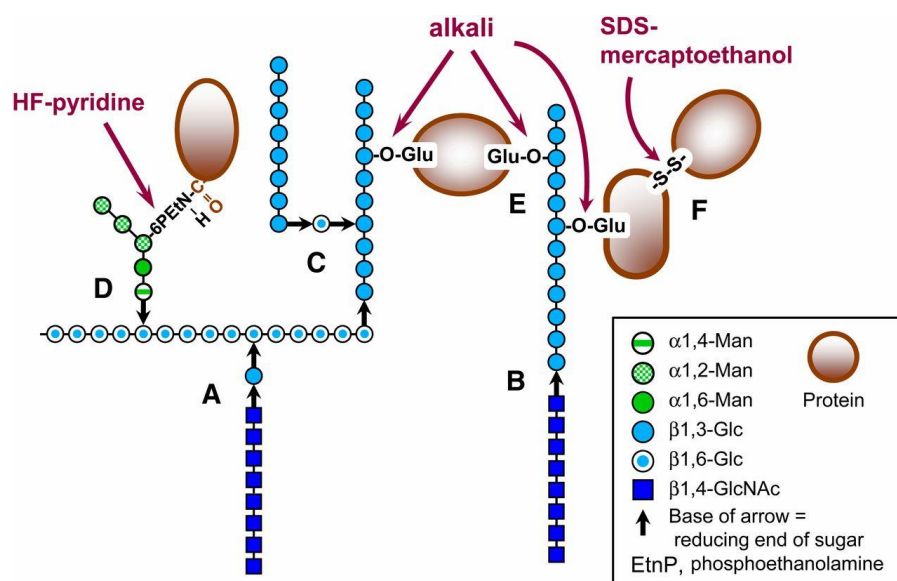
Manan je razgranati polisaharid manoze koji predstavlja ugljikohidratni dio manoproteina smještenih u vanjskom sloju stanične stijenke kvasca *S.cerevisiae*. Manani mogu činiti i do 95% molekulske mase manoproteina koji se međusobno razlikuju po tipu glikozilacije. Ona može biti N-glikozilacija asparaginskih ostataka ili O-glikozilacija serinskih ili treoninskih ostataka, a obje su neophodne za rast stanica kvasca jer poremećaji u procesima glikozilacije djeluju letalno na stanicu.

1.2.2. Proteini stanične stijenke

Proteini stanične stijenke su manoproteini koji zauzimaju 35% suhe tvari stijenke. Za sada je otkriveno više od 30 proteina čije uloge nisu još potpuno razjašnjene. Iako su istraživanja pokazala da njihovim pojedinačnim uklanjanjem iz stanične stijenke ne dolazi do velikih promjena osmotske stabilnosti niti do promjena oblika, smatra se da prisutnost manoproteina utječe na poroznost te transport molekula iz periplazmatskog prostora u stanicu (De Nobel i sur., 1990.)

Analizom manoproteina ustanovljene su razlike u vezanju na β -1,3- i β -1,6-glukan stanične stijenke pa se prema tome dijele u dvije skupine. Prvu skupinu čine proteini koji se kovalentno vežu na glukanski sloj te zaostaju u stijenci nakon izolacije nekovalentno vezanih proteina. Takvi se proteini još dijele na GPI i PIR grupe proteina. GPI proteini su kovalentno vezani proteini koji se preko glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) ostatka vežu za β -1,6-glukan, a izoliraju se tretmanom β -1,6-glukanazama ili β -1,3-glukanazama. PIR proteini (Proteins with Internal Repeats) su skupina sekvencijski srodnih proteina koji preko specifičnog ostatka glutamina unutar karakteristične ponavljajuće sekvence tvore estersku vezu s hidroksilnom grupom glukoze β -1,3-glukana (Ecker i sur., 2006.), a iz stijenke se izoliraju uz pomoć NaOH (Mrša i sur., 1997.).

Drugu skupinu proteina čine nekovalentno vezani proteini koji se iz stanične stijenke mogu izolirati tretmanom vrućim SDS-om uz dodatak β -merkaptetoetanol.



Slika 2. Način vezanja i izolacije manoproteina stanične stijenke kvasca *S.cerevisiae* (preuzeto iz P. Orlean, 2012.)

1.2.2.1. Kovalentno vezani proteini stanične stijenke

Kovalentno vezani proteini zauzimaju manji udio manoproteina stanične stijenke, a nakon izolacije nekovalentno vezanih proteina, zaostaju u staničnoj stijenci.

GPI proteini

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

Pet proteina GPI skupine su članovi GAS obitelji koji imaju glukan-remodelirajuću aktivnost. Gas1p protein predstavlja jedan od glavnih manoproteina vezanih na površini stanice koji sudjeluju u morfogenezi, odvajanju stanica te sintezi stanične stijenke (Conzelmann i sur., 1988.; Nuoffer i sur., 1991.). Osim proteina GAS obitelji, GPI proteini su i egzoglukanaza Exg2p i transglikozidaze Crh1p i Utr2p/Crh2p čija je funkcija stvaranje veze između β -1,3-glukana i hitina te aglutinini i proteini FLO i TIR obitelji. Aglutinini su GPI proteini koji su najviše istraženi, a sudjeluju u interakciji stanica u različitim uvjetima. FLO proteini su tzv. flokulini, lektinima slični proteini, koji služe za flokulaciju dok fiziološka uloga TIR proteina još uvijek nije poznata.

PIR proteini

PIR proteini su kovalentno vezani proteini koji se iz stanične stijenke izoliraju β -eliminacijom pomoću NaOH i intenzivno su O-manozilirani. Imaju visok stupanj homologije, bogati su aminokiselinama serinom i treoninom te sadrže N-terminalnu signalnu sekvencu duljine 11 aminokiselina koja PIR proteine upućuje u sekretorni put. U genima koji kodiraju za PIR proteine, prikazane u Tablici 1., nalazi se specifično restriksijsko mjesto za procesiranje endoproteazom Kex2p (Mrša i sur., 1997.) te karakteristične ponavljajuće regije prema kojima je ova porodica i nazvana, a koje su odgovorne za kovalentno vezanje PIR proteina u staničnu stijenku (Slika 3.)

MQFKNVALAA SVAALSATAS AEGYTPGEPW STLPTGSGS CGAAEYTTTF GLAVQAITSS
KAKRDVIS**QI GDGQVQ**ATSA ATAQATDSQA QATTATPTS SEKISSSASK TSTNATSSSC
ATPSLKDSSC KNSGTLELTL KDGVLTDAGK RIGSIVANRQ FQFDGPPPQA GAIYAAGWSI
TEDGYLALGD SDVIFYQCLSG NFYNLYDQNV AEQCSAIHLE AVSLVDC

Slika 3. Sekvenca Pir4p proteina. Plavo je označena karakteristična regija koja osigurava kovalentno povezivanje proteina u staničnoj stijenci kvasca

Iako još nije potvrđeno, istraživanja ekspresije i svojstava PIR proteina (Pir1p/Ccw6p, Hsp150/Pir2p/Ccw7p, Pir3p/Ccw8p i Cis3p/Pir4/Ccw5p) u različitim mutantima upućuju kako ti proteini služe za održavanje integriteta stanice i stanične stijenke jer inaktivacijom gena za sva 4 PIR proteina dolazi do izmjene morfoloških svojstava stanične stijenke, nepravilnog oblika, rasta u nakupinama te povećanja osjetljivosti prema inhibitorima sinteze stanične stijenke (Mrša i sur., 1997.).

Tablica 1. Kovalentno vezani proteini

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

1.2.2.2. Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke

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

Prvi izolirani i okarakterizirani protein ove skupine je Bgl2p protein koji, ovisno o koncentraciji supstrata, pokazuje i endoglukanaznu i transglikozidaznu aktivnost (Goldman i sur., 1995.). Osim toga, postoji značajna homologija Bgl2p proteina s nekovalentno vezanim proteinima Scw4p, Scw10p i Scw11p radi čega se pretpostavlja da i oni imaju glukan-remodelirajuću aktivnost iako to nije dokazano *in vitro* (Teparić i sur., 2010.).

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

Tablica 2. Neki od nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke

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

1.3. PROTEAZE KOJE SUDJELUJU U PROCESIRANJU Scw4p PROTEINA STANIČNE STIJENKE

1.3.1. Uloga Scw4p proteina u stanicama kvasca

Scw4p protein je u početku bio identificiran kao nekovalentno vezani protein te se ta teza održala sve dok se daljnjim analizama nije utvrdilo da se u staničnu stijenku veže na dva načina, kovalentno i nekovalentno. To je dokazano time što se Scw4p protein, osim otopinom SDS-a i merkaptoetanola, iz stanične stijenke može ekstrahirati kao i PIR proteini, s NaOH (Teparić i sur., 2007.). Međutim, Scw4p, za razliku od PIR proteina, ne sadrži specifičnu ponavljajuću sekvencu preko koje se PIR proteini ugrađuju u stijenku i nije poznato na koji način i preko kojih ostataka se Scw4p kovalentno veže u stijenku.

Ekstrakcijom Scw4p iz stanične stijenke divljeg tipa kvasca, dobivaju se tri proteinske vrpce različite veličine što upućuje na postojanje više mjesta za procesiranje (neobjavljeni rezultati). Iako je jedan od najzastupljenijih proteina stanične stijenke te pokazuje visoku razinu homologije s glukanzama i nekovalentno vezanim proteinom Bgl2p, još uvijek nije poznata njegova fiziološka uloga.

Scw10p je homolog Scw4p proteina. Imaju jednaku molekulsku masu (66 kDa), dijele 63% identičnih aminokiselina te sadrže sekvencu za translociranje u ER i mjesto za procesiranje Kex2p proteolitičkim enzimom. Kod mutanata kod kojih je deletiran ili *scw4* ili *scw10* nije došlo do značajnih promjena fenotipa u usporedbi s divljim tipom dok je kod dvostrukih *scw4scw10* mutanata uočen usporen rast, morfološke abnormalnosti te hiperosjetljivost na Calcoflour White (CFW), Congo Red (CR) i kofein u koncentracijama koje nisu imale značajan utjecaj na stanice kvasca divljeg tipa (Cappellaro i sur., 1998.). Osim toga, analize su pokazale i promjene prilikom parenja te da je udio glukana i hitina u stanicama dvostrukih mutanata bio znatno veći nego u stanicama divljeg tipa što upućuje na sličnost Scw4p i Scw10p proteina glukanzama i transglikozidazama (Šestak i sur., 2004.).

1.3.2. Uloga Kex2p proteaze u stanicama kvasca

Kex2p je specifična Ca^{2+} ovisna serinska endoproteaza molekulske mase 68 kDa. Integralni je membranski protein koji se s oko 3% Kex2p nalazi na površini stanice čime mu je osigurano dugo vrijeme poluživota od gotovo 80 min. Pripada obitelji prohormonskih i proproteinskih konvertaza sekretornog puta (Fuller i sur., 1989.). Biokemijski put Kex2p proteaza u stanicama *S.cerevisiae* dobro je istražen, međutim, osim nekih poznatih proteina kao što su prekursori killer toksina K1 i K2 i feromona α -faktora kod *MAT α* stanica koji je neophodan kod parenja, poznato je vrlo malo supstrata (Bader i sur., 2008.; Germain i sur., 1992.). Otkriveno je da sudjeluje u procesiranju i aktivaciji proproteina i proteina koji imaju ulogu u održavanju i remodeliranju stanične stijenke tako što ih cijepa iza sekvenci Arg-Arg/X ili Lys-Arg/X pa se pretpostavlja da sudjeluje i u procesiranju Scw4p proteina. Sintetizira se u zimogenom obliku te se, autoproteolitički, iz zimogene prevodi u aktivnu formu. (Germain i sur., 1992).

Istraživanja pokazuju da Kex2p sudjeluje i u fuzioniranju stanica prilikom parenja jer proteolizom aktivira, za sada nepoznat, protein ili stvara kompleks s feromonom reguliranim membranskim proteinom Prm1p (Heiman i sur., 2007.).

Stanice kvasaca kod kojih je deletiran *KEX2* gen razvijaju tzv. pleiotropni fenotip (višestruki fenotipski učinci izazvani mutacijom jednog gena) i ne mogu proteolizom aktivirati supstrate (Bader i sur., 2008.).

