# Proteini staničnih stijenki različitih rodova kvasaca i njihov potencijal za izlaganje heterolognih proteina na staničnoj površini

**Lozančić, Mateja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:821458

*Rights / Prava:* Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**

prehrambeno biotehnološki fakultet

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Mateja Lozančić

# PROTEINI STANIČNIH STIJENKI RAZLIČITIH RODOVA KVASACA I NJIHOV POTENCIJAL ZA IZLAGANJE HETEROLOGNIH PROTEINA NA STANIČNOJ POVRŠINI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Mateja Lozančić

# PROTEINI STANIČNIH STIJENKI RAZLIČITIH RODOVA KVASACA I NJIHOV POTENCIJAL ZA IZLAGANJE HETEROLOGNIH PROTEINA NA STANIČNOJ POVRŠINI

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Vladimir Mrša

Zagreb, 2021.

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Mateja Lozančić

# CELL WALL PROTEINS OF YEASTS OF DIFFERENT GENERA AND THEIR POTENTIAL FOR CELL SURFACE DISPLAY OF HETEROLOGOUS PROTEINS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Vladimir Mrša, Full Professor

Zagreb, 2021

Tema doktorskog rada prihvaćena je na redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta održanoj dana 23.11.2020., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 16.03.2021. godine.

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Vladimira Mrše, u okviru znanstveno-istraživačkog projekta 'Molekularni mehanizmi ugradnje homolognih i heterolognih proteina u staničnoj stijenci kvasca i njihova primjena u biotehnologiji' (IP-2014-09-2837).

*Informacije o mentoru:*

Dr. sc. Vladimir Mrša, redoviti profesor u trajnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Ž I V O T O P I S**

Vladimir Mrša rođen je 1957. godine u Zagrebu. Diplomirao je na Biotehnološkom odjelu Tehnološkog fakulteta u Zagrebu 1980.-e godine, a 1984.-e godine doktorirao je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Kao postdoktorand boravio je od 1988. do 1990. na Sveučilištu u Regensburgu kao stipendist DAAD. Od 1980. zaposlen je u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta gdje je 1999. izabran u zvanje redovni profesor. Nastavni rad Vladimira Mrše vezan je uz Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje kao nositelj ili suradnik organizira i izvodi nastavu iz više kolegija. Osim toga prof. dr. sc. Mrša surađuje na postdiplomskim studijima Veterinarskog fakulteta i PMFa. Bio je pokretač i hrvatski koordinator združenog studija Molekularne biotehnologije kojeg Sveučilište u Zagrebu izvodi sa Sveučilištem u Orleansu, u Francuskoj. Također, koordinator je CEEPUS mreže HR-0306 za međunarodnu mobilnost studenata i nastavnika. U svom znanstvenom radu prof. dr. sc. Mrša bavi se biotehnološkim aspektima glikozilacije i sekrecije proteina, kao i strukturom, biosintezom i ulogom glikoproteina stanične stijenke. Autor je 52 znanstvena rada citirana više od 1300 puta prema Scopus, bio je pozvani predavač na više međunarodnih i domaćih skupova, a kao predsjednik ili član organizacijskog ili znanstvenog odbora sudjelovao u organizaciji većeg broja znanstvenih skupova.

Prof. dr. sc. Mrša član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatskog društva za biotehnologiju i Hrvatskog mikrobiološkog društva. Od 1992. do 1997. bio je predsjednik IAESTE-Croatia. Osim toga, prof. dr. sc. Mrša bio je član više senatskih odbora ili povjerenstava Sveučilišta u Zagrebu te član Područnog znanstvenog vijeća za biotehničke znanosti. Od 2003. do 2007. godine bio je dekan, a od 2011. do 2015. prodekan Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Osim toga bio je voditelj radne skupine za visoko obrazovanje u okviru izrade Stretegije obrazovanja, znanosti i tehnologije RH. Glavni je urednik znanstvenog časopisa *Food Technology and Biotechnology*.

# Zahvala

*Ovim putem htjela bih se zahvaliti mentoru, prof. dr. sc. Vladimiru Mrši na ukazanom povjerenju, strpljivosti te svim savjetima i smjernicama kojima mi je pomogao pri izradi ove disertacije. Također, veliko hvala i prof. dr. sc. Renati Teparić na svoj pomoći i podršci koju mi je pružila. Hvala i dr. sc. Kseniji Lopandić na ugodnoj suradnji i srdačnoj potpori koja je značajno doprinjela nastanku ove disertacije.*

*Zahvaljujem se i svim kolegama, trenutnim i bivšim zaposlenicima Laboratorija za biokemiju, na prijateljstvu, podršci i svim zabavnim trenutcima koje ste mi pružili. Posebno hvala dr. sc. Antoniji Grbavac i Ani Novačić, mag. ing. koje su sa mnom proživjele sve uspone i padove tijekom ovog putovanja. Uistinu, hvala svima.*

*Na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji, a posebice majci, na vječnoj i neupitnoj podršci koju sam uvijek od njih bezgranično i bezuvjetno dobivala. Od srca hvala!*

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Sveučilište u Zagrebu** **Doktorski rad**
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**
**Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam**
**UDK: 577.112:579.234:582.282.23(043.3)**
**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

# PROTEINI STANIČNIH STIJENKI RAZLIČITIH RODOVA KVASACA I NJIHOV POTENCIJAL ZA IZLAGANJE HETEROLOGNIH PROTEINA NA STANIČNOJ POVRŠINI

*Mateja Lozančić, mag. ing. biotechn.*

**Rad je izrađen** u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
**Mentor:** prof. dr. sc. Vladimir Mrša

**Kratki sažetak:** Stanična stijenka obavija stanice kvasaca dajući im oblik i zaštitu od nepovoljnih okolišnih uvjeta, a sastoji se od β-glukana, hitina i manoproteina. Ima i biotehnološki potencijal te se tako između ostaloga koristi i za izlaganje proteina od interesa na staničnoj površini. Trenutno razvijeni sustavi izlaganja proteina imaju brojna ograničenja koja je moguće prevladati razvojem novih sustava te pronalaskom novih stanica domaćina takvih sustava. U svrhu traženja novih potencijalnih vrsta kvasaca za korištenje u spomenute svrhe, potrebno je generirati znanje o postojećim proteinima stijenki tih kvasaca. U ovoj studiji provest će se *in silico* analiza proteina koji sudjeluju u izgradnji stijenke ili su u njoj lokalizirani na temelju usporedbe proteoma kvasaca iz različitih rodova s proteomom stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, a analiza će biti nadopunjena usporedbom proteinskih profila stijenki kvasaca. Također, ispitivat će se mogućnost primjene razvijenih sustava za izlaganje proteina za kvasac *S. cerevisiae* u kvascu *Komagataella phaffi*. U konačnici, ispitivat će se način kovalentne ugradnje proteina Scw4 i Scw10 u staničnu stijenku kvasca u svrhu mogućeg korištenja ovih proteina za razvoj novih sustava izlaganja proteina na površini stanica.

**Broj stranica**: 146
**Broj slika**: 19
**Broj tablica**: 14
**Broj literaturnih navoda**: 349
**Jezik izvornika**: hrvatski

**Ključne riječi**: proteom stanične stijenke, proteinski profili stijenke, izlaganje proteina na staničnoj površini, *Komagataella phaffii*, Scw4 i Scw10

**Datum obrane**: 06. svibnja 2021.

**Stručno povjerenstvo za obranu**:
1. Prof.dr.sc. Renata Teparić, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
2. Doc.dr.sc. Igor Stuparević, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
3. Prof.dr.sc Ita Gruić Sovulj, Prirodoslovno-matematički fakultet
4. Prof.dr.sc. Irena Landeka Jurčević, Prehrambeno-biotehnološki fakultet (zamjena)

**Rad je pohranjen u:** Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

**BASIC DOCUMENTATION CAR**

**University of Zagreb** **PhD Thesis**
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**
**Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition**
**UDK: 577.112:579.234:582.282.23(043.3)**
**Scientific Area: Biotechnical Sciences**
**Scientific Field: Biotechnology**

# CELL WALL PROTEINS OF YEASTS OF DIFFERENT GENERA AND THEIR POTENTIAL FOR CELL SURFACE DISPLAY OF HETEROLOGOUS PROTEINS

*Mateja Lozančić, MSc*

**Thesis performed** in Laboratory for Biochemistry, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb
**Supervisor**: PhD Vladimir Mrša, Full Professor

**Short abstract:** Yeast cells are surrounded by a cell wall that determines cell shape and provides protection from stress environmental conditions. It is composed of β-glucan, chitin, and mannoproteins. The cell wall is of biotechnological interest as it can be used for the surface display of proteins of interest. Currently developed surface display systems have many limitations that could be overcome with the development of novel surface display systems and as well with finding new hosts for these systems. To find suitable host yeast strains, knowledge about proteins located in their walls should be generated. To do so, comparative *in silico* analysis of yeast cell wall proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and proteomes of the yeast of different genera will be performed as a part of this thesis and coupled with analysis of cell wall protein profiles. Also, the applicability of surface display systems developed for *S. cerevisiae* for the display of proteins in *Komagataella phaffii* will be tested. Finally, covalent incorporation od *S. cerevisiae* cell wall proteins Scw4 and Scw10 will be analyzed for purpose of applying these proteins in novel surface display system development.