Kex2p se translacija iz 2848 nukleotida dugog gena u zimogenoj formi kao transmembranski protein tipa I (Germain i sur., 1992.). Takva forma Kex2p proteina sadrži N-terminalnu sekvencu koja ga usmjerava u endoplazmatski retikulum i visokonabijenu C-terminalnu citoplazmatsku regiju. Također sadrži i pro-domenu duljine 89 aminokiselina koja je neophodna za aktivnost enzima jer omogućuje smatanje proteolitičke domene u aktivnu formu, katalitičku domenu, konzerviranu P-domenu neophodnu za katalitičko djelovanje te O-glikoziliranu Ser-Thr bogatu transmembransku domenu i citosolni rep s „Trans Golgi Network“ (TGN) lokalizacijskim signalom (Wilcox i Fuller, 1991.; Germain i sur., 1992.). Aktivacija zimogene forme Kex2p proteina podrazumijeva proteolitičko cijepanje N-terminalne sekvence, O- i N-glikozilaciju te autoproteolitičko otcjepljenje pro-domene čime se Kex2p potpuno aktivira. Tako aktivirani protein se iz endoplazmatskog retikuluma potom translocira u Golgijevo tijelo gdje se progresivno glikozilira vezanjem molekula manoze α -1,3-glikozidnim vezama na postojeće O- i N-oligosaharidne lance (Wilcox i Fuller, 1991.).

1.3.3. Uloga japsinskih proteaza u stanicama kvasca

Japsinske proteaze su proteini iz skupine glikozilfosfatidilinozitol (GPI)-aspartatnih proteaza koji na C-terminalnom dijelu sekvence imaju signal za vezanje GPI-sidra koje im omogućuje lokalizaciju u staničnoj membrani ili stijenci. U početku je grupa poznatih japsinskih proteaza uključivala samo Yps1p i Yps2p proteine izolirane iz kvasca *S.cerevisiae* te propiomelanokortin konvertirajući (PCE) enzim izoliran iz sekretornih granula srednjeg i stražnjeg režnja hipofize goveda. PCE je kasnije preimenovan u japsin A kao prvi japsinski protein sisavaca sa specifičnim afinitetom za cijepanje bazičnih ostataka prohormona što ga čini strukturalno i funkcionalno sličnim s ostalim japsinima (Olsen i sur., 1998.). Danas je poznato 5 homolognih japsinskih proteaza u stanicama *S.cerevisiae*: Yps1p, Yps2p, Yps3p, Yps6p i Yps7p (Olsen i sur., 1999.).

Yps1p i Yps2p proteini identificirani su kao supresori nul-mutacija *KEX2* gena. Poput Kex2p proteina, Yps1p, Yps2p i Yps3p proteini cijepaju proteine i peptide iza bazičnih aminokiselinskih ogranaka. Razlika je u tome što japsini cijepaju proteine i na dibazičnim i na monobazičnim mjestima pa prepoznaju i pojedinačne Arg i Lys ogranke. Yps3p otkrili su Egel-Mitani i suradnici 1990. godine kada su tražili alternativu Kex2p proteinu koji nije bio efikasan u cijepanju proteina fuzioniranog za prekursor feromona α -faktora.

Japsini se, kao i ostali proteolitički enzimi, sintetiziraju kao projapsini tj. u inaktivnoj zimogenoj formi, koja se aktivira proteolizom karakteristične pro-regije na N-terminalnom dijelu sekvence. Pro-regija inhibira katalitičku domenu japsinskih proteaza čime je osigurana katalitička aktivnost tek nakon lokalizacije u staničnoj membrani ili stijenci te osigurava pravilno *in vivo* smatanje proteina (Van den Hazel i sur., 1993.). Osim pro-regije, japsinske proteaze sadrže katalitičku domenu koja može biti sastavljena od jednog ili dva dijela peptidnog lanca. Yps1p protein između dijelova peptidnog lanca sadrži regiju u obliku petlje, tzv. „loop insertion“ koja podliježe proteolizi te time nastaju dva peptidna lanca međusobno povezana disulfidnim mostovima. Za razliku od Yps1p, Yps3p ne sadrži petlju. U aktivnom mjestu katalitičke domene svih japsinskih proteaza nalazi se konzervirana sekvenca, Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb, u kojoj se između hidrofobnih ostataka (Xaa) i treonina te serina (Xbb) nalazi po jedan aspartatni animokiselinski ostatak ključan za njihovu aktivnost (Rawlings i Barrett, 2004.). U sekvenci japsina kvasca *S.cerevisiae* također se nalazi i Ser/Thr bogata sekvenca koja je intenzivno O-glikozilirana, ali čija funkcija još uvijek nije poznata (Gagnon-Arsenault i sur., 2006.).

Aktivacija zimogene forme odvija se u kiselom mediju pri $\text{pH} < 4$ kada dolazi do odbijanja pozitivnih naboja u pro-regiji te protoniranja ključnih aspartatnih ostataka u aktivnom mjestu. U tim uvjetima dolazi do pucanja ionskih interakcija te destabilizacije forme projapsina što dovodi do autoprotolize te aktivacije japsina. Neki japsini ne provode autoproteolizu već se proteolitički cijepaju u prisustvu drugih proteolitičkih enzima, kao npr. β -sekretaza koja se aktivira djelovanjem furina (Bennett i sur., 2000.), međutim, aktivacija se provodi u istim uvjetima, pri $\text{pH} < 4$

Dosadašnjim istraživanjima uočeno je da japsinske proteaze sudjeluju u odgovoru stanice na stres uzrokovan promjenom temperature jer se ekspresija japsina povećala 12 puta prilikom povećanja temperature s 24°C na 37°C . Osim toga, otkriveno je i da *yps1Δyps2Δ* mutanti imaju izmijenjen udio polisaharida stanične stijenke što znači da japsini sudjeluju i u održavanju integriteta stanične stijenke.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

U ovom radu će se korištenjem PCR-a pripremiti mutirani oblici gena *SCW4* koji kodira za Scw4p protein stanične stijenke kako bi se u daljnjim istraživanjima moglo ispitati u kojoj se regiji unutar sekvence Scw4p nalaze aminokiselinski ostatci koji omogućuju kovalentno povezivanje ovog proteina u staničnu stijenku kvasca *S. cerevisiae*. Obzirom da se kovalentno vezana frakcija ovog proteina iz stijenke može izolirati na jednak način kao proteini PIR porodice, može se pretpostaviti da je i način vezanja jednak. Kod PIR proteina do kovalentnog vezanja dolazi preko ostatka glutamina unutar karakteristične ponavljajuće sekvence koja se nalazi u N-terminalnom dijelu proteina. Stoga će se u genu *SCW4* deletirati dio koji kodira za prvih 176 aminokiselina (N-terminalni dio) te za regiju od 16 aminokiselina u središnjem dijelu proteina koja je po broju i rasporedu glutaminskih ostataka slična repetitivnoj sekvenci PIR proteina (Slika 4.). Nakon delecije ovih sekvenci provjerit će se funkcionalnost konstruiranog mutiranog oblika gena njegovom ekspresijom u stanicama kvasca.



Slika 4. Usporedba dijelova proteinskih sekvenci Pir4p i Scw4p proteina. Zelenim pravokutnicima označeni su glutaminski ostaci koji PIR proteinima osiguravaju kovalentno povezivanje u staničnu stijenku, a čiji je raspored sličan u Scw4p proteinu. Crvenom bojom označen je ključni glutaminski ostatak za kovalentno povezivanje PIR proteina.

Pojedinačni ciljevi ovog rada jesu:

Deletiranje određenog dijela gena *SCW4* metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)

Ligacija mutiranog gena u odgovarajući plazmid

Restriksijska analiza uspješnosti uvođenja mutacije

Transformacija bakterije *E. coli* pripremljenim plazmidom radi umnažanja plazmida

Transformacija kvasca Y000wt pripremljenim plazmidom

Izolacija stijenki i proteina stanične stijenke transformiranog kvasca

Provjera ekspresije mutiranih oblika proteina te usporedba s nativnim oblikom Scw4p metodom Western blot

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- agar – Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)
- kvašćev ekstrakt i kvašćeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) – Biolife (Milano, Italija)
- pepton, baktotripton – Becton, Dickinson and Co. (Le Pont de Claix, France)
- histidin, uracil, leucin, triptofan, lizin i etidijev bromid – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- ECL-otopine za razvijanje blota – Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, USA)
- standardi za proteinsku elektroforezu – Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- λ DNA standard za elektroforezu, restrikcijski enzimi (XbaI, SacI), T₄ ligaza, Taq DNA polimeraza – New England BioLabs (Ipswich, USA)
- amonijev persulfat, N,N'-metilenbisakrilamid, Triton X-100, β -merkaptoetanol i N-dodecilsulfat (SDS) – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) – LKB Produkter AB (Bromma, Sweden)
- Ponceau S i polietilenglikol 4000 (PEG 4000) – Serva (Heidelberg, Njemačka)
- anti-HA-peroksidaza antitijela – Roche Diagnostics DmbH (Mannheim, Njemačka)
- Ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)

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

3.1.2. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi korišteni za umnažanje fragmenata, dijelova *SCW4* proteina, lančanom reakcijom polimeraze (PCR) prikazani su u Tablici 3.

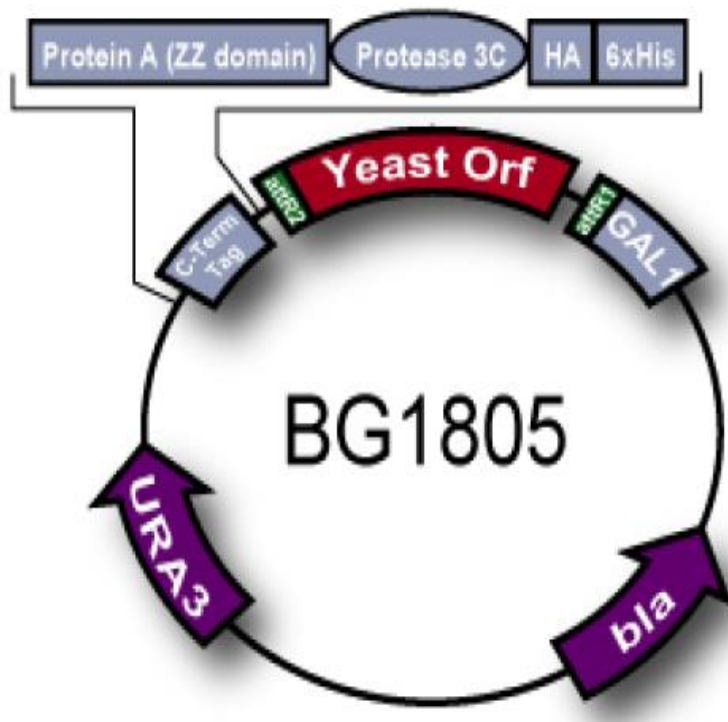
Tablica 3. Oligonukleotidi korišteni za deletiranje dijelova gena koji kodira za Scw4p protein

Početnica	Sekvenca
ΔV SCW4 F	GTTTCCATTGGTAACGAATTGGTTAACAGATCTGCCTTGAAGGCTGCC
ΔV SCW4 R	GGCAGCCTTCAAGGCAGATCTGTTAACCAATTCGTTACCAATGGAAAC
$\Delta 176$ SCW4 F	TTATCTGCTGCTACTCTTGCTGCTGTTGAAAATGTTTTCAAGGCTAAG
$\Delta 176$ SCW4 R	CTTAGCCTTGAAAACATTTTCAACAGCAGCAAGAGTAGCAGCAGATAAA AG
galprom F	GCTGGAGCTCCACCGCGGGAACGGATTAGAAGCC
Xba SCW4 R	ATGATGATGTCTAGATTCATTGGATAG

3.1.3. Plazmidi

3.1.3.1. pBG1805 SCW4

U radu je za uvođenje mutacije pomoću PCR-a metodom megapočetnice korišten plazmid pBG1805 SCW4 (Slika 5.) koji sadrži *ori* ishodište replikacije koji mu omogućava samostalnu replikaciju unutar stanice bakterije *E. coli* i gen *bla* koji kodira za β -laktamazu čime omogućava selekciju transformiranih bakterijskih stanica na selektivnoj LB podlozi s ampicilinom. Također sadrži i gen *URA3* iz kvasca čime omogućava selekciju transformiranih stanica kvasca na YNB Ura⁻ selektivnoj podlozi. U sekvenci plazmida pBG1805 SCW4 gen *SCW4* je pod kontrolom promotora *GAL*, a nizvodno od gena *SCW4* nalaze se sekvence -HA i -6xHis koje omogućuju detekciju proteina specifičnim antitijelima.

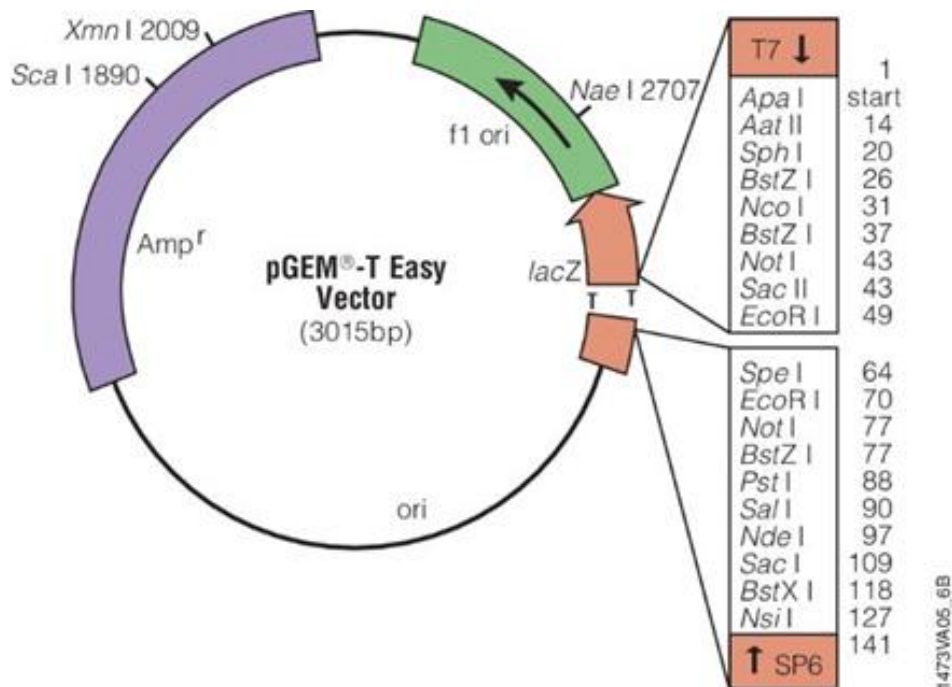


Slika 5. pBG1805 plazmid

3.1.3.2. pGEM-T Easy

U radu je za TA ligaciju fragmenata DNA umnoženih PCR-om korišten pGEM-T Easy plazmid (Promega Corporation, Madison, USA) čija je sekvenca prikazana na Slici 6.

pGEM-T Easy je linearizirani vektor na čijim se 3'-terminalnim krajevima nalazi po jedan nespareni timidin (T) što osigurava uspješnu ligaciju fragmenata dobivenih PCR metodom koji na svojim krajevima imaju ostatke adenina (A) s vektorom i ujedno u potpunosti sprječava mogućnost cirkularizacije vektora bez ubačenog PCR fragmenta. Plazmid pGEM-T Easy sadrži brojna restrikcijska mjesta i gen za rezistenciju na ampicilin što omogućava selekciju transformiranih bakterija *E. coli*. Vektor dolazi u velikom broju kopija u stanici te sadrži T7 i SP6 promotore RNA polimeraze koji omeđuju polilinker. Također sadrži i gen *lacZ* koji omogućava plavo-bijelu selekciju rekombinanata jer gen sadrži polilinker u koji se inseriraju PCR fragmenti. Insercijom PCR fragmenata u polilinker onemogućuje se ekspresija *lacZ* odnosno sinteza β -galaktozidaze što uzrokuje bijelu boju kolonija jer se x-gal iz podloge ne prevodi do produkta koji daje plavo obojenje.

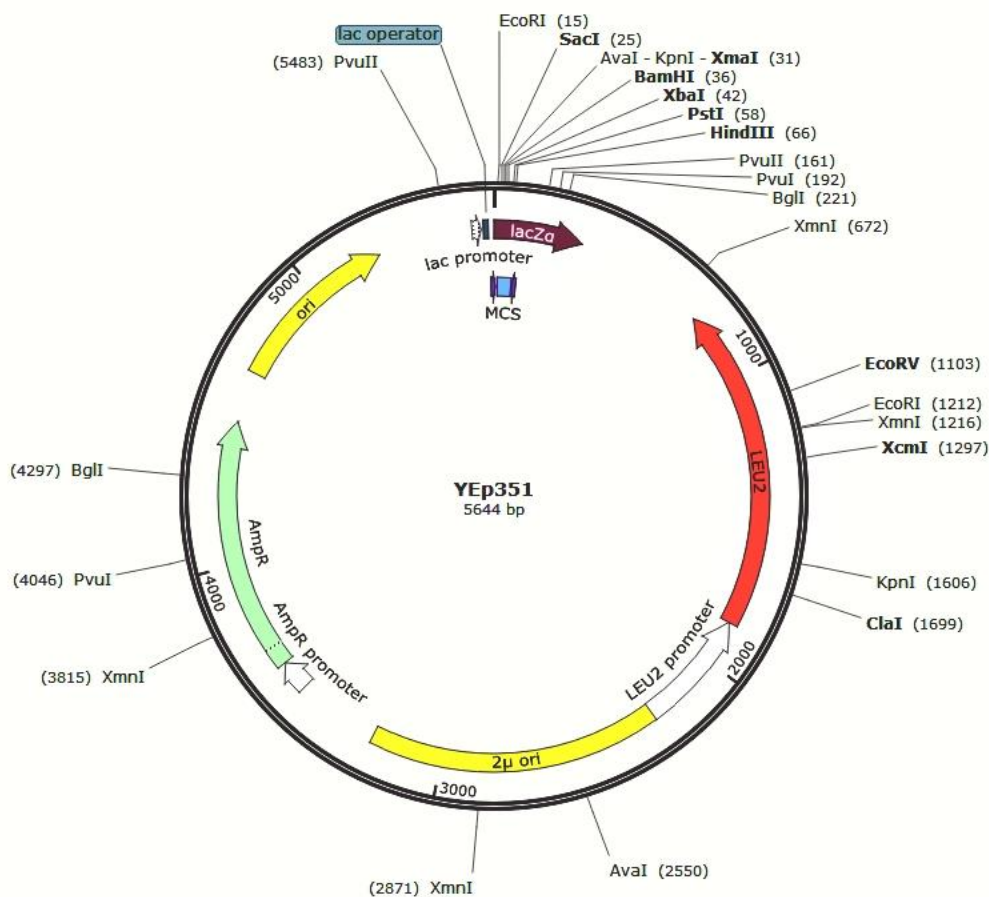


Slika 6. pGEM-T Easy plazmid

3.1.3.3. YEp351

Za transformaciju stanica kvasca, gen je kloniran u plazmid YEp351 čija je sekvenca prikazana na Slici 7.

YEp351 je konstruirani shuttle vektor koji može transformirati i bakteriju *E. coli* i kvasac *S. cerevisiae*. Sadrži *ori* ishodište replikacije koje mu omogućava samostalnu replikaciju u stanici domaćina, gen *bla* koji kodira za β -laktamazu čime bakterijskoj stanici osigurava rezistenciju na ampicilin te cijelu sekvencu pUC18 plazmida i svih 10 restrikcijska mjesta za enzime EcoRI, SacI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, SalI, PstI, SphI i HindIII. S obzirom na to da se polilinker nalazi unutar gena *lacZa*, insercijom PCR fragmenata onemogućuje se ekspresija *lacZ* odnosno sinteza β -galaktozidaze čime je omogućena plavo-bijela selekcija rekombinanata.



Slika 7. YEp351 plazmid

3.1.4. Soj bakterije

Za umnažanje gena korišten je soj bakterije *Escherichia coli* genotipa:

DH5 α F- Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r $_{K}^{-}$, m $_{K}^{+}$) *phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1* (Invitrogene)

3.1.5. Hranjiva podloga za uzgoj bakterija

E. coli uzgajana je u tekućoj LB podlozi (baktotripton ($\varphi = 0,01$), kvašćev ekstrakt ($\varphi = 0,05$), NaCl ($\varphi = 0,05$)), odnosno na krutoj LB podlozi (baktotripton ($\varphi = 0,01$), kvašćev 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 LB podlogu dodan je ampicilin u koncentraciji 100 μ g/mL.

3.1.6. Sojevi kvasaca

U radu su korišteni laboratorijski sojevi kvasca.

Tablica 4. Pregled korištenih laboratorijskih sojeva kvasca

Soj kvasca	Genotip
Y000 wt	Mat a, <i>his3Δ, leu2Δ, met15Δ, ura3Δ</i>
Y000 +SCW4	Y000 + pBG1805 SCW4-HA

3.1.7. Hranjiva podloga za uzgoj kvasaca

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

Smjesa aminokiselina, nukleotidnih baza 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	inozitol	2,0 g

Krute hranjive podloge jednakog su sastava kao i tekuće, uz dodatak 15 g/L agara. Hranjive podloge i otopine šećera steriliziraju se u autoklavu pri temperaturi od 121°C i tlaku od 1 atm.

3.2. METODE

3.2.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze PCR (Polymerase Chain Reaction) je *in vitro* metoda amplifikacije točno određenog dijela DNA prema postojećem lancu kalupu bez kloniranja i upotrebe stanice domaćina. Otkrio ju je 1983. godine Kary Mullis koji je 1993. godine za svoje otkriće dobio Nobelovu nagradu za kemiju koju je podijelio s Michaelom Smithom.

PCR se provodi u uređaju zvanom Thermocycler prikazanom na Slici 8. Uređaj zagrijava i hladi reakcijsku smjesu koja mora sadržavati DNA-kalup, obje početnice, smjesu sva četiri dNTP-a, termostabilnu DNA polimerazu (Taq polimerazu) i pufer za polimerazu koji sadržava Mg^{2+} . Osim toga uređaj kontrolira i dužinu trajanja pojedinih ciklusa amplifikacije.

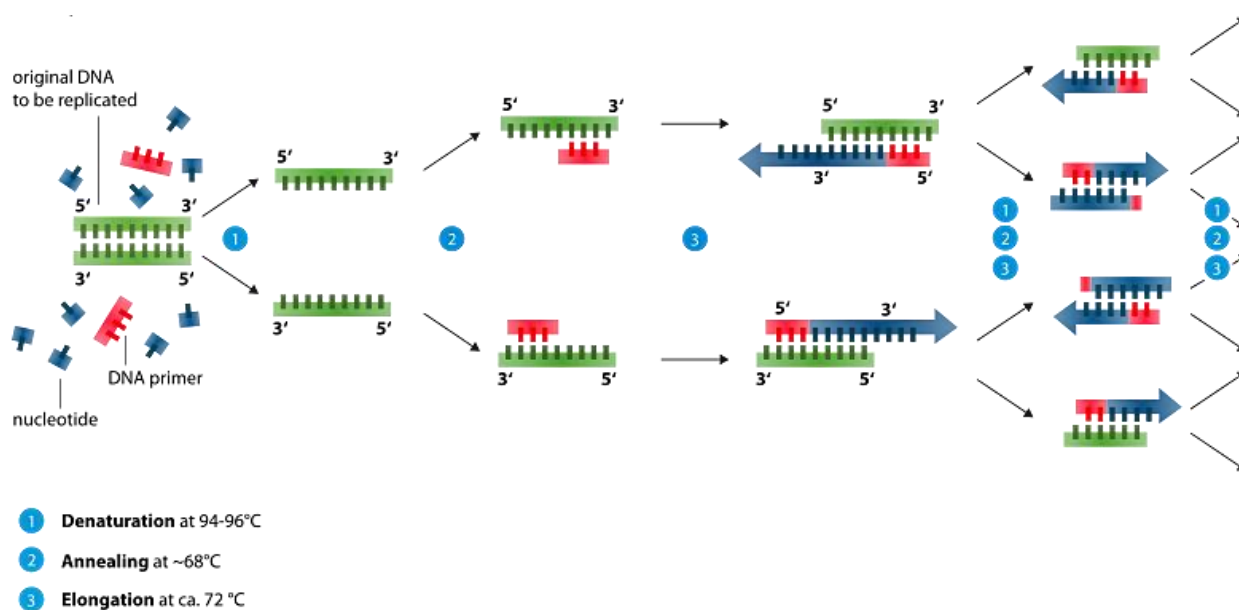


Slika 8. Uređaj za PCR

PCR metoda bazira se na upotrebi enzima DNA polimeraze koja provodi sintezu DNA produljenjem kratke oligonukleotidne sekvence nazvane „početnica“, primer“ ili „klica“ prema postojećem lancu kalupu s kojim je početnica komplementarno sparena. Početnice se uglavnom sastoje od 12-30 nukleotida koji se komplementarno sparuju sa sekvencama DNA s obje strane (3' i 5' kraja) ciljanog fragmenta pri čemu 3'-krajevi početnica moraju biti orijentirani jedan prema drugome.

To je ciklička metoda koja se sastoji od 3 koraka: denaturacije dvolančane DNA čiji je dio potrebno umnožiti, kovalentnog sparivanja početnica s kalupom te produljivanja početnice prema lancu kalupu.