**Number of pages**: 146
**Number of figures**: 19
**Number of tables**: 14
**Number of references**: 349
**Original in**: Croatian

**Keywords**: yeast cell wall proteom; cell wall protein profiles, surface display systems, *Komagataella phaffii*, Scw4 and Scw10

**Date of the Thesis defense**: May 6th, 2021

**Reviewers:**

1. PhD Renata Teparić, Full Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology
2. PhD Igor Stuparević, Assistant Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology
3. PhD Ita Gruić Sovulj, Full Professor, Faculty of Science
4. PhD Irena Landeka Jurčević, Full Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology (substitute)

**Thesis deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23; National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb; University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

**Sažetak:**

Stanična stijenka kvasaca sastoji se od polisaharida, primarno β-1,3-glukana, β-1,6-glukana i hitina, te od manoproteina. Stijenka stanicama daje oblik, čvrstoću, štiti ih od nepovoljnih djelovanja okoliša te omogućava međustanične komunikacije i procese. Proteom stanične stijenke definiramo kao skup proteina koji izravno sudjeluju u izgradnji i remodeliranju stijenke ili su u nju ugrađeni. Najviše istraživanja do danas vršeno je na proteinima stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dok istovremeno postoji malo istraživanja na proteinima stijenke kvasaca iz drugih rodova, izuzev nekolicine vrsta često korištenih u laboratoriju ili klinički izoliranih patogenih kvasaca. Nedostatak informacija o proteinima stijenke drugih kvasaca usporava mogućnost upotrebe tih vrsta za razvoj efikasnih sustava za izlaganje heterolognih proteina od interesa na njihovoj površini. Postojeći sustavi izlaganja proteina na površini stanica razvijeni su uglavnom za kvasac *S. cerevisiae* i sadrže brojna ograničenja poput nepovoljnog utjecaja posttranslacijskih modifikacija koje se odvijaju u stanicama *S. cerevisiae* na konformaciju proteina od interesa ili pak ograničenja količine proteina koju je moguće imobilizirati na staničnu stijenku.

U ovoj studiji, provedena je komparativna *in silico* analiza proteina stijenke različitih vrsta kvasaca na način da su se u proteomima odabranih vrsta tražili ortolozi 93 proteina koji su sastavni dio proteoma stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*. Za analizu odabrani su oni proteini proteoma stijenke za koje je potvrđeno da se nalaze u samoj stijenci, kao i dio proteina koji sudjeluju u njenoj sintezi, primarno u procesima sinteze β-glukana i hitina. Analizom je utvrđena prisutnost ortologa većine analiziranih proteina koji sudjeluju u sintezi komponenti stijenke, ukazujući na evolucijsku očuvanost mehanizama i regulacije sinteze stijenki kroz velik broj rodova kvasaca. Istovremeno, analiza je pokazala i relativno visoku evolucijsku očuvanost proteina koji sudjeluju u remodeliranju stanične stijenke, no ne i proteina koji se u staničnu stijenku ugrađuju preko djelomično procesiranog glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra. Naime, proteini u stijenku mogu biti ugrađeni na tri distinktivna načina, a to su proteini vezani u stijenku nekovalentnim interakcijama, kovalentno vezani preko djelomično procesiranog GPI sidra ili kovalentno vezani na stijenku vezom nestabilnom u lužnatim uvjetima. Iako za sintezu GPI sidra stanica troši znatne količine energije te brojne resurse, proteini vezani preko GPI sidra pokazali su se najmanje evolucijski očuvani od svih analiziranih proteina stijenke, ukazujući potencijalno na njihovu specifičnu ulogu prilagodbe stanice rastu u određenoj okolišnoj niši, odnosno pri određenim uvjetima. Također, zabilježeno je opadanje broja pronađenih ortologa proteina s evolucijskom udaljenošću od kvasca *S.*

*cerevisiae* te najmanji broj ortolognih proteina pronalazimo u kvascima iz roda *Schizosaccharomyces*. Rezultati ove analize upotpunjeni su rezultatima analize proteinskih profila stijenke dobivenih specifičnim obilježavanjem proteina na staničnoj površini i njihovom selektivnom izolacijom, iskorištavajući prirodu veze koju ti proteini uspostavljaju sa stijenkom. Rezultati ove analize uglavnom prate rezultate i zaključke *in silico* analize te zajedno s njima daju informacije o potencijalnom proteinskom sastavu stijenke drugih kvasaca. Dobiveni rezultati obiju analiza pružaju dovoljno informacija za selekciju sojeva koji bi mogli potencijalno poslužiti kao domaćini za sustave izlaganja heterolognih proteina na površini stanice.

Drugi dio studije odnosi se na testiranje mogućnosti upotrebe dvaju prethodno razvijenih sustava za izlaganje proteina na površini kvasca *S. cerevisiae* u svrhu izlaganja proteina na površini kvasca *Komagataella phaffii*. Sustavi se zasnivaju na N-terminalnoj imobilizaciji enzima ksiloza-reduktaza (XR) korištenjem proteina Pir4 iz kvasca *S. cerevisiae* ili na C-terminalnoj imobilizaciji istog enzima korištenjem dijela sekvence proteina Ccw12 koji služi kao signalna sekvenca za vezanje rekombinantnog proteina na GPI sidro. Rezultati analize pokazali su mogućnost ekspresije obaju heterolognih proteina u kvascu *K. phaffii*, međutim do kovalentne ugradnje proteina došlo je samo korištenjem sustava za C-terminalnu imobilizaciju. Niti jedan sustav nije omogućio zadržavanje enzimatske aktivnosti XR.

U konačnici analiziran je način vezanja proteina Scw4 i Scw10 *S. cerevisiae* u stijenku, točnije mehanizam njihove kovalentne ugradnje. Ova dva proteina vežu se na sličan način kao Pir proteini, iako ni Scw4 ni Scw10 ne sadrže veznu sekvencu karakterističnu za Pir proteine. Međutim, analiza je pokazala da je regija proteina Scw4 koja relativno nalikuje veznoj sekvenci Pir proteina uistinu odgovorna za njegovu kovalentnu ugradnju te da se veza ostvaruje preko glutaminskog aminokiselinskog ostatka, što je također zajedničko s Pir proteinima. Za razliku od Scw4, kod Scw10 nije utvrđena povezanost proteolitičkog procesiranja i sposobnosti kovalentnog vezanja u stijenku. Također, pokazano je da se Scw10 procesira barem na dva mjesta pomoću proteaze Kex2 i nekom još neutvrđenom proteazom, potencijalno hidrolazom iz grupe japsinskih proteaza.

**Ključne riječi**: proteom stanične stijenke, proteinski profili stijenke, izlaganje proteina na površini stanice, *Komagataella phaffii*, Scw4 i Scw10

**Summary:**

The yeast cell wall is primarily composed of polysaccharides β-1,3-glucan, β-1,6-glucan, and chitin, as well as mannoproteins. The cell wall determines cell shape and provides support, protects the cell from environmental stress conditions, enables intercellular communication, and takes part in intercellular processes. Cell wall proteome consists of proteins involved in cell wall synthesis and remodeling, and of proteins incorporated in the wall. Most information about cell wall proteins is gathered for the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, but the protein composition of the wall of other yeasts is unknown except for few commonly used laboratory strains and some pathogen yeast species. Lack of information about cell wall proteins of different yeast species slows down the process of finding suitable hosts for the development of surface display systems. Existing surface display systems are developed mostly for *S. cerevisiae* as the host and they have certain limitations such as the negative impact of *S. cerevisiae* posttranslational processes on proper protein folding and limited amount of proteins that can be bound to the cell wall.

As a part of this thesis, comparative *in silico* analysis of the cell wall proteins was performed. Orthologs of 93 *S. cerevisiae* cell wall proteins were searched in proteomes of yeast species of different genera. For this anaylsis, those proteins located in cell wall and some of the proteins involved in proceses of wall biosynthesis, especially synthesis of β-glucan and chitin, were selected. The analysis showed that orthologs of almost all proteins involved in the cell wall synthesis were present in most of yeast species analyzed, confirming evolutionary preservation of cell wall synthesis mechanisms. Also, proteins involved in cell wall remodeling were preserved, but not the proteins bound to the cell wall through partially processed glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. Cell wall proteins form three types of interaction with wall polysaccharides including non-covalent interactions, covalent interactions through GPI anchor, or forming alkali-liable covalent bound. Although cell spends lots of energy and resources on the synthesis of GPI anchor and GPI anchor-bound proteins, this group of cell wall proteins showed to not be evolutionary conserved among different yeast genera. This could indicate that these proteins are involved in the cell adaptation to specific environmental conditions of the most common habitat of certain species. Also, it is noted that the number of orthologs decreases as we move to evolutionary more distant yeasts with having the least number of orthologous proteins in evolutionary distant members of the *Schizosaccharomyces* genus. Results of this analysis are coupled with cell wall protein profiles analysis generated

through specific labeling of cell surface proteins and their selective extraction by taking advantage of characteristics of bonds that proteins form with the wall. Results of this analysis are compared with results of *in silico* analysis and could be used for the prediction of the protein composition of the cell wall of different yeast species. Also, the results of both analyses provide enough information for the selection of novel surface display host candidates.