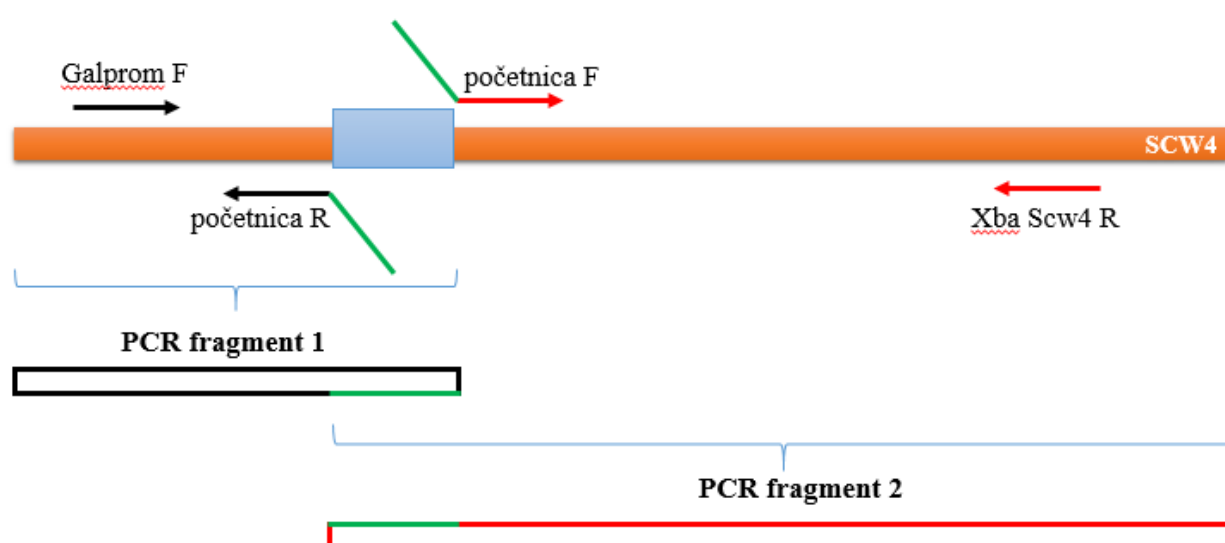
U prvom koraku se DNA koju je potrebno umnožiti zagrijava na 95°C čime dolazi do pucanja slabih vodikovih veza koje povezuju DNA lance u strukturu dvostruke uzvojnice. Time dolazi do denaturacije DNA pri čemu svaki lanac služi kao kalup za PCR. Nakon toga, smjesa se hladi na temperaturu od 50-70°C koja omogućuje komplementarno sparivanje početnica s dijelovima DNA lanca pri čemu ta temperatura varira ovisno o duljini početnica i udjelu GC baza. Zatim slijedi treći korak u kojem se temperatura postavlja na 72°C što je optimalna temperatura za Taq polimerazu koja na 3' kraj početnice dodaje nukleotide komplementarne DNA kalupu. S obzirom na to da iz jedne dvolančne DNA molekule u jednom ciklusu nastaju dvije, broj kopija DNA kalupa se time eksponencijalno povećava. Princip metode shematski je prikazan na Slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz PCR metode (<http://www.microbiologyinfo.com>, pristupljeno 10.4.2016.)

3.2.2. Uvođenje mutacije u gen *SCW4* metodom „megapočetnice“

Mutacije u gen *SCW4* uvedene su pomoću PCR-a metodom „megapočetnice“ pri čemu početnice koje se koriste nisu u potpunosti komplementarne lancu kalupu nego se pomoću njih umnoženi fragment unose željene mutacije. U prvom koraku PCR-a za umnažanje dijelova gena *SCW4* kao kalup je korišten plazmid pBG1805 *SCW4* i parovi početnica ΔV Scw4 F, odnosno $\Delta 176F$, i Xba Scw4 R te Galprom F i ΔV Scw4 R, odnosno $\Delta 176R$ dok su se u drugom koraku koristili parovi početnica Galprom F te Xba Scw4 R čije su sekvence prikazane u Tablici 3. Shema te reakcije prikazana je na Slici 10.



Slika 10. Prvi i drugi korak uvođenja mutacije u *SCW4* gen metodom „megapočetnice“. Zelenom bojom označeni su dijelovi početnica koji nisu komplementarni lancu kalupu već međusobno. Takva komplementarnost omogućava da u idućem koraku PCR reakcija, nakon denaturacije, dođe do komplementarnog sparivanja tih dijelova sintetiziranih fragmenata čime su jedan drugome ujedno i lanac kalup i početnica za sintezu *SCW4* gena. Time nastaje gen s deletiranim dijelom koji je na slici označen plavim pravokutnikom.

Reakcijska smjesa sadržavala je 0,3 μL plazmida pBG1805 Scw4, 5 μL pufera za Taq polimerazu (10 puta koncentrirani), 1 μL smjese sva četiri dNTP-a, 1 μL Tag polimeraze, po 1 μL određenih početnica te 40,7 μL vode, a PCR se provodio u 3 ciklusa čije su faze prikazane u Tablici 5.

Tablica 5. Način provođenja PCR reakcije za umnažanje. U stupcu tablice u kojem su navedene temperature pojedinih faza PCR reakcija, brojem (1.) opisani su uvjeti pri kojima se provodilo umnažanje ΔV_1 i $\Delta 176_1$ fragmenata, brojem (2.) umnažanje $\Delta 176_2$ fragmenata, a brojem (3.) umnažanje ΔV_2 fragmenata. Ostali uvjeti su pri svakom umnažanju bili jednaki.

ciklus	broj ponavljanja ciklusa	faza PCR-a	T	vrijeme provođenja
1	1	denaturacija	95°C	5 min
		komplementarno sparivanje početnica s kalupom	58°C (1.) / 52°C (2.) / 60°C (3.)	1,5 min
		sinteza DNA	72°C	36 s
2	5	denaturacija	95°C	45 s
		komplementarno sparivanje početnica s kalupom	58°C (1.) / 52°C (2.) / 60°C (3.)	1,5 min
		sinteza DNA	72°C	36 s
3	30	denaturacija	95°C	45 s
		komplementarno sparivanje početnica s kalupom	67°C	1,5 min
		sinteza DNA	72°C	36 s

U idućem koraku su prethodno dobiveni fragmenti (PCR1 i 2) provjereni DNA gel elektroforezom te pročišćeni iz gela uz pomoć kita za pročišćavanje PCR produkata prema uputstvima proizvođača (QIAquick PCR purification Kit; „Qiagen“, Valenca, CA, USA). Pročišćenim fragmentima se zatim odredi koncentracija mjerenjem apsorbancije na 260 nm kako bismo iz poznate koncentracije te duljine fragmenta mogli odrediti koji je volumen otopine pojedinih fragmenata potrebno uzeti za povezivanje umnoženih dijelova da bi imali ekvimolarne koncentracije fragmenata u reakcijskoj smjesi. Koncentracija γ otopine fragmenata se odredi mjerenjem A_{260} na spektrofotometru te računom pomoću formule :

$$\gamma = A_{260} \cdot f \cdot 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

gdje je f faktor razrjeđenja, a faktor $50 \mu\text{g/mL}$ je koncentracija DNA pri kojoj je A_{260} jednak 1.

Volumen otopine fragmenata koje je potrebno staviti u reakcijsku smjesu da bi bili u ekvimolarnim količinama se izračuna iz sljedeće formule:

$$V = L \cdot \frac{M}{\gamma}$$

gdje je L duljina fragmenta (kb), M recipročna vrijednost sume duljina fragmenata ($1/\text{kb}$) koji se koriste u ovom koraku PCR-a, a γ masena koncentracija otopine fragmenta.

Zatim se provodi 3. korak reakcije u kojem dobiveni fragmenti služe jedan drugome istovremeno kao primeri i kao kalupi umjesto plazmida pBG805 SCW4 pri uvjetima prikazanim u Tablici 6.

Reakcijska smjesa za povezivanje ΔV fragmenata sastojala se od $0,69 \mu\text{L}$ PCR fragmenta ΔV_1 , $2,6 \mu\text{L}$ PCR fragmenta ΔV_2 , $0,5 \mu\text{L}$ Taq polimeraze, $5 \mu\text{L}$ pufera za Taq polimerazu (10x koncentrirani), $1 \mu\text{L}$ smjese dNTP te $40,2 \mu\text{L}$ vode.

Reakcijska smjesa za povezivanje $\Delta 176$ fragmenata sastojala se od $2,1 \mu\text{L}$ PCR fragmenta $\Delta 176_1$, $0,56 \mu\text{L}$ PCR fragmenta $\Delta 176_2$, $5 \mu\text{L}$ pufera za Taq polimerazu (10x koncentrirani), $0,5 \mu\text{L}$ Taq polimeraze, $1 \mu\text{L}$ smjese dNTP te $40,84 \mu\text{L}$ vode.

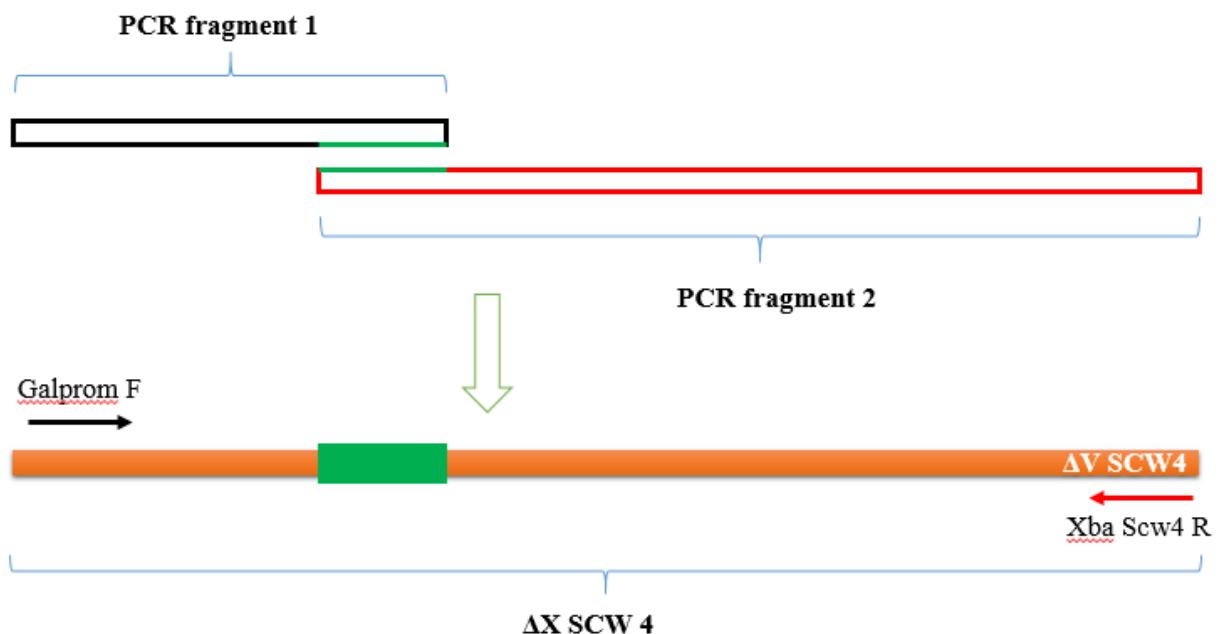
Tablica 6. Uvjeti pri kojima je provedeno povezivanje prvotno umnoženih PCR fragmenata

ciklus	broj ponavljanja ciklusa	faza PCR-a	T	vrijeme provođenja
1	15	denaturacija	95°C	45 s
		komplementarno sparivanje početnica s kalupom	69°C	1,5 min
		sinteza DNA	72°C	1 min i 40 s

Nakon provedenih 15 ciklusa se uzme 10 μL reakcijske smjese i doda joj se još 5 μL pufera za Taq polimerazu (10x koncentrirani), 0,5 μL Taq polimeraze, 1 μL smjese dNTP, po 1 μL vanjskih početnica (Galprom F i Xba Scw4 F) te 3,5 μL vode. PCR novih reakcijskih smjesa provodi se u 30 ciklusa prema uvjetima prikazanim u Tablici 7. Time je postignuto umnažanje dijelova gena *SCW4* u kojima je uvedena željena mutacija i koji su prikazani na Slici 11.

Tablica 7. Uvjeti pri kojima je provedeno umnažanje *SCW4* gena s uvedenim mutacijama

ciklus	broj ponavljanja ciklusa	faza PCR-a	T	vrijeme provođenja
1	30	denaturacija	95°C	45 s
		komplementarno sparivanje početnica s kalupom	69°C	1,5 min
		sinteza DNA	72°C	1 min i 40 s



Slika 11. Prikaz povezivanja umnoženih fragmenata te umnažanja gena s unesenom željenom mutacijom. Zeleni pravokutnik predstavlja dio gena koji je nastao umnažanjem komplementarno spojenih dijelova početnica kojima je unesena mutacija.