In the second part of this study, two previously developed surface display systems for N- and C-terminal immobilization of xylose reductase (XR) on the cell surface of *S. cerevisiae* were tested for surface display of XR in *Komagataella phaffii*. N-terminal immobilization is achieved through the genetic fusion of gene *PIR4* coding for cell wall protein and gene *GRE3* coding for XR, while C-terminal immobilization is achieved through the genetic fusion of *GRE3* with part of the gene sequence of *CCW12* coding for the signal sequence that allows binding of a protein to the GPI anchor. Results show that both recombinant proteins were successfully expressed and localized in the cell wall, but only the C-terminal immobilization system provided covalent incorporation of the protein in the cell wall. In both used systems, no enzymatic activity of the XR could have been detected.

Finally, the mechanism of covalent binding of Scw4 and Scw10 proteins of *S. cerevisiae* to the cell wall was analyzed. These two proteins form covalent bound similar to that of Pir proteins, but nor Scw4 neither Scw10 contain Pir binding sequence, so the way of their incorporation in the wall remains unknown. But the results of this study show that a sequence of Scw4 with a certain similarity with Pir biding sequence plays a major role in Scw4 covalent binding. Also, it was shown that unlike with the Scw4, proteolytic processing of Scw10 does not affect its ability for covalent incorporation into the wall. It was also shown that Scw10 is processed at minimally two different sites with two different proteases, one being Kex2 and the other remaining unknown, possibly one of yapsin proteases.

**Key words:** yeast cell wall proteom; cell wall protein profiles, surface display systems, *Komagataella phaffii*, Scw4 and Scw10

**Kazalo**

**1. UVOD ..... 1**

**2. TEORIJSKI DIO ..... 3**

2.1. KVASCI- KARAKTERIZACIJA I KLASIFIKACIJA VRSTA ..... 3

2.2. STANIČNA STIJENKA FUNGA ..... 9

2.3. PROTEOM STANIČNE STIJENKE KVASACA ..... 12

2.3.1. Sinteza β-1,3- i β-1,6-glukana ..... 12

2.3.2. Sinteza hitina ..... 17

2.3.3. Sekretorni put ..... 19

2.3.3.1. *N*-glikozilacija ..... 20

2.3.3.2. O-*glikozilacija* ..... 22

2.3.3.3. Sinteza i vezanje GPI sidra na proteine ..... 22

2.3.4. Proteini stanične stijenke ..... 24

2.3.4.1. Nekovalentno vezani proteini ..... 24

2.3.4.2. Kovalentno vezani proteini stijenke ..... 27

2.4. IZLAGANJE PROTEINA NA POVRŠINI STANICE - BIOTEHNOLOŠKI ZNAČAJ STIJENKE KVASACA ..... 33

**3. MATERIJALI I METODE ..... 37**

3.1. MATERIJALI ..... 37

3.1.1. Kemikalije ..... 37

3.1.2. Otopine i puferi ..... 38

3.1.3. Hranjive podloge ..... 39

3.1.4. Sojevi kvasaca ..... 41

3.1.5. Sojevi bakterija ..... 45

3.1.6. Plazmidi ..... 46

3.1.7. Oligonukleotidi ..... 49

3.1.8. Proteomi kvasaca ..... 51

3.2. METODE ISTRAŽIVANJA ..... 53

3.2.1. Sistematska usporedba proteoma stanične stijenke ..... 53

3.2.2. Uzgoj kvasaca ..... 53

3.2.3. Obilježavanje i izolacija proteina stijenke ..... 53

3.2.4. Elektroforeza i imunoblot ..... 54

3.2.5. Konstrukcija plazmida YEp351(*SCW4*ΔVR2), YEp351(*SCW4*Δ176), YEp351(*SCW4*Δ231) i YEp351(*SCW4*Δ246) ..... 56

3.2.6. Konstrukcija plazmida pBG1805(*SCW4*mutVR1), pBG1805(*SCW4*mutVR2), pBG1805(*SCW4*mutQ1), pBG1805(*SCW4*mutQ2), pBG1805(*SCW4*mutQ3), pBG1805(*SCW4*-QKQ/AKA), pBG1805(*SCW10K*) ..... 58
3.2.7. Konstrukcija plazmida pBSY3ZCcw12XR i pBSY3ZPir4XR ..... 60
3.2.8. Elektroforetsko razdvajanje DNA u agaroznom gelu ..... 61
3.2.9. Transformacija *E. coli* ..... 61
3.2.10. Transformacija kvasca *S. cerevisiae* ..... 61
3.2.11. Transformacija kvasca *K. phaffii* ..... 62
3.2.12. Određivanje aktivnosti ksiloza-reduktaze ..... 62
**4. REZULTATI ..... 63**
4.1. REZULTATI SISTEMSKE USPOREDBE PROTEOMA STIJENKE ..... 63
4.2. REZULTATI ANALIZE PROTEINSKIH PROFILA STIJENKE ..... 69
4.3. REZULTATI RAZVOJA SUSTAVA ZA IZLAGANJE PROTEINA NA POVRŠINU STANICE KVASCA *K. PHAFFII* ..... 79
4.4. REZULTATI ANALIZE VEZANJA I PROTEOLITIČKOG PROCESIRANJA PROTEINA SCW4 I SCW10 ..... 84
**5. RASPRAVA ..... 97**
**6. ZAKLJUČCI ..... 108**
**7. LITERATURNI IZVORI ..... 109**
**8. ŽIVOTOPIS ..... 143**

# 1. UVOD

Stanična stijenka kvasaca izvanstanična je organela koja stanicama pruža oblik, mehaničku stabilnost, štiti stanicu od nepovoljnih okolišnih uvjeta kao što su osmotski i temperaturalni šok, prisustvo kemijskih i antimikrobnih agenasa i ostalih stresora, ali i sudjeluje u međustaničnoj komunikaciji i interakciji stanica s neposrednom okolinom. Građena je od dva sloja pri čemu unutarnji sloj čini polisaharidna osnovica sačinjena primarno od β-1,3-glukana te β-1,6-, α-1,3- ili α-1,4-glukana te hitina. Vanjski sloj stijenke sastavljen je od glikoproteina koji se sastoje od proteinskog i ugljikohidratnog dijela, a u stijenku mogu biti inkorporirani na tri do sada poznata načina: nekovalentnim interakcijama (Scw; en. *Soluble Cell Wall proteins*), kovalentno preko glikozilfosfatidilinozitolnog sidra (GPI proteini) ili kovalentno preko veze nestabilne u lužnatom pH (Pir proteini). Smatra se da se u stijenci nalazi 50 do 60 različitih proteina. Izuzev proteina koji se nalaze u samoj stijenci, u proteom stijenke ubrajaju se još proteini koji sudjeluju u njenoj sintezi, odnosno u procesima sinteze β-glukana i hitina, procesima *N*- i *O*-glikozilacije proteina, sintezi GPI sidra, posttranslacijskim modifikacijama i transportu proteina stijenke te povezanim procesima.

Stanična stijenka ima ulogu u biotehnološkim procesima, a prvenstveno se koristi za izlaganje proteina od interesa na staničnoj površini. Proces se provodi tako da se fuzionira gen od interesa s nekim od gena koji kodiraju za proteine stanične stijenke kvasca te se nastali rekombinanti protein eksprimira u stanicama domaćina. Do sada razvijeni sustavi za izlaganje proteina na površini imaju značajna ograničenja kao što su postsintetske modifikacije proteina, koje mogu uzrokovati zauzimanje nepravilne konformacije što posljedično može dovesti do gubitka njegove funkcije, ili pak relativno malen kapacitet vezanja rekombinantog proteina u stijenku. Kako bi se ove prepreke savladale, potrebno je razviti nove sustave izlaganja proteina na staničnoj površini te pronaći nove stanice domaćine koje bi imale funkcionalne prednosti u odnosu na do sada najčešće korišteni kvasac domaćin - *Saccharomyces cerevisiae*. Kako bismo to mogli, potrebno je steći potrebno znanje o proteinskom sastavu i građi stijenke drugih kvasaca, o čemu u postojećoj literaturi postoji relativno malo podataka.