3.2.3. Pročišćavanje fragmenata DNA umnoženih PCR-om

Pročišćavanje umnoženih fragmenata provodi se pomoću kita za pročišćavanje PCR produkata prema uputama proizvođača (QIAquick PCR purification Kit; „Qiagen“, Valenca, CA, USA).

3.2.4. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

DNA gel elektroforeza provedena je u 1% agaroznom gelu pripremljenom otapanjem agaroze u TAE puferu (40 mmol/L TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol/L EDTA). Elektroforeza je provedena pri naponu od 70V, a zatim je gel uronjen u otopinu etidij-bromida (1mg/L) nakon čega su vrpce DNA vizualizirane pomoću UV svjetla na transiluminatoru (Hoefer, Macrovue UVis-20).

3.2.5. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Izolacija umnoženih fragmenata DNA iz agaroznog gela provedena je upotrebom kita „QIAquick Gel Extraction Kit“ za izolaciju prema uputama proizvođača („Qiagen“, Valencia, CA, USA).

3.2.6. TA-ligacija fragmenata DNA umnoženih PCR-om u plazmid pGEM-T Easy

Prije TA-ligacije PCR fragmenata u plazmid pGEM-T Easy, određena je koncentracija otopina umnoženih fragmenata mjerenjem apsorbancije na 260 nm. Mjerenje koncentracije bilo je nužno kako bi se mogao odrediti potreban volumen otopine fragmenata da bi se u ligacijskoj smjesi dobio željeni molarni omjer fragmenata i plazmida (3:1). Volumeni su izračunati iz formula:

$$V(\text{PCR fragment}) = \frac{m(\text{PCR fragment})}{\gamma(\text{PCR fragment})}$$

$$m(\text{PCR fragment}) = \frac{m(\text{vektor, ng}) \cdot \text{duljina}(\text{PCR fragment, kb})}{\text{duljina}(\text{vektor, kb})} \cdot \text{omjer fragment: vektor}$$

Ligacijske smjese ukupnog volumena od 10 μL sastojale su se od 1 μL plazmida pGEM-T Easy, 2 μL pufera za T4 ligazu, 1 μL T4 ligaze, potrebnog volumena PCR fragmenata (1,2 μL ΔV fragmenata odnosno 0,7 μL Δ176 fragmenata) te vode (potreban volumen dobiven je oduzimanjem sume volumena ostalih komponenti smjese od ukupnog volumena od 10 μL).

Ligacijska smjesa se inkubirala preko noći na 4°C.

3.2.7. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli*

U hladne kivete od 1,5 mL doda se 50 μ L suspenzije kompetentnih stanica *E. coli* DH α 5 i 10 μ L DNA, te se kivete inkubiraju u ledu 30 min. Nakon toga se 20 sekundi inkubiraju pri 42 °C ("heat-shock") i ponovno vrata u led na 2 minute. U kivete se zatim doda 950 μ L tekuće LB-podloge te se kivete inkubiraju 1 sat na 37°C kako bi se sintetizirala određena količina enzima β -laktamaze. Po 200 μ L suspenzije transformiranih stanica se nacijepi se na krute LB-ploče s ampicilinom i inkubira preko noći na 37°C.

3.2.8. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije *Escherichia coli* („mini-prep“)

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, pomoću Qiaprep Miniprep kita prema uputama proizvođača („Qiagen“, Valencia, CA, USA).

3.2.9. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

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

3.2.10. Ligacija fragmenata DNA i plazmida YEp351

Ligacijska smjesa ukupnog volumena od 20 μ l se sastojala od 50 ng plazmida (prethodno pripremljenog restrikcijom pomoću enzima SacI i XbaI) i odgovarajuće mase fragmenta (prethodno pripremljenog restrikcijom pomoću enzima SacI i XbaI) da bi dobili željeni molarni odnos fragmenta i plazmida, 2 μ L 10x koncentriranog pufera za T4 ligazu i 1 μ L T4 ligaze. U ligaciji je korišten molarni odnos plazmida i fragmenta 1:7. Smjesa je inkubirana na 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim 10 minuta na 65°C.

Potrebna masa fragmenata izračunata je iz formule:

$$m(\text{PCR fragment}) = \frac{m(\text{vektor, ng}) \cdot \text{duljina (PCR fragment, kb)}}{\text{duljina (vektor, kb)}} \cdot \text{omjer fragment: vektor}$$

3.2.11. Transformacija kvasca LiAc metodom

Prije transformacije je kvasac uzgojen u YNB kompletnoj podlozi do log faze rasta. Porasla suspenzija kvasca se centrifugira 5 minuta na 3000 rpm, a zatim se talog ispere u 5 mL sterilnog TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) te resuspendira u određenom volumenu TE pufera umanjenom za volumen stanica kvasca tako da početna gustoća stanica iznosi 50-60 OD₆₀₀ jedinica. Suspenziji se zatim doda jednak volumen 0,2M LiAc te se inkubira 60 minuta na 30°C uz blago miješanje na tresilici. 100 µL te suspenzije se prebaci u Eppendorf kivetu i doda se 10 µL DNA (YEp351ΔVSCW4 odnosno YEp351ΔI76SCW4) te se suspenzija inkubira 30 minuta na 30°C bez miješanja. Za vrijeme ove inkubacije se pripremi otopina 60% polietilenglikola (0,6 g PEG 4000 se kuhanjem otopi u 400 µL vode).

Nakon inkubacije se suspenzija lagano vortexira pa se doda 145 µL pripremljene otopine PEG-a i snažno vortexira te se inkubira 60 minuta na 30°C bez miješanja. Kiveta sa suspenzijom stanica se zatim inkubira 6 minuta na 42°C („heat-shock“) bez miješanja nakon čega se dodaje 1 mL hladne sterilne vode. Suspenzija se centrifugira 1 minutu na 8000 rpm, a zatim se talog resuspendira u 120 µL sterilne hladne vode i nacijepi na selektivnu podlogu (u ovom radu to je bila YNB Leu⁻ podloga).

3.2.12. Izolacija staničnih stijenki kvasca

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

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

3.2.13. Izolacija nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke

Talog izoliranih stijenki se resuspendira u 1 ml Laemmli pufera (50 mM Tris-HCl pufera pH 6,8, 2 mM EDTA III, 2% SDS-a, 0,001% boje bromfenol plavo i 5% β -merkaptetoetanol.) i kuha 10 minuta u vrijućoj vodenoj kupelji. Nakon toga se stijenke odvajaju od SDS ekstrakta centrifugiranjem na 8000 rpm tijekom 1 minute. SDS ekstrakt se odvoji u novu Eppendorf kivetu jer sadrži nekovalentno vezane proteine, a talog stijenki se ponovno resuspendira u 1 mL Laemmli pufera i kuha 10 minuta u vrijućoj kupelji. Stijenke se odvoje centrifugiranjem, a talog se ispere 4 puta u 50 mM K-fosfatnom puferu te jednom u destiliranoj vodi.

3.2.14. SDS-elektroforeza po Laemmli-u

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

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

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

3.2.15. Prijenos proteina na nitrocelulozu i njihovo specifično obilježavanje

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

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

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

4. REZULTATI

Rezultati dosadašnjih istraživanja Scw4p proteina stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* pokazuju da u sekvenci proteina postoje mjesta za procesiranje proteazom Kex2 te japsinskim proteazama (Slika 12.).

MRLSNLIASA SLLSAATLAA PANHEHKDKR AVVTTTVQKO TTIIVNGAAS TPVAALEENA
VVNSAPAAAT STSSAASVA TAAASSENN SQVSAASPA SSSAATSTQS SSSSQASSSS
SSGEDVSSFA SGVRGITYTP YESSGACKSA SEVASDLAQL TDFPVIRLYG TDCNQVENVF
KAKASNQKVF LGIYYVDQIQ DGVNTIKSAV ESYGSWDDVT TVSIGNELVN GNQATPSQVG
QYIDSGRSAL KAAGYTGPVV SVDTFIAVIN NPELCDYSDY MAVNAHAYFD KNTVAQDSGK
WLLEQIQRVW TACDGKKNVV ITESGWPSKG ETYGVAVPSK ENQKDAVSAI TSSCGADTFL
FTAFNDYWKA DGAYGVEKYW GILSNE

Slika 12. Sekvenca proteina Scw4p. Crvenom bojom prikazana je signalna sekvenca koja Scw4p protein upućuje u sekretorni put. Zelenom bojom prikazano je mjesto procesiranja Kex2p proteazom, a plavom bojom mjesto procesiranja japsinskim proteazama. Potcrtani dio sekvencije deletiran je u $\Delta 176$ Scw4p proteinu dok je u ΔV Scw4p deletiran dio koji je označen ljubičastom bojom.

Osim toga, pokazano je da se Scw4p protein u staničnu stijenku veže kovalentno i nekovalentno što omogućava njegovu izolaciju na dva načina: kuhanjem 5-10 minuta u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptetanola ili tretmanom s NaOH (Teparić i sur., 2010.). Tretman s NaOH koristi se za izolaciju kovalentno vezanih proteina iz PIR grupe koji sadrže karakterističnu ponavljajuću sekvencu preko koje se vežu u stijenku. Obzirom da se kovalentno vezana frakcija ovog proteina iz stijenke može izolirati na jednak način kao proteini PIR porodice, može se pretpostaviti da je i način vezanja jednak. Međutim, Scw4p protein ne sadrži takvu sekvencu pa se postavlja pitanje na koji je način i preko kojih ostataka kovalentno vezan u staničnu stijenku. Kod PIR proteina do kovalentnog vezanja dolazi preko ostatka glutamina unutar karakteristične ponavljajuće sekvence koja se nalazi u N-terminalnom dijelu proteina. Stoga će se u genu *SCW4* deletirati dio koji kodira za prvih 176 aminokiselina (N-terminalni dio) te za regiju duljine 16 aminokiselinskih ostataka u središnjem dijelu proteina koja je po broju i rasporedu glutaminskih ostataka slična repetitivnoj sekvenci PIR proteina (Slika 4.).

4.1. Uvođenje mutacije u gen *SCW4* metodom lančane reakcije polimerazom

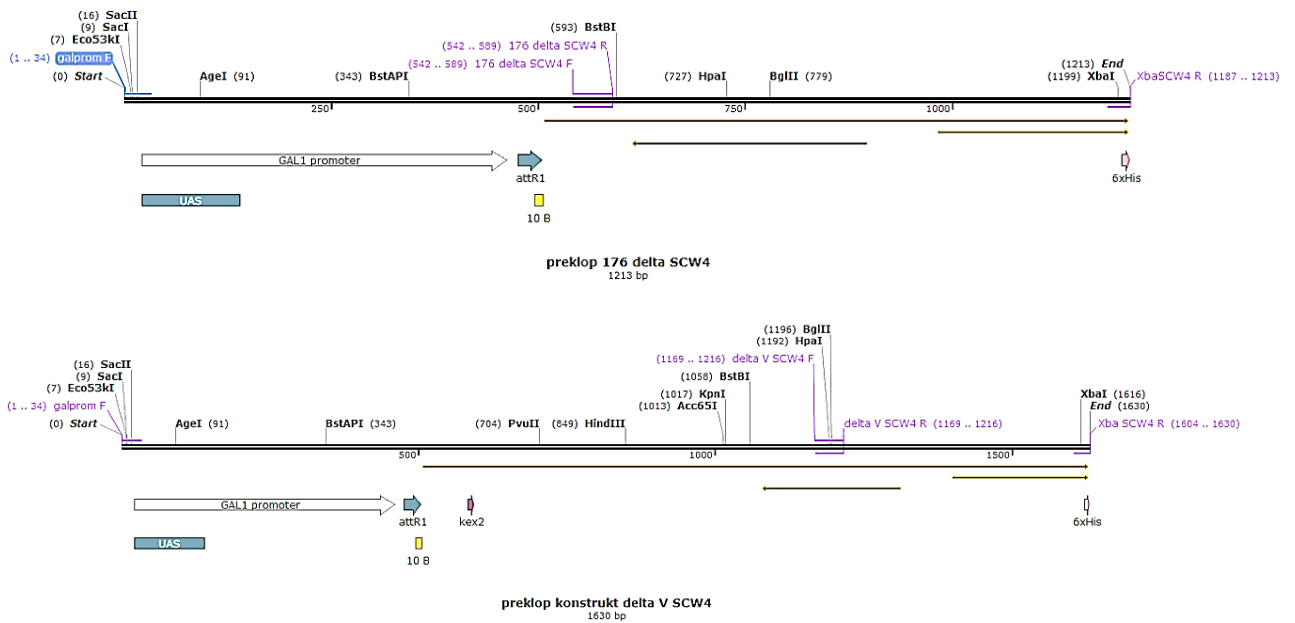
Sekvenca koja omogućava kovalentno povezivanje PIR proteina u staničnu stijenkiju pronađena je kod sva 4 PIR proteina u različitom broju kopija, a sadrži 3 karakteristična glutaminska ostatka. Između prva dva glutamina se nalaze aminokiseline izoleucin (I), glicin (G), aspartat (D) te glicin (G), a između drugog i trećeg glutaminskog ostatka nalazi se valin (V) (Slika 3.).