U svrhu omogućavanja razvoja novih sustava izlaganja proteina na površini kvasaca, u ovoj studiji bit će napravljena analiza proteoma stanične stijenke kvasaca iz različitih rodova usporedbom proteoma stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* s ukupnim proteomima drugih vrsta/rodova kvasaca uz pronalaženje i identificiranje ortologa. Rezultati ove analize usporedit

će se s rezultatima proteinskih profila stanične stijenke dobivenih obilježavanjem proteina na staničnoj površini te njihovom izolacijom baziranoj na iskorištavanju svojstava veze koju proteini uspostavljaju sa staničnom stijenkom. Ova analiza pokazat će brojnost proteina u staničnim stijenkama kvasaca, otkriti njihove potencijalne proteinske sastave te ukazati koji tip proteina bi se mogao iskoristiti za razvoj novog sustava imobilizacije proteina od interesa na površini stanica. Također, dat će bolji uvid u razlike staničnih stijenki različitih kvasaca te potencijalno ukazati na vrste koje bi se mogle iskoristiti kao domaćini za spomenute sustave.

Ispitivat će se i mogućnost upotrebe sustava za izlaganje proteina razvijenih za *S. cerevisiae* u *Komagataella phaffii* ,vrsti koja je prethodno zajedno s *Komagataella pastoris* nazivana *Pichia pastoris,* no danas je poznato da se radi o dvjema odvojenim vrstama. *Pichia pastoris* već je korištena za izlaganje nekolicine proteina na staničnoj površini te je upravo zbog toga iskorištena kao kontrola za provjeru upotrebljivosti sustava izlaganja koji se baziraju na proteinima stijenke *S. cerevisiae*, a koji prethodno nisu korišteni u ovu svrhu kod *P. pastoris.* Ovom analizom pokušava se dobiti odgovor na pitanje zahtjeva li promjena stanica domaćina nužno i razvoj posve novih sustava ekspresije proteina korištenjem proteina stijenke stanica domaćina za vezanje proteina od interesa u stijenku te koja vrsta proteina ima veću mogućnost primjene u ovu svrhu.

Proteini Scw4 i Scw10 produkti su dvaju paralognih gena kvasca *S. cerevisiae* koji se u stijenku mogu vezati na dva načina pri čemu je primarni način vezanja nekovalentnim interakcijama, dok je drugi potencijalno različit od dosad poznatih, s obzirom da se također radi o ostvarivanju veze nestabilne pri lužnatom pH, ali bez vezne sekvence karakterističnog proteinskog slijeda koju sadrže svi proteini Pir porodice. S obzirom da njihov način ugradnje u stijenku nije poznat, pokušat će se pronaći vezna sekvenca te aminokiselinski ostaci važni za formiranje veze. Također, promatrat će se način i utjecaj proteolitičkog procesiranja Scw10 na mogućnost njegove kovalentne ugradnje. Otkriće načina vezanja ovih proteina može dovesti do razvoja novih sustava izlaganja proteina na površini stanice, upotrebom sekvence gena ili dijelova gena koji kodira za Scw4 ili Scw10, a što bi omogućilo vezanje rekombinantog proteina na stijenku.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KVASCI- KARAKTERIZACIJA I KLASIFIKACIJA VRSTA

Kvasci su posebna taksonomska grupa unutar carstva gljiva (*Fungi*). Isprva su kvascima smatrani samo askomicetni fungi koji su mogli provoditi proces fermentacije poput *Saccharomyces cerevisiae*, no kasnije su otkriveni i bazidiomicetni kvasci (Kluyver i van Niel, 1924, 1927; Nyland, 1949; Banno, 1967) pa je stoga i sama definicija kvasca izmijenjena. Iako i danas postoje različita mišljenja o pravilnom definiranju kvasaca, trenutno je opće prihvaćena definicija prema kojoj kao kvasce, bilo askomicetne ili bazidiomicetne, karakteriziramo one funge koji se primarno aseksualno razmnožavaju pupanjem ili binarnom fizijom, a pri spolnom razmnožavanju ne formiraju plodno tijelo (C. Kurtzman i sur., 2011). Ranije, sama klasifikacija kvasaca provođena je određivanjem morfoloških karakteristika kvasca, načinom aseksualnog razmnožavanja, sposobnosti spolnog razmnožavanja te testiranjima mogućnošću parenja novoizoliranog kvasca s prethodno poznatim vrstama. Uvođenjem molekularnih metoda u postupak klasifikacije kvasaca, došlo je do značajne promjene u broju rodova i vrsta kvasca, kao i preraspodjele postojećih vrsta u druge rodove u odnosu na one u koje su prvotno bile svrstavane. Danas nomenklatura kvasaca podliježe skupu pravila *Internacionalnog koda nomenklature za alge, gljive i biljke* (en. *International code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants;* skraćeno Kod/Code). Inačicom Koda iz 2012. ukinuta je dotadašnja praksa da telomorfni (kvasac u fazi spolnog razmnožavanja) te anamorfni (kvasac u fazi nespolnog razmnožavanja) oblik u pravilu imaju zasebna imena rodova. Tek je razvojem molekularnih metoda klasifikacije i razlikovanja vrsta kvasaca omogućeno grupiranje telomorfa i anamorfa u isti takson, odnosno u isti rod. Revizija pravila donešenih Kodom 2012. provela se prilikom Internacionalnog botaničkog kongresa (IBC), unutar Sekcije za nomenklaturu, koji se održao u Shenzhenu, u Kini, u srpnju 2017.-e. Takozvani Šenženski Kod (Turland i sur., 2018) trenutno je važeći te se sukladno njemu mijenja postojeća nomenklatura kvasaca.

Iako se danas prvenstveno koristi identifikacija vrsta kvasaca na temelju molekularnih analiza, morfološka analiza i danas je ponekad u upotrebi, prvenstveno zbog svoje brzine i jednostavnosti, a gotovo obavezno se provodi prilikom izolacije i karakterizacije novootkrivene vrste kvasca. Prvo što se promatra je izgled kolonija koje kvasac čini na podlozi krutog agara. Prema preporukama navedenim u knjizi *The Yeast: A taxonomic study,* u poglavlju koji se fokusira na izolaciju i fenotipsku karakterizaciju kvasca (C. P. Kurtzman i sur., 2011), prilikom karakterizacije kolonija potrebno je promatrati teksturu, boju,

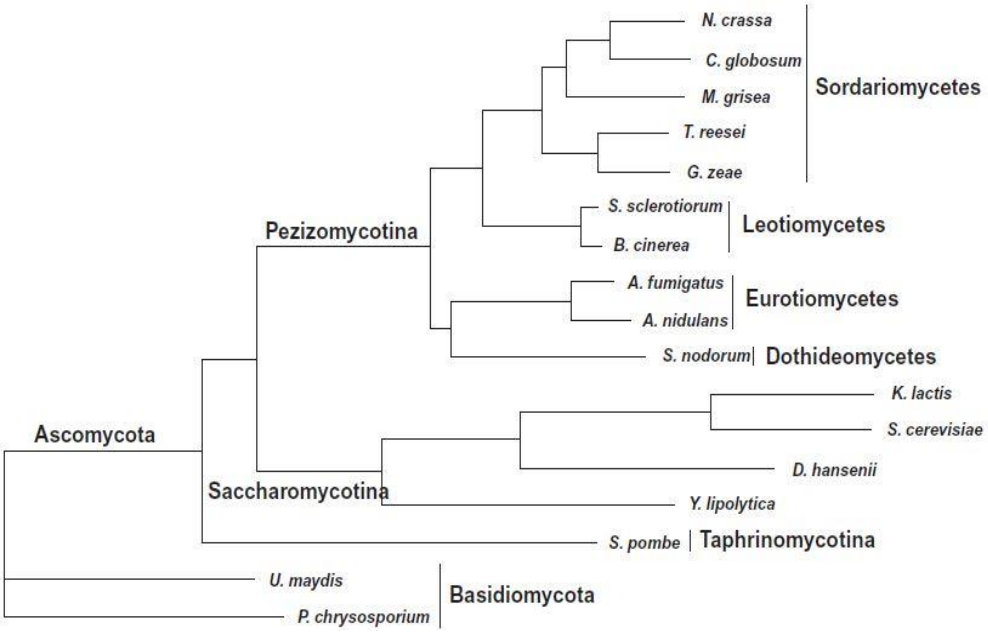
konzistenciju površine, izdignutost i rub kolonija. Za svaku karakteristiku postoje uobičajene kategorije opisa unutar kojih se svrstavaju opisi kolonija koje karakteriziramo. Tako primjerice tekstura kolonija može biti mukoidna, fluidna, viskozna, maslačna, prhka ili opnasta. Boja kolonija kreće se od bijele pa sve do crvene boje. Žute, narančaste i crvene nijanse posljedica su sinteze karotenoidnih i ne-karotenoidnih spojeva koji mogu biti karakteristični za pojedini rod. Površina može biti sjajna ili mat, glatka ili hrapava, kao i naborana, izbrazdana ili čupava. Također, kolonija može biti ravna, izdignuta, spljoštena u sredini, kupolasta ili konična. Sam rub kolonije može biti neprekidan, valovit, izbočen, nepravilan ili resast zbog hifa i pseudohifa. Nakon karakterizacije kolonija, provodi se karakterizacija stanica prilikom aseksulanog razmnožavanja. Prvo se promatra dolazi li do razmnožavanja pupanjem ili binarnom fizijom te dolazi li do formiranja pseudohifa i hifa. Prilikom pupanja, dolazi do formiranja stanice kćeri - pupa, koji raste te se odvaja od stanice majke čija se veličina prilikom diobe u pravilu ne mijenja. Pri tome postoje dva različita načina formiranja pupa, a to su holoblastično i enteroblastično pupanje. Kod holoblastničnog pupanja u formaciji pupa sudjeluju svi slojevi stanične stijenke stanice majke te se pup odvaja od stanice majke formiranjem septuma na uskom spoju ostavljajući ožiljak na stanici majki i na tom mjestu više ne dolazi do pupanja, dok kod enteroblastičnog pupanja dolazi do rupture unutar stijenke stanice majke te do izvijanja unutarnjeg sloja stijenke prema van koja potom formira vanjski sloj stanične stijenke pupa i do odcjepljivanja pupa dolazi formiranjem septuma na širokom spoju kao posljedice formiranja novog pupa koji se izdiže ispod pupa koji se odvaja (C. P. Kurtzman i sur., 2011). Holoblastično pupanje karakteristično je za askomicete, dok je enteroblastično pupanje karakteristično za bazidiomicete. Osim načina formiranja pupa, pri karakterizaciji promatra se i mjesto nastanka pupa pa tako pupanje može biti monopolarno, bipolarno ili multilateralno. Biploarno pupanje karakteristično je za apikalne kvasce poput kvasaca iz roda *Hanseniaspora* (Miller i Phaff, 1958). Pupanje se može razlikovati i prema načinu nastanka novih pupova pa tako imamo razgranato pupanje pri kojem dolazi do formiranja konidifora na čijem se vrhu stvaraju blastokonidije i nastavljaju rast; akropetalno pupanje kod kojeg dolazi do formiranja niza pupova pri čemu je najmlađi pup na vrhu te bazipetalno pupanje kod kojeg također dolazi do formiranja niza pupova pri čemu je na vrhu najstariji pup (Kurtzman i sur., 2011). Kod pojedinih vrsta kvasaca dolazi do formiranja blastokonidija na vrhu izduljene tubularne strukture koja nastaje izduljivanjem konidiofora pri čemu se na vrhu formira pup te se od stanice majke odvaja formiranjem septuma u blizini pupa (rod *Fellomyces*) ili na sredini konidioformne strukture (Kurtzman i sur., 2011). U ranijoj literaturi ovakva forma nazivana je i sterigmatom (Yamada i Banno, 1984), pogrešno povezujući ovu strukturu sa sterigmom koja

se formira prilikom spolnog razmnožavanja i mejoze bazidiomiceta. Kvasci čije se stanice dijele binarnom fizijom formiraju septum koji po širini dijeli stanicu majku na dvije stanice kćeri, artrokonidije, koje se potom izdužuju i ponovno prolaze proces dijeljenja. Stanice kvasaca koje se dijele prethodno opisanim načinima mogu izgledati globularno, subglobularno, elipsoidno, jajoliko, cilindrično, štapičasto, botuliformno, izduljeno, apikalno, šiljasto, polumjesečno ili trokutasto, a izgled stanica može upućivati na način razmnožavanja ili biti specifičan za pojedini rod kvasaca ( Kurtzman i sur., 2011). Pojedine vrste stanica mogu tvoriti hife ili pseudohife pri čemu se nakon stanične diobe, novonastale stanice ne odvajaju nego ostaju pričvršćene i tvore klaster stanica. Prave hife od pseudohifa ponekad je morfološki teško razlikovati, no prave hife tvore septume između stanica te se ne vide jasna udubljenja stanične stijenke između dviju stanica, a terminalne stanice u pravilu su duže od ostalih, dok su kod pseudohifa prisutna uvijanja oko mjesta spajanja stanica, septumi nisu jasno vidljivi te su terminalne stanice kraće ili jednake duljine kao ostale (Wickerham, 1951). Prema spolnom razmnožavanju, kvasce dijelimo na askomicete koje karakterizira formiranje askusa unutar kojeg se nalaze askospore, dok kod bazidiomiceta nastaju teliospore ili bazidij na kojem se eksterno formiraju bazidiospore. Stanice askomiceta u prirodi pronalazimo kao haploide, diploide, ali i poliploide. Pojedine vrste nemaju sposobnost spolnog razmnožavanja ili nikada nisu izolirane u diploidnom obliku. Također, kvasci mogu biti homotalični i heterotalični. Kod homotaličnih kvasaca, haploidni oblici mogu producirati gamete koje se mogu međusobno pariti, dok kod heterotaličnih kvasaca postoje dva tipa haploidnih oblika od kojih svaki producira gamete koje formiraju zigotu samo s gametama drugog haploidnog oblika, odnosno haploidnog oblika koji generira gamete suprotnog tipa parenja. Pojedine vrste kvasaca, kao što su neki kvasci iz roda *Saccharomyces* mogu postojati kao homotalični ili heterotalični sojevi (Oshima i Takano, 1971; Kurtzman i sur., 2011).

Osim morfološke analize, provode se i razni biokemijski testovi koji pomažu pri daljnjoj karakterizaciji kvasaca. Jedan od njih je i sposobnost fermentacije različitih izvora ugljika pri čemu se mjeri količina produciranog $CO_2$ nakon uzgoja kvasca na podlozi s određenim izvorom ugljika. Najčešće se testira mogućnost fermentiranja D-glukoze, D-galaktoze, saharoze, maltoze, laktoze, rafinoze i α-trehaloze, a rjeđe inulina, škroba, melibioze, celobioze i D-ksiloze. Osim fermentacije, bilježi se i mogućnost asimilacije pojedinih izvora ugljika, odnosno sposobnosti rasta kvasca na podlogama s različitim izvorima ugljika pri aerobnim uvjetima. Osim ugljika, na ovaj način moguće je testirati i sposobnost rasta i/ili metaboliziranja i drugih spojeva od interesa. Najčešće se testira mogućnost rasta na različitim izvorima dušika kao i

potreba za prisutnosti vitamina i ostalih faktora rasta u podlozi. Ostali biokemijski testovi koji se mogu provoditi odnose se na detekciju enzimske aktivnosti koja može biti specifična za pojedine rodove kvasaca.