Scw4p protein u svojoj sekvenci sadrži po broju i rasporedu glutaminskih ostataka dio sličan karakterističnoj sekvenci PIR proteina iako se između glutaminskih ostataka nalaze različite aminokiseline (Slika 4.).

U gen *SCW4* unesene su mutacije tj. deletirane su regije koje kodiraju za dijelove sekvence proteina za koje se pretpostavlja da bi mogli biti odgovorni za kovalentno povezivanje. Delecije su uvedene PCR-om pomoću metode „megapočetnice“.

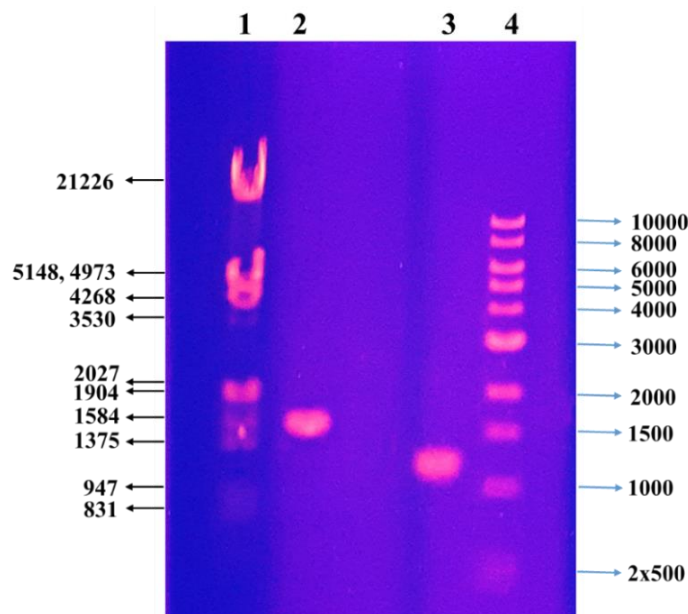
U prvom koraku PCR reakcija korištene su početnice ΔV Scw4 F i Xba Scw4 R za umnažanje ΔV_1 PCR fragmenata te početnice Galprom F i $\Delta 176$ Scw4 R za umnažanje $\Delta 176_1$ PCR fragmenata jer je njihovo umnažanje provedeno pri istim uvjetima (uvjeti prikazani u Tablici 5.). U drugom koraku su umnoženi nizvodni (za $\Delta 176$ konstrukt), odnosno uzvodni (za ΔV konstrukt) dijelovi gena od dijela koji smo željeli deletirati. Za umnažanje ΔV_2 PCR fragmenata su korištene početnice Galprom F i ΔV Scw4 R dok su za umnažanje $\Delta 176_2$ PCR fragmenata korištene početnice $\Delta 176$ Scw4 F i Xba Scw4 R, ali njihovo umnažanje, radi veće razlike u duljini te udjelu GC parova baza nije provedeno pri istim uvjetima (uvjeti prikazani u Tablici 5.). Da bismo mogli provesti treći korak, odnosno povezati te fragmente u konačni fragment s uvedenom mutacijom (ΔV *SCW4* duljine 1630 pb te $\Delta 176$ *SCW4* duljine 1213 pb), umnoženi fragmenti su pročišćeni uz pomoć kita za pročišćavanje PCR produkata prema uputstvima proizvođača (QIAquick PCR purification Kit; „Qiagen“, Valenca, CA, USA).

U trećem koraku PCR reakcije umnoženi i pročišćeni fragmenti jedan drugome istodobno služe i kao kalup i kao početnice zahvaljujući dijelu sekvenci početnica koje se nisu u potpunosti sparivale s nativnim genom *SCW4* te time nastaje *SCW4* gen s deletiranim određenim dijelom sekvence (Slika 13.)



Slika 13. Shematski prikazi PCR-om konstruiranog *SCW4* gena s unesenim mutacijama. U shemi su prikazani položaji korištenih početnica za unošenje mutacija i umnažanje fragmenata, te položaj restrikcijskih mjesta unutar umnoženih fragmenata.

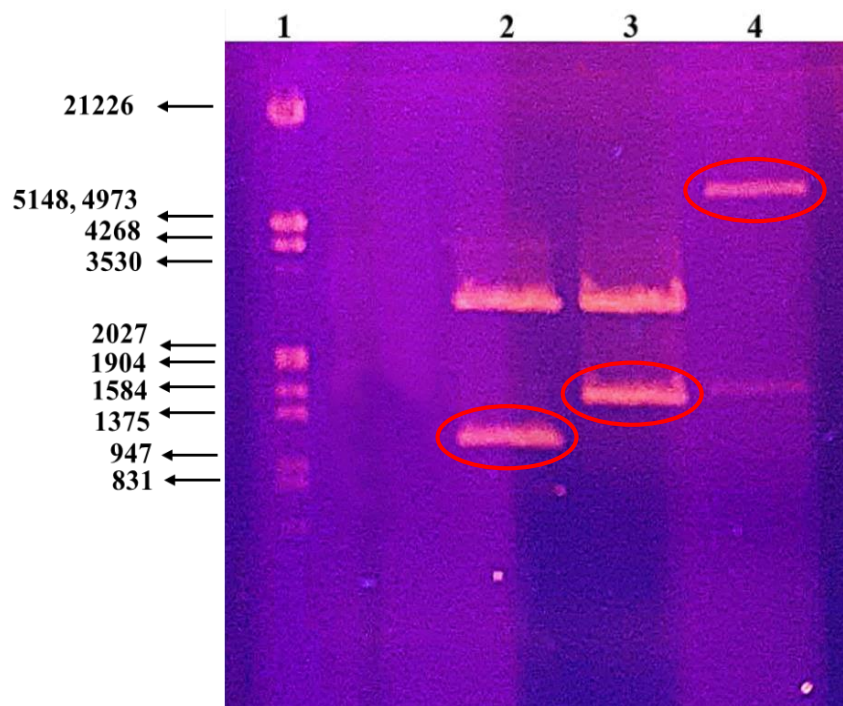
Nakon toga uslijedila je PCR reakcija uz upotrebu vanjskih početnica tj. početnica Galprom F i Xba Scw4 R čime su umnoženi mutirani konstrukti *SCW4* gena. Rezultat umnažanja provjeren je elektroforezom u 1% agaroznom gelu kao što je prikazano na Slici 14.



Slika 14. Analiza fragmenata dobivenih povezivanjem PCR fragmenata 1 i 2 elektroforezom u agaroznom gelu. Uzorci: **1.** standard – λ /HindIII+EcoRI; **2.** PCR fragment $\Delta V SCW4$ (1630 pb); **3.** PCR fragment $\Delta 176 SCW4$ (1213 pb); **4.** standard – DNA ladder 1 kb.

4.2. Restrikcija pGEM-T Easy i YEp351 plazmida

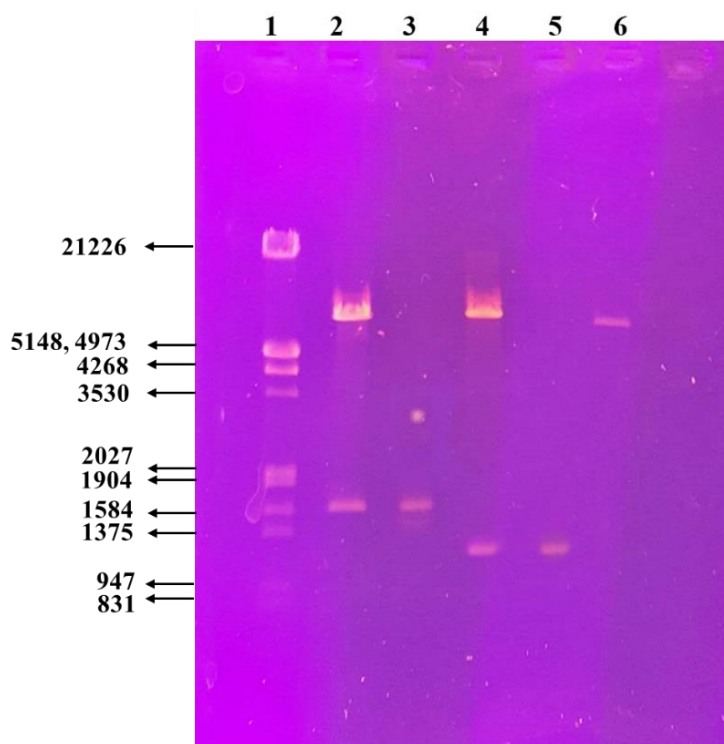
Umnoženi mutirani fragmenti *SCW4* gena ligirani su u plazmid pGEM-T Easy te su tim plazmidima transformirane kompetentne stanice *E.coli*. S obzirom na postojanje *ori* sekvence u plazmidu, došlo je do umnažanja plazmida nakon čega su plazmidi izolirani iz transformiranih stanica upotrebom Qiaprep Miniprep kita prema uputama proizvođača („Qiagen“, Valencia, CA, USA). S obzirom na to da pGEM-T Easy ne sadrži ishodište za samostalnu replikaciju u stanicama kvasca, za razliku od YEp351 plazmida, restrikcija oba plazmida restrikcijским enzimima XbaI i SacI omogućila je izolaciju željenih fragmenata te ligaciju mutiranih fragmenata *SCW4* u YEp351 plazmid. Restrikcija plazmida provedena je prema uputama proizvođača, a uspješnost restrikcije prikazana je na Slici 15.



Slika 15. Restrikcijška analiza pGEM-T Easy $\Delta 176$ *SCW4*, pGEM-T Easy ΔV *SCW4* i YEp351 plazmida. Plazmidi su rezani SacI i XbaI enzimom i nakon toga analizirani elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Fragmenti izolirani za sljedeći stupanj ligacije su zaokruženi crveno. Uzorak: **1.** standard – λ /HindIII+EcoRI; **2.** pGEM-T Easy $\Delta 176$ *SCW4*; **3.** pGEM-T Easy ΔV *SCW4*; **4.** YEp351.

4.3. Izolacija mutiranih *SCW4* fragmenata i odgovarajućeg fragmenta YEp351 plazmida iz agaroznog gela i njihova ligacija u plazmid prikladan za transformaciju kvasca

Kao što je navedeno u poglavlju Materijali i metode, izolacija fragmenata (zaokruženih crveno na Slici 15.) iz agaroznog gela provodila se pomoću kita za izolaciju „QIAquick Gel Extraction Kit“ prema uputama proizvođača („Qiagen“, Valencia, CA, USA). Cilj ovog koraka bio je dobivanje fragmenata mutiranog *SCW4* gena te dijela YEp351 plazmida sa kojim će se umnoženi fragmenati ligirati u konačni plazmid prikladan za transformaciju kvasca. Ligacijskom smjesom su zatim transformirane stanice *E. coli* kako bi, umnažanjem transformiranih bakterijskih stanica, istovremeno došlo i do umnažanja plazmida. Nakon toga su izolirani plazmidi iz bakterijskih stanica upotrebom Qiaprep Miniprep kita prema uputama proizvođača („Qiagen“, Valencia, CA, USA) te je provedena restriksijska provjera uspješnosti ligacije. Ispravnost YEp351 $\Delta 176$ *SCW4* i YEp351 ΔV *SCW4* plazmida provjerena je zatim elektroforezom u agaroznom gelu čiji su rezultati prikazani na Slici 16. Nakon provjere ispravnosti konačni plazmidi su korišteni za transformaciju stanica kvasca.

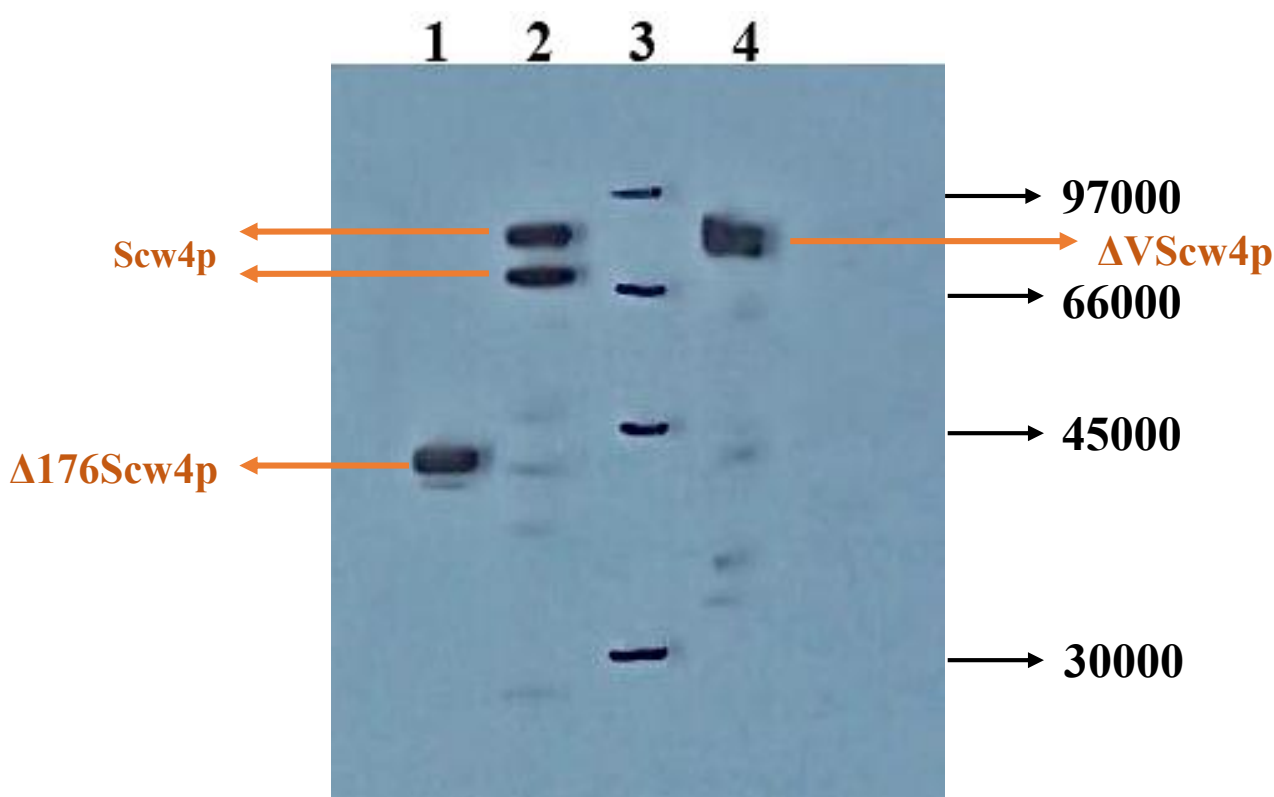


Slika 16. Restriksijska analiza YEp351 $\Delta 176$ *SCW4* i YEp351 ΔV *SCW4* plazmida. Plazmidi su rezani *SacI* i *XbaI* enzimom pa analizirani elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Uzorak: **1.** standard – λ /HindIII+EcoRI; **2.** YEp351 ΔV *SCW4*; **3.** ΔV *SCW4* fragment; **4.** YEp351 $\Delta 176$ *SCW4*; **5.** $\Delta 176$ *SCW4* fragment; **6.** YEp351 fragment.

4.4. Provjera uspješnosti ekspresije mutiranog oblika Scw4p proteina u staničnoj stijenci

Uspješnost ekspresije mutiranog oblika Scw4p proteina u staničnoj stijenci provjerena je metodom Western blotting.

Nakon dobivanja konačnih plazmida u stanicama bakterije *E.coli*, plazmidima su transformirani kvasci koji su potom uzgajani prvo na krutoj, a potom i u YNB Leu⁻ selektivnim tekućim podlogama do gustoće 2 OD₆₀₀ jedinice. Stijenke i proteini staničnih stijenki su izolirani te je provedena SDS gel elektroforeza i Western blot kako je opisano u poglavlju Materijali i metode, a rezultati su prikazani na Slici 17.



Slika 17. Provjera uspješnosti ekspresije mutiranih oblika Scw4p proteina u staničnoj stijenci. Scw4p-HA je nakon izolacije iz stanične stijenke analiziran Western blot metodom pomoću antitijela na -HA oznaku. Linija: **1.** mutirani oblik Δ176Scw4p; **2.** nativni Scw4p; **3.** standardi; **4.** mutirani oblik ΔVScw4p.

5. RASPRAVA

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* modelni je organizam iz carstva *Fungi*. Ima visoku učinkovitost fermentacije, brzog rasta i korištenja šećera, a tolerantan je na visoke koncentracije etanola, niske razine kisika te je aktivan u kiselom okruženju pa predstavlja idealan organizam za proučavanje različitih biokemijskih puteva unutar eukariotskih stanica. Sadrži staničnu stijenkicu koja mu određuje oblik i daje čvrstoću. Vanjski sloj stanične stijenkice građen je od manoproteina čija uloga nije još potpuno razjašnjena, ali se pretpostavlja da sudjeluju u pregradnjama stijenkice tijekom staničnog ciklusa, određuju površinska svojstva stanice kvasca te ograničavaju propusnost stijenkice. Unutarnji je sloj građen od polisaharida β -1,3-glukana i β -1,6-glukana, manana te hitina koji određuju osmotsku i mehaničku stabilnost stanice (Mrša i sur., 1997.) Funkcija većine proteina stanične stijenkice kvasca još uvijek nije poznata, a niti jedan od analiziranih i dosad identificiranih proteina nije se pokazao esencijalnim za rast stanica. Poznato je da se proteini stijenkice vežu kovalentnim i nekovalentnim interakcijama s glukanskim slojem stanične stijenkice. Dio kovalentno vezanih proteina (tzv. PIR proteini) se može iz stanične stijenkice izolirati inkubacijom stijenkice u 30 mM NaOH na +4°C (Mrša i sur., 1997.), a dio djelovanjem glukanaza (proteini tzv. GPI grupe). PIR (Proteins with Internal Repeats) proteini se u staničnoj stijenci kvasca povezuju esterskom vezom između γ -karboksilne grupe glutaminske kiseline u ponavljajućem motivu proteina i hidroksilne skupine glukoze β -1,3-glukana (Ecker i sur., 2006). Ponavljajuće sekvence PIR proteina su locirane u N-terminalnom dijelu proteina, a kod različitih članova porodice se ponavljaju od 1 do 10 puta. Drugu grupu proteina čini dvanaest proteina koji se s β -1,6-glukanom stanične stijenkice povezuju preko ostatka GPI (glikozilfosfatidil-inozitolnog) sidra, a izoliraju se enzimima glukanazama (Lipke i sur., 1989.; Roy i sur., 1991.). Nevalentno vezani proteini izoliraju se tretmanom stijenkice vrućim SDS-om uz dodatak β -merkaptetanola (Mrša i sur., 1997.) ili podvrgavanjem stanica tretmanu s 2 mM ditiotreitolum na 4°C tijekom noći (Cappellaro i sur., 1998.) pri čemu dobiveni ekstrakt, osim nevalentno vezanih proteina, sadrži i proteine koji su u staničnoj stijenci vezani disulfidnim mostovima. Ti proteini pretežito imaju glikozidaznu ili transglikozidaznu aktivnost (Goldman i sur., 1995.). Scw4p i Scw10p proteini su najprije bili detektirani među nevalentno vezanim proteinima stanične stijenkice. Međutim, u daljnjim istraživanjima je uočeno da nakon disrupcije sva 4 PIR gena, te izolacije proteina iz stijenkice tako dobivenih mutanata, u NaOH ekstraktu zaostaje proteinska vrpca veličine 67 kDa koja odgovara veličini Scw4p i Scw10p. Ovakav rezultat je potaknuo razmišljanje o mogućnosti da se Scw4p i Scw10p proteini u staničnoj stijenci vežu i kovalentnim vezama i nevalentnim

interakcijama. To je zatim i dokazano disrupcijom *SCW4* gena u četverostrukom *pir* mutantu čime u NaOH ekstraktu više nije bilo proteinske vrpce veličine 67 kDa. Time je potvrđeno da se Scw4p u staničnu stijenku veže na dva načina (Teparić i sur., 2010.), ali još nije poznato kojom vrstom veze niti koji je dio sekvence proteina odgovoran za kovalentno povezivanje. Obzirom na način kojim se kovalentno vezana frakcija Scw4p iz stijenke može izolirati pretpostavlja se da je i način povezivanja sličan onome kod PIR proteina.

Usporedbom sekvenci Scw4p i Pir4p proteina, pronađen je dio Scw4p proteina sličan karakterističnoj ponavljajućoj sekvenci koja omogućuje kovalentno povezivanje PIR proteina (Slika 4.) zbog čega smo pretpostavili da bi ta sekvencija mogla biti odgovorna za kovalentno povezivanje Scw4p proteina. Radi te pretpostavke smo PCR-om, metodom megapočetnice, deletirali taj dio sekvence u $\Delta VSCW4$ konstrukt. Budući da su u PIR proteinima repetitivne sekvence smještene u N-terminalnom dijelu proteina, također smo konstruirali i mutirani oblik gena u kojem smo deletirali dio koji kodira za početnih 176 aminokiselina ($\Delta 176SCW4$ konstrukt).

Željene mutacije su uvedene metodom „megapočetnice“ PCR-om pri čemu je kao kalup korišten pBG1805 plazmid koji sadrži nativni gen *SCW4* stavljen pod kontrolu *GAL* promotora. *GAL* promotor omogućuje povećanu ekspresiju Scw4p proteina u stanicama kvasca uzgajanog na podlozi s galaktozom. Nizvodno od gena *SCW4* nalazi se hemaglutininski (-HA) nastavak koji omogućuje detekciju Scw4p proteina –HA antitijelima metodom Western blotting.

Mutacije su uvedene koristeći početnice koje se nisu u potpunosti komplementarno sparivale s nativnim genom *SCW4* u pBG1805 plazmidu koji je služio kao kalup, već su ti dijelovi početnica bili međusobno komplementarni. Zbog toga se, u idućem krugu PCR reakcija, korištenjem fragmenata dobivenih u prethodnom ciklusu umnažanja kao kalupa, a ujedno i kao početnica, te podešavanjem temperature na onu koja omogućuje komplementarno sparivanje tih dijelova fragmenata (”annealing temperature”) (Slika 11.) osigurava sinteza *SCW4* gena s uvedenim mutacijama (metoda ”overlap extension PCR”).

Nakon uvođenja mutacija u *SCW4* gen konstrukti su ligirani u plazmid pGEM-T Easy. Ligacija PCR-om dobivenog fragmenta u pGEM-T Easy događa se tzv. TA ligacijom tj. komplementarnim sparivanjem ostataka T koji se nalaze na krajevima lineariziranog pGEM-T Easy plazmida sa ostacima A koje na krajeve PCR konstrukta dodaje Taq polimeraza. Nakon toga se dobiveni cirkularni produkt umnoži u stanicama *E. coli* te se plazmidna DNA izolira iz stanica koristeći Qiaprep Miniprep kit („Qiagen“, Valencia, CA, USA).

Plazmid se zatim tretira odgovarajućim restrikcijskim enzimima (SacI i XbaI) kako bi se iz cirkularnog plazmida izrezao i izolirao prethodno ligirani fragment. Svrha ovog koraka je dobivanje PCR fragmenata s dobro porezanim krajevima, čime se osigurava ligacija fragmenata u konačni, ciljni plazmid kojim se mogu transformirati stanice kvasca. Naime, često je prilikom ligiranja PCR fragmenata u plazmid prisutan problem da PCR fragmenti nisu potpuno porezani odgovarajućim restrikcijskim enzimima jer su restrikcijska mjesta u fragmentima uvijek locirana blizu njihovih krajeva čime se smanjuje efikasnost djelovanja restrikcijskih enzima. Ukoliko krajevi fragmenata nisu dobro porezani ne može doći niti do ligacije jer se ne mogu komplementarno spariti sa dijelovima plazmida. Zato se ubacivanjem fragmenta u pGEM-T Easy plazmid TA ligacijom i zatim izolacijom fragmenta odgovarajućim restrikcijskim enzimima postiže bolja efikasnost ligacije fragmenta u ciljni plazmid. S obzirom na to da plazmid pGEM-T Easy nema *ori* ishodište replikacije koje bi mu omogućilo replikaciju unutar stanica kvasca, fragmenti se prije ubacivanja u stanice kvasca moraju prebaciti u YEp351 "shuttle" vektor koji se prvo umnaža u bakterijskoj stanici, a zatim eksprimira u stanici kvasca. Nakon transformacije i uzgoja kvasca slijedilo je razbijanje stanica te izolacija stijenki i nekovalentno vezanih proteina staničnih stijenki kako bi se provjerilo dolazi li do uspješne ekspresije novih, mutiranih oblika Scw4p te njihovog upućivanja u staničnu stijenku sekretornim putem. Nevalentno vezani proteini su izolirani tretmanom stijenki kuhanjem u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptetanola. Izolirani proteini razdvojeni su elektroforezom i preneseni na nitroceluloznu membranu metodom Western blot te detektirani antitijelima na – HA oznaku. Rezultati su pokazali da se mutirani oblici Scw4p proteina uspješno ekspimiraju i transportiraju u staničnu stijenku. Kao što je i očekivano, usporedba s nativnim oblikom Scw4p pokazuje razlike u molekularnoj masi mutiranih oblika proteina, pri čemu je molekularna masa proteina s unesenom ΔV mutacijom nešto manja od nativnog Scw4p, dok se molekularna masa proteina s unesenom $\Delta 176$ mutacijom znatno razlikuje od one nativnog Scw4p. Ovakav rezultat je u skladu s očekivanjima jer je ΔV Scw4p od nativnog Scw4p manji za svega 16 aminokiselina, dok je $\Delta 176$ Scw4p manji za 176 aminokiselina. Na Slici 17. se još može uočiti da unesene mutacije utječu i na procesiranje proteina budući da su obje vrpce ΔV Scw4p mutanta manje molekularne mase i difuznije nego one nativnog Scw4p. Osim toga u ekstraktu prevladava gornja vrpca dok je donja jedva zamjetna. Za razliku od ΔV Scw4p, kod nativnog oblika Scw4p intenzitet ovih dviju vrpca je podjednak. Kod $\Delta 176$ Scw4p ekstrakta vidljiva je samo jedna vrpca znatno manje molekularne mase od nativnog proteina, što je i očekivano jer je u ovom mutantu uklonjen dio gena koji kodira za N-terminalni dio proteina u kojem se nalaze mjesta za procesiranje proteolitičkim enzimima Kex2p i japsinskim protazama.