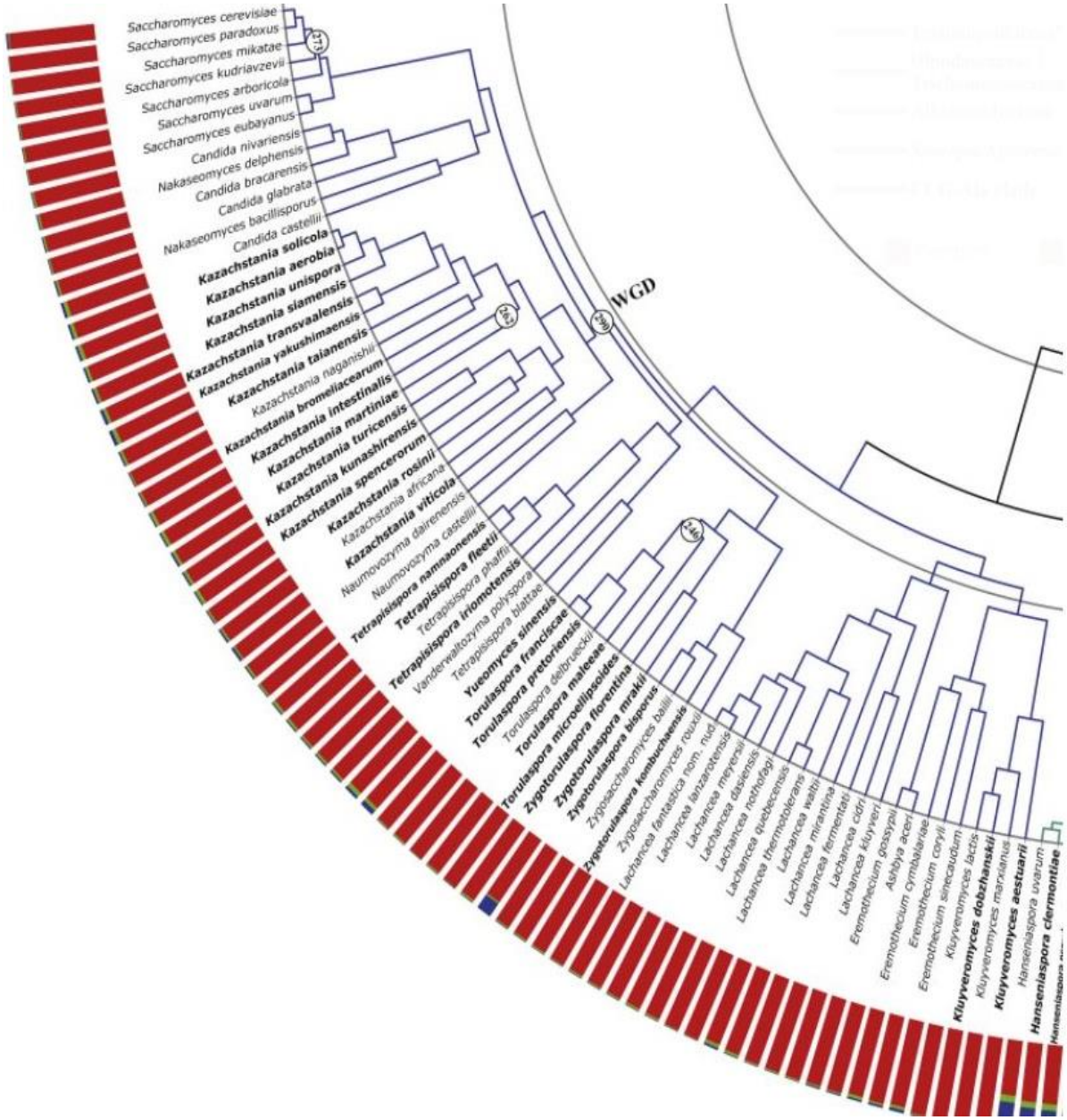
Iako je morfološka i fenotipska karakterizacija kvasaca vrlo informativna, pravu klasifikaciju, kao što je ranije spomenuto, provodimo molekularnim metodama. Prvenstveno se to odnosi na analizu sekvenci odabranih gena. Među prvim sekvencama koje su se analizirale u ovu svrhu koristila se varijabilna domena 2 (D2) velike podjedinice ribosomalne RNA (LSU rRNA), a kasnije su se koristile i domene 1 i 2 (D1/D2) pri čemu je formirana baza podataka za brzu identifikaciju vrsta (Kurtzman i Robnett, 1998; Weiß i Göker, 2011). Otkrićem postojanja di- i trihibridnih sojeva kvasca koji posjeduju čitave genome parentalnih sojeva, a time i čitava ribosomska ponavljanja, prethodno spomenute regije pokazale su se nedovoljno informativnima i nedovoljno korisnima za točnu identifikaciju vrste (Kurtzman i Robnett, 2003). Stoga je iduća primjenjivana metoda uključivala kombinaciju analiza D1/D2 regija s analizom drugih regija, najčešće s ITS (en. *Internal Transcribed Spacers*) regijama rDNA. Izuzev genskih regija vezanih uz rDNA, za razlikovanje i identifikaciju vrsta korišteni su i neki drugi geni koji su se pokazali dovoljno varijabilnima između vrsta kako bi omogućili ovakvu analizu, a primjer takvih gena su gen koji kodira za aktin (Daniel i Meyer, 2003), elongacijski faktor-1α (Kurtzman i sur., 2008) te citokrom-oksidazu II (Belloch i sur., 2000; Kurtzman i Robnett, 2003). Ipak, zabilježeni su i slučajevi gdje rezolucije analize korištenjem ovih gena nisu omogućile razlikovanje srodnih vrsta. Kombinacijom regija rDNA i konstitutivno eksprimiranih gena (tzv. *housekeeping genes*) moguće je dobiti veću rezoluciju u identifikaciji vrsta. Međutim, ograničavanje na tek nekoliko gena iz metaboličkog puta ne obuhvaća svu evolucijsku raznolikost kvasaca te i dalje ne pruža zadovoljavajući nivo rezolucije analize (Kurtzman i sur., 2011). Stoga danas velike klasifikacijske studije koriste pristup analize i usporedbe velikog broja gena pa i na razini čitavog genoma. Primjer rezultata studije koja je obuhvatila velik broj gena i vrsta kvasaca vidljiv je na **Slici 1.**, a gdje je prikazano filogenetsko stablo 17 ispitivanih vrsta kvasaca.




**Slika 1.** Filogenetsko stablo *Ascomycota* dobiveno na temelju analize 781 gena iz 17 vrsta (preuzeto iz Robbertse i sur., 2006; C. Kurtzman i sur., 2011).

Ovakve studije dugotrajne su i iznimno zahtjevne te ponekad zbog generiranja pogrešaka prilikom sekvenciranja, nije moguće ukloniti sustavne pogreške te se akumuliraju lažno pozitivni rezultati (Phillips i sur., 2004; Delsuc, Brinkmann i Philippe, 2005; Fitzpatrick i sur., 2006; Jeffroy i sur., 2006). Također bilo je potrebno razviti alate i pristupe koji bi uopće omogućili ovakvu analizu usporedbom velikog broja genoma. Metoda koja se razvila iz ovakvog pristupa je metoda generiranja superstabala. Ova analiza podrazumijeva korištenje filogenetskih stabala dobivenih analizom s obzirom na pojedinačne gene te potom formiranje jednog ili više filogenetskih super stabala koji jasno prikazuju veze između svih taksonomskih grupa prisutnih u unesenim podacima (Kurtzman i sur., 2011). Na ovaj način se može dobiti jasna vizualizacija grananja između pojedinih taksonomskih grupa. Na sličan način provodi se i najnovija klasifikacija kvasaca obuhvaćenih projektom Y1000+ (https://y1000plus.wei.wisc.edu/). Ovaj projekt ima za cilj sekvencirati i analizirati genome svih poznatih vrsta kvasaca iz podkoljena *Saccharomycotina* kako bi se proučila evolucija, metabolička raznolikost i ekološka uloga ovih kvasaca. Prema publikaciji proizašloj iz ovog projekta (Shen i sur., 2018), moguće je bilo analizirati evolucijske odnose 332 pupajuća kvasca na temelju podataka dobivenih formiranjem matrice koja je obuhvaćala 1,757 gena odabranih na temelju računalne analize kvalitete sekvenci u svim korištenim genomima. Istom studijom, analiza je provođena i na način da su korišteni 2,012,514 gena prisutna u svih 332 kvasca i 11

taksonomskih grupa izvan podkoljena *Saccharomycotina*. Dio rezultata koji obuhvaćaju filogenetsko stablo *Saccharomycetaceae* prikazan je na **Slici 2.**




**Slika 2.** Izdvojeni prikaz filogenetskog stabla *Saccharomycetaceae* iz vremenski kalibrirane filogenije podkoljena pupajućih kvasaca (preuzeto i modificirano iz Shen i sur., 2018)

Na temelju dobivenih podataka, datirane su vremenske točke divergencije pojednih grupa i vrsta kvasaca. Studija je također pokazala da je metabolička raznolikost kvasaca posljedica ponavljajućih i ekstenzivnih gubitaka metaboličkih odlika kao posljedica gubitka genetičkog materijala. Već je ranije bilo poznato da su morfološke i/ili fiziološke razlike među vrstama kvasaca posljedica dobitka ili gubitka gena, a najveći broj ovih događaja povezan je s velikim evolucijskim događajem: duplikacijom cijelog genoma (WGD; en. *Whole Genome Duplication*) koji se odvio tijekom evolucije jedne od klada *Saccharomycotina* što je rezultiralo povećanjem broja gena s 5000 na 10,000, nakon čega je slijedio brzi gubitak jedne od kopija gena. Tako danas *Saccharomyces cerevisiae* ima približno 5500 gena od čega su 1102 gena članovi 551 dupliciranog genskog para (Byrne i Wolfe, 2005). Istovremeno s gubitkom gena nakon WGD, događala se i divergencija vrsta što otežava identifikaciju vrsta unutar *Saccharomycotina*, a zabilježeno je i da u slučajevima kada su obje kopije gena ostale prisutne, jedna kopija je evoluirala brže od druge (Byrne i Wolfe, 2005; Scannell i Wolfe, 2008) što također može rezultirati krivim filogenetskim kategorizacijama.

## 2.2. STANIČNA STIJENKA FUNGA

Staničnom stijenkom nazivamo izvanstaničnu strukturu koja u potpunosti obavija stanice organizama iz carstava bakterija, arheja, gljiva, kromista te biljaka. Stanične stijenke kod različitih organizama znatno se razlikuju u građi i sastavu, no funkcionalna uloga uglavnom je ista. Stanična stijenka daje stabilnost i oblik stanici, štiti samu stanicu od nepovoljnih okolišnih uvjeta kao što su nagle promjene osmotskog tlaka, pH i temperature, kao i od djelovanja drugih štetnih fizikalnih, kemijskih i bioloških djelovanja. Istovremeno, stanična stijenka neposredno dijeli stanicu od njenog okoliša pa ujedno sudjeluje u njenoj komunikaciji s okolinom. Sudjeluje u različitim staničnim signalnim putovima, a o njenoj važnosti govori i činjenica da značajno narušavanje integriteta stanične stijenke aktivira nekoliko signalnih puteva u stanici koji u konačnici mogu dovesti i do stanične smrti i lize stanica. Kod jednostaničnih organizama, stanična stijenka sudjeluje i u procesima međusobne adhezije stanica.