Na ovaj je način potvrđeno da se pripremljeni mutirani oblici Scw4p uspješno eksprimiraju, transportiraju do stanične stijenke i vežu u nju te da se mogu koristiti za daljnje ispitivanje načina vezanja Scw4p u staničnu stijenku kvasca. U daljnjim eksperimentima će se detaljno ispitati utjecaj unesenih mutacija na kovalentno vezanje proteina Scw4p u staničnu stijenku kao i utjecaj pH na vezanje i procesiranje mutiranih oblika Scw4p proteina.

6. ZAKLJUČCI

Upotrebom PCR-a uvedene su mutacije u gen *SCW4* kojima je u genu deletirana regija koja kodira za 176 N-terminalnih aminokiselina proteina Scw4p, odnosno regija koja kodira za 16 aminokiselina u središnjem dijelu proteina Scw4p i pokazuje sličnost s repetitivnom sekvencom PIR proteina stanične stijenke kvasca.

Mutirani oblici proteina Scw4p su u stanicama kvasca uspješno eksprimirani, transportirani i vezani u staničnu stijenku te pokazuju očekivane promjene u molekularnoj masi u odnosu na nativni Scw4p protein. Ovime je potvrđeno da se dobiveni konstrukti mogu koristiti za daljnje ispitivanje načina vezanja ovog proteina u stijenku, čime je ispunjen osnovni cilj ovog rada.

7. ZAHVALE

Ovim putem želim najviše zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Renati Teparić na ukazanom povjerenju te pruženoj prilici da sudjelujem u natječaju za dodjelu Rektorove nagrade. Veliko hvala na brojnim savjetima, nesebičnoj pomoći, stalnoj dostupnosti i susretljivosti te neizmjenoj podršci tijekom eksperimentalnog, ali i teorijskog dijela ovoga rada.

Također se zahvaljujem svim zaposlenicima Laboratorija za biokemiju koji su mi bili na raspolaganju tijekom izvođenja rada, a najviše asistentici dipl. ing. Antoniji Grbavac koja je uvijek imala vremena pomoći i odgovoriti na bezbrojna pitanja.

8. POPIS LITERATURE

1. **Aimanianda V, Clavaud C, Simenel C, Fontaine T, Delepierre M, Latgé J** (2009.) Cell Wall β -(1,6)-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **284**: 13401-13412
2. **Bader O, Kraukel Y, Hube B** (2008.) Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiology* **8**:116
3. **Bennett BD, Denis P, Haniu M, Teplow DB, Kahn S, Louis JC, Citron M, Vassar R** (2000.) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's β -secretase. *The journal of biological chemistry*, **275** : 37712–37717
4. **Cappellaro C, Mrša V, Tanner W** (1998.) New Potential Cell Wall Glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Involvement in Mating. *Journal of Bacteriology*, **180** : 5030–5037
5. **Conzelmann A, Riezman H, Desponds C, Bron C** (1988.) A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *The EMBO Journal*, **7** : 2233-2240
6. **De Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T** (1990.) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 491–499
7. **Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, Mrša V, Tanner W** (2006.) Pir Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* Are Attached to β -1,3-Glucan by a New Protein-Carbohydrate Linkage. *The Journal of Biological Chemistry*, **281** : 11523-11529.
8. **Egel-Mitani M, Flygenring HP, Hansen MT** (1990.) A novel aspartyl protease allowing KEX2-independent MF α propheromone processing in yeast. *Yeast*, **6** : 127-37
9. **Fuller RS, Brake A, Thorner J** (1989.) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **86** : 1434-1438
10. **Gagnon-Arsenault I, Tremblay J, Bourbonnais Y** (2006.) Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function, *Federation of European Microbiological Societies*, **6** : 966–978
11. **Germain D, Dumas F, Vernet T, Rourbonnais Y, Thomas DY, Boileau G** (1992.) The pro-region of the Kex2 endoprotease of *Saccharomyces cerevisiae* is removed by self-processing. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **299** : 283–286

12. **Goldman RC, Sullivan PA, Zakula D, Capobianco JO** (1995.) Kinetics of β -1,3 Glucan Interaction at the Donor and Acceptor Sites of the Fungal Glucosyltransferase Encoded by the *BGL2* Gene. *European Journal of Biochemistry*, **227** : 372–378
13. **Heiman MG, 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.
14. **Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S** (2002.) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **26**: 239-256
15. **Lesage G, Bussey H** (2006.) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **70** : 317-43.
16. **Lipke PN, Ovalle R** (1998.) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology.* **180** : 3735-3740.
17. **Mrša V, Seidl T, Gentsch M, Tanner W** (1997.) Specific Labelling of Cell Wall Proteins by Biotinylation. Identification of Four Covalently Linked O-mannosylated Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13** : 1145–1154
18. **Nuoffer C, Jenö P, Conzelmann A, Riezman H** (1991.) Determinants for Glycophospholipid Anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 Protein to the Plasma Membrane. *Molecular and cellular biology*, **11** : 27-37
19. **Olsen V, Cawley NX, Brandt J, Egel-Mitani M, Loh YP** (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.
20. **Olsen V, Cawley NX, Loh YP** (1998.), Yapsin1: Structure, Biosynthesis, and Specificity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **436** : 315-319
21. **Orlean P** (2012.), Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics*, **192** : 775–818
22. **Qadota H, Python CP, Inoue SB, Arisawa M, Anraku Y, Zheng Y, Watanabe T, Levin DE, Ohya Y** (1996.) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272** : 279-81
23. **Roy A, Fen Lu C, Marykwas DL, Lipke PN, Kurjan J** (1991.) The AGA1 Product Is Involved in Cell Surface Attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Adhesion Glycoprotein a-Agglutinin. *Molecular and cellular biology*, **11** : 4196-4206
24. **Sambrook J, Russell DW** (2001.) Molecular cloning: a laboratory manual

25. **Shaw JA, Mol P, Bowers B, Silverman SJ, Valdivieso MH, Durdn A, Cabib E,** (1991.) The Function of Chitin Synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *The Journal of Cell Biology*, **114** : 111-123
26. **Šestak S, Hagen I, Tanner W, Strahl S** (2004.) Scw10p, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology* **150** : 3197–320
27. **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.
28. **Teparić R, Stuparević I, Mrša V** (2010.) Incorporation of Homologous and Heterologous Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Food Technol. Biotechnol.* **48** : 317–328
29. **van den Hazel HB, Kielland-Brandt MC, Winther JC** (1993) The Propeptide Is Required for in Vivo Formation of Stable Active Yeast Proteinase A and Can Function Even When Not Covalently Linked to the Mature Region. *The journal of biological chemistry*, **268** : 18002-18007
30. **Watanabe D, Utsugi T, Minemura M, Hirata A, Abe M, Ohya Y** (2002.) Movement of yeast 1,3- β -glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes to Cells* **7**: 1-9
31. **Wilcox CA, Fuller RS** (1991.) Posttranslational Processing of the Prohormone-cleaving Kex2 Protease in the *Saccharomyces cerevisiae* Secretory Pathway. *The Journal of Cell Biology*, **115** : 297-307

9. SAŽETAK

Lucija Lulić

Uvođenje mutacija u gen *SCW4* s ciljem ispitivanja načina vezanja proteina Scw4p u staničnu stijenku kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je kompleksna struktura koja se sastoji od dva funkcionalno i strukturalno različita sloja. Unutarnji je sloj građen od β -1,3- i β -1,6-glukana te hitina koji osiguravaju mehaničku čvrstoću stanice i osmotsku stabilnost te daju oblik stanici. Vanjski je sloj uglavnom građen od manoproteina čija svojstva još nisu u potpunosti poznata, ali je potvrđeno da određuju površinska svojstva stanica te ograničavaju propusnost stanične stijenke za molekule iz okoline. Također je potvrđeno i da niti jedan od dosad identificiranih i karakteriziranih proteina stanice pojedinačno nije esencijalan za njezin rast i osmotsku stabilnost. Proteini koji čine vanjski sloj stanične stijenke mogu u stijenku biti vezani nekovalentnim interakcijama te se kao takvi iz nje izolirati kuhanjem u otopini SDS-a uz dodatak β -merkaptoetanolu ili kovalentnim interakcijama pa se iz stijenke izoliraju tretmanom s 30mM NaOH ili enzimima glukanzama. Scw4p protein je protein koji se u staničnu stijenku veže i kovalentnim i nekovalentnim interakcijama. U ovom radu su u gen *SCW4* uvedene mutacije. Deletirani su dijelovi gena koji kodiraju za regije koje bi mogle biti zaslužne za njegovo kovalentno povezivanje u staničnu stijenku i to 176 aminokiselinskih ostataka na N-terminalnom kraju proteina te regija duljine 16 aminokiselinskih ostataka u središnjem dijelu proteina koja je po broju i rasporedu glutaminskih ostataka slična repetitivnoj sekvenci Pir4p proteina. Rezultati su pokazali da se mutirani oblici proteina uspješno eksprimiraju, transportiraju i ugrađuju u staničnu stijenku te su vidljive očekivane promjene u molekularnoj masi u odnosu na nativni oblik proteina Scw4p, što znači da se dobiveni konstrukti mogu primjeniti za daljnje ispitivanje načina vezanja Scw4p u stijenku kvasca *S. cerevisiae*.

Ključne riječi: *Saccharomyces cerevisiae*, proteini stanične stijenke, Scw4p, PCR

10. SUMMARY

Lucija Lulić

Introduction of mutations into a gene *SCW4* in order to study the way of binding of the Scw4p protein in the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*

The cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a complex structure that consists of two functionally and structurally distinct layers. The inner layer is composed of β -1,3 and β -1,6-glucans and chitin, which provide mechanical strength, osmotic stability of the cells and define their shape. The outer layer is mainly composed of mannoproteins whose function is not completely understood yet but it is confirmed that they determine the surface properties of cells and limit the bandwidth of the cell wall for an environmental molecules. It has also been proven that none of the previously identified and characterized proteins are individually essential to the growth and osmotic stability of the cell. Proteins from the outer layer can be bonded into the cell wall non-covalently and as such be isolated by boiling in SDS solution with the addition of β -mercaptoethanol. Proteins can also be bonded by covalent interactions and then isolated by treatment with 30 mM NaOH or glucanase enzymes. Additionally, Scw4p protein is a protein that binds covalently and non-covalently into the cell wall. In this study, mutations were introduced into the gene *SCW4*. Parts of gene, which may be responsible for the covalent linking of the cell wall were deleted from the gene *SCW4*. Those parts code for 176 amino acid long region on the N-terminal end of the protein and for 16 amino acid long region in the central sequence of the protein. This part of the gene was deleted because it codes for region that has a similar arrangement and number of glutamine residues to that in the repetitive sequence found in protein Pir4p which is responsible for its covalent binding. The results showed that the mutant forms of the protein are successfully expressed, transported and embedded into the cell wall. The results also showed the expected change in molecular weight when compared to the native form of the protein Scw4p. Thus, resulting constructs can be used for further analysis of binding protein Scw4p into the cell wall of yeast *S. cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall proteins, Scw4p, PCR