Iako bismo mogli reći da je primarna uloga stanične stijenke obrambena, to nikako ne znači da se radi o krutoj, nefleksibilnoj strukturi. Štoviše, stanična stijenka mora biti vrlo prilagodljiva i do njene značajne promjene dolazi prilikom raznih staničnih procesa, a do najdramatičnijih promjena stijenke dolazi prilikom diobe stanica. Stanična stijenka mora omogućiti rast stanice kao i njenu diobu, pri čemu dolazi do rearanžmana postojećih građevnih jedinica stijenke kao i sinteze novih. S obzirom da se radi o vrlo složenim procesima, nije čudno da su kod pojedinih

organizama produkti stotina gena na neki način uključeni u biogenezu i remodeliranje stanične stijenke.

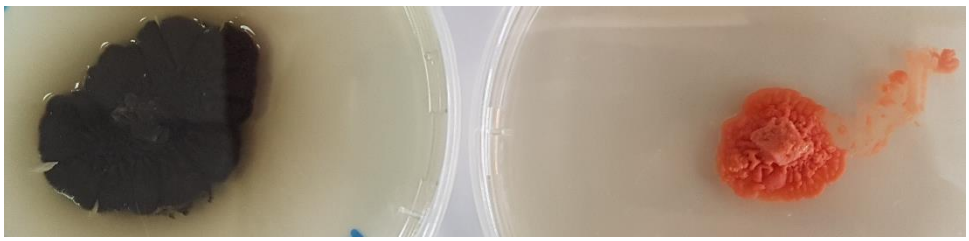
Iako se po svom sastavu, kao što je već i ranije spomenuto, stanične stijenke različitih skupina organizama razlikuju, ipak je zajedničko da osnovnu strukturu stijenki velike većine organizama čine polisaharidi. Kod organizama iz carstva gljiva (*Fungi*), polisaharidi čine čak i do 80% masenog udjela u suhoj tvari stijenke (Ruiz-Herrera, 1991). Najčešći polisaharidi u sastavu fungalne stanične stijenke su glukani. Među glukanima, 65% do 90% sastava čini β-1,3-glukan, iako kod različitih vrsta pronalazimo i druge glukane kao što su β-1,6-, mješani β-1,3-/ β-1,4-, α-1,3- te α-1,4-glukan (Bernard i Latgé, 2001; Klis, Groot i Hellingwerf, 2001; Grün i sur., 2005). Drugi vrlo važan polimer koji se nalazi u fungalnoj staničnoj stijenci je hitin. Hitin kod kvasaca čini oko 2% udjela u masi suhe tvari stijenke (Klis, 1994; Klis i sur., 2001), dok se kod pojedinih vrsta filamentoznih funga taj udio kreće i do 20% (Bartnicki-Garcia, 1968; de Nobel i sur.. Hitin, linearni polimer *N*-acetilglukozamina, i kod kvasaca i kod filamentoznih funga formira hitinske fibrile koji nastaju međusobnim povezivanjem sintetiziranih lanaca hitina vodikovim vezama (Bowman i Free, 2006). Tako formirani fibrili imaju vrlo visoku vlačnu čvrstoću što dodatno učvršćuje strukturu stanične stjenke. Proces sinteze hitina intenzivan je na mjestima sinteze i značajnog remodeliranja stanične stjenke, primjerice u području nastanka pupa kod pupajućih kvasaca, a u prilog njegovoj važnosti govori i činjenica da disrupcija sinteze hitina uzrokuje deformaciju stijenke i gubitak osmotske stabilnosti stanice (Bago i sur., 1996; Specht i sur., 1996). Uz glukane i hitin, treću najzastupljeniju skupinu polisaharida u staničnoj stijenci čini manan, odnosno polimer monosaharidnih jedinica, najčešće manoza, koji čine sastavni dio glikoproteina. Kod pojedinih vrsta funga, u analizi sastava stanične stijenke pronađene su i druge heksoze i pentoze, koje pak mogu tvoriti različite homo- i heteropolisaharide (Ruiz-Herrera, 1991). Među najčešće detektiranim polimerima iz te skupine pronalazimo različite poliuronide, kao što je primjerice mukoran, heteropolimer sačinjen od D-glukuronične kiseline, D-manoze i L-fukoze u omjeru 5:3:2, a koji je izoliran iz stanične stijenke *Mucor ruoxii* (Bartnicki-Garcia i Lindberg, 1972), a slični polimeri kasnije su izolirani i iz drugih funga (Brown i Lindberg, 1967; Wang i Bartnicki-Garcia, 1970; Ruiz-Herrera, 1991).

Glikoproteini čine i do 50% udjela u suhoj tvari stanične stijenke kvasaca (Brown i Catley, 1992; Bowman i Free, 2006), a nešto su u manjem postotku zastupljeni u staničnoj stijenci filamentoznih funga. Većina proteina stanične stijenke prolazi sekretorni put pri čemu dolazi do njihove *O*- i *N*-glikozilacije. Pri procesu glikozilacije, na određene aminokiselinske ostatke u sastavu proteina dodaju se ugljikohidratni polimeri *N*- ili *O*-glikozidnom vezom. Kod kvasca *S. cerevisiae* govorimo o mananskim polimerima, dok se kod drugih funga mogu pronaći i drugi polimeri poput galaktomanana ili galaktana (Gander, 1974). Osim ugljikohidratnog i proteinskog dijela, određeni glikoproteini sadrže i glikozil-fosfatidilinozitolno (GPI) sidro koje sudjeluje u kovalentnoj interakciji glikoproteina s ostalim komponentama stanične stijenke i omogućava time njihovu integraciju u stijenku. Osim kovalentnim interakcijama, glikoproteini s ostalim komponentama stanične stijenke mogu biti povezani i nekovalentnim interakcijama. Osim strukturne uloge, glikoproteini stanične stijenke sudjeluju u međusobnoj interakciji stanica, interakciji stanica s okolišem, sudjeluju u procesima flokulacije i aglutinacije, sudjeluju u prijenosu signala kao reakcije na vanjske podražaje, posreduju u procesu apsorpcije molekula te sudjeluju u procesu sinteze i remodeliranja stanične stijenke (Ruiz-Herrera, 1991; Bowman i Free, 2006).

Lipidi čine 1 do 10% udjela u suhoj tvari stanične stijenke funga, iako kod nekih filamentoznih funga taj udio može biti i veći od 20% (Ruiz-Herrera, 1991). U stijenkama različitih funga detektirana je prisutnost triglicerida, sterola, fosfolipida i glikosfingolipida (Suomalainen i Nurminen, 1970; Ruiz-Herrera, 1991), no valja naglasiti da neke od rezultata prisutnih u literaturi treba uzeti s rezervom obzirom na mogućnost kontaminacije uzorka stanične stijenke ostacima staničnih membrana. Sama uloga lipida u staničnoj stijenci nedovoljno je jasna, no postoje pretpostavke da doprinose hidrofilnom/hidrofobnom karakteru stanične stijenke (Suomalainen i Nurminen, 1970; Ruiz-Herrera, 1991), no i pretpostavke da sudjeluju u povezivanju stanične stijenke i stanične membrane (Suomalainen i Nurminen, 1970).

Pojedini fungi u sastavu stanične stijenke sadrže i pigmente. Najzastupljeniji pigment prisutan u fungalnoj staničnoj stijenci je melanin kojeg pronalazimo kod predstavnika i aksomiceta i bazidiomiceta, a igra značajnu ulogu u zaštiti stanice od UV zračenja, ultrazvučnog zračenja, isušivanja i temperaturalnih ekstrema (Bell i Wheeler, 1986). Osim toga, melanin i melaninu slični pigmenti štite stanice od lize inhibirajući djelovanja celulaza, glukanaza i hitinaza konkurentnih mikroorganizama i viših organizama. Povezanost razine melanina u staničnoj stijenci kvasca i otpornosti na štetna djelovanja spomenutih enzima iz okoline dokazana su više

puta (Potgieter i Alexander, 1966; Bloomfield i Alexander, 1967; Kuo i Alexander, 1967; Hurst i Wagner, 1969; Bull, 1970; Luther i Lipke, 1980). Posebnu skupinu zanimljivih funga koji sintetiziraju pigmente čine takozvani „crni kvasci“, a koji spadaju u skupinu askomiceta koji imaju i hifalnu i kvaščastu morfologiju, te u jednoj fazi životnog ciklusa rastu kao pupajuće stanice (Tafer i sur., 2015). Neki od sojeva i vrsta iz roda *Exophiala* izolirani su iz Atacama pustinje, a pokazuju otpornost na UV-C, UV-B i okolišno UV zračenje, kapacitet da rastu u umjereno slanom mediju (0.75-2.25 mol/L NaCl-a) i umjerenim do hladnim temperaturama (Pulschen i sur., 2015), a sintetiziraju brojne spojeve koji im omogućavaju preživljavanje stresnih uvjeta, uključujući prvenstveno karotenoide (ß-karoten, ζ-karoten, fitoen, torularhodin i torulen) (Gorbushina i sur., 2008). Primjer izgleda i rasta crnih kvasaca na agaroznim pločama vidljiv je na **Slici 3.**



**Slika 3.** Kolonije „crnih“ kvasaca na YM pločama- *Knufia chersonesos black* i *Knufia chersonesos rosa*

## 2.3. PROTEOM STANIČNE STIJENKE KVASACA

Proteom stanične stijenke kvasca obuhvaća velik raspon gena, počevši od onih koji imaju ulogu u sintezi prekursora stijenke te same polisaharidne osnovice stijenke pa sve do proteina koji su lokalizirani u samoj stijenci. Do sada je utvđeno da čak 1200 gena kvasca *S. cerevisiae* na neki način utječu na stijenku (de Groot i sur., 2001). Ipak proteomom se može smatrati manji broj gena s direktim utjecajem na stijenku te se njihov broj kreće između 180 i 200 gena (Orlean, 2012). U daljnjem tekstu bit će pobliže opisane skupine proteina podijeljene prema njihovoj ulozi ili lokalizaciji, a koje se smatraju dijelom proteoma stijenke.

### 2.3.1. Sinteza β-1,3- i β-1,6-glukana

Glukani su, kao što i njihovo ime ukazuje, polimeri glukoze međusobno povezane α- ili β-glikozidnom vezom. β-glukan netopljiv je u vodi i većini otapala, kristalizira te može tvoriti mikrofibrile koje nastaju povezivanjem više lanaca glukana vodikovim vezama (Ruiz-Herrera i Ortiz-Castellanos, 2019). Na temelju njihove strukture, β-glukane možemo podijeliti u sedam

različitih klasa kao što je opisao Ruiz-Herrera (Ruiz-Herrera, 1991): a) β-1,3- nerazgranati glukani, b) β-1,3-glukani s mjestimičnim β-1,6-grananjem koje čine pojedinačne jedinice glukoze, c) glukani s β-1,3- i β-1,4- motivima, d) glukani koji sadrže β-1,3-, β-1,4- i β-1,6-motive, e) β-1,3- fosforilirani glukani, f) β-1,3-glukani sa značajnim β-1,6-grananjima i g) glukani koji su uglavnom sačinjeni od glukoznih jedinica povezanim β-1,6-glikozidnom vezom. Primjeri polimera koje pronalazimo u staničnoj stijenci kvasaca su laminarin, linearni β-1,3-polimer glukoze kojeg pronalazimo kod većine funga te pustulan, β-1,6-polimer koji je djelomično topljiv u vodi te koji je kod *Lasallia pustulata* pronađen u djelomično acetiliranom obliku (Pereyra i sur., 2003; Ruiz-Herrera i Ortiz-Castellanos, 2019). Autori Synytsya i Novák (2013) predložili su u svom radu drugačiju podjelu glukana prema kojoj prvu grupu (a) čine linearni β-D-glukani podijeljeni u dvije podgrupe - jednu koju sačinjavaju glukani s istim tipom glikozidne veze i drugu koju čine linearni glukani s mješovitim tipom glikozidnih veza. Drugu grupu (b) čine razgranati β-glukani, a podijeljena je na tri podgrupe od čega prvu čine razgranati β-1,3-glukani, drugu razgranati β-1,6-glukani, a treću razgranati glukani s mješovitim tipom glikozidnih veza. Treću grupu (c) čine glukani koji sadrže i β- i α- tip glikozidne veze, a podijeljena je u dvije podgrupe od koji prvu čine linearni, a drugu razgranati polimeri. Svaka od podgrupa podijeljena je na dodatne podgrupe ovisno o dominantom tipu veze koji prevladava u polimeru te tipu veze koji čini grananja.

Unatoč prisustnosti velikog broja različitih tipova glukana u različitim vrstama kvasaca, u većini tih vrsta najzastupljeniji je β-1,3-glukan koji čini ukupno 65-90% svih glukana stanične stijenke (Bowman i Free, 2006), odnosno 90% ukupne mase glukana, te gradi unutarnji sloj stijenke koji osigurava njen oblik i čvrstoću (Klis i sur., 2002). Njegovu strukturu prvi su opisali Kreger i Kopecká (Kreger i Kopecká, 1976; Kopecká i Kreger, 1986) promatranjem mikrofibrila sintetiziranih u protoplastima prilikom regeneracije stanične stijenke, pri čemu su izmjerili da su nastali mikrofibrili bili približno 4 μm dugi te promjera oko 20 nm. Isti autori potvrdili su i ranije pretpostavke kako se linearni fungalni β-1,3-glukani strukturno sastoje od tri molekule polisaharida međusobno povezane vodikovim vezama (trostruka uzvojnica), a isto je kasnije potvrdila i analiza struktura brojnih fungalnih razgranatih β-1,3-glukana, uz iznimku lentinana koji tvori uzvojnicu sačinjenu od samo jednog polimernog lanca (Kopecká i Kreger, 1986; Saitô i sur., 1987; Williams i sur., 1991; Stokke i sur., 1993). Prisustvo linearnih, nerazgranatih lanaca β-1,3-glukana ipak je rijetko u stanicama, što pokazuje niz studija, te se sinteza nerazgranatih lanaca odvija pri specifičnim uvjetima ili u pojedinim mutantnim

sojevima (Manners i sur., 1973; Larriba i sur., 1981; Kopecká i Kreger, 1986; Fonseca-García i sur., 2011).

Sintezu β-1,3-glukana kod funga kataliziraju β-1,3-glukan-sintaze za koje je pokazano da koriste UDP-glukozu kao donor šećera. Ostale poznate karakteristike ovih enzima su da imaju visok Km za supstrat, da se *in vitro* ne aktiviraju kontroliranom proteolizom, ovisno o sustavu regulacije mogu biti aktivirane dvovalentnim kationima, imaju pH optimum u neutralnom pH području te temperaturni optimum pri temperaturama približnima sobnoj temperaturi (Ruiz-Herrera i Ortiz-Castellanos, 2019). Poznato je da su kod kvasca *S. cerevisiae* glukan-sintaze sastavni dio kompleksa (KGS) koji se sastoji do najvjerojatnije dviju podjedinica od kojih jedna ima regulatornu, a druga katalitičku ulogu (Kang i Cabib, 1986; Mol i sur., 1994). Kvasac *S. cerevisiae* sadrži tri gena koji kodiraju za enzime koji imaju katalitičku aktivnost β-1,3-glukan-sintaze, a to su *FKS1*, *FKS2* i *FKS3*. Samo ime FKS nije povezano s funkcijom gena, nego je ime posljedica opažanja da mutanti u ovim genima pokazuju hiperosjetljivost na imunosupresivni agens FK506 (Parent i sur., 1993; Eng i sur., 1994). Produkt gena *FKS1* pokazao se kao glavni odgovorni za sintezu β-1,3-glukana, s obzirom da je delecija ovog gena rezultirala u 75%-tnom smanjenju količine β-1,3-glukana u stijenci, dok delecija gena *FKS2* nije rezultirala značajnim fenotipom (Inoue i sur., 1995; Mazur i sur., 1995). Ipak, delecija obaju gena bila je letalna, iako pojedinačne delecije nisu (Mazur i sur., 1995), što pak dovodi do zaključka kako ovi geni imaju djelomično preklapajuće uloge. Regulacija ekspresije ovih gena također se razlikuje s obzirom da je vrhunac ekspresije gena *FKS1* u kasnoj G1 i ranoj S fazi rasta, dok je *FKS2* eksprimiran uglavnom pri rastu u medijima sa siromašnim izvorima ugljika poput acetata i glicerola, a ekspresiju je moguće i potaknuti tretmanom kalcijevim ionima ili α-faktorom te delecijom gena koji uzrokuju defekt u sintezi polimera stijenke kao i uvjetima temperaturnog šoka (Mazur i sur., 1995; Zhao i sur., 1998; Lesage i Bussey, 2006). Delecija *FKS2* također ima značajan utjecaj na defekt u sporulaciji, a delecijom gena *FKS3* također dolazi do problema u nastajanju spora jer se u tom slučaju bilježi njihov aberantni fenotip što pak dovodi do zaključka da *FKS2* i *FKS3* imaju ulogu u formiranju stijenke spora iako se njihova uloga ne preklapa (Mazur i sur., 1995; Ishihara i sur., 2007). Delecija *FKS1* nije pokazala utjecaj na fenotip spora, a druga studija pokazala je kako Fks1 i Fks2 ne stupaju u interakcije s Fks3 (Lesage i sur., 2004). Regulatornu podjedinicu KGS čini Rho1 GTPaza uključena u remodeliranje aktina u citoskeletu, formiranju septe, rastu pupa, organizaciji stanične stijenke, ali i u putu MAP-kinaze te signalnom putu integriteta stanične stijenke (Qadota i sur., 1996; Madden i Snyder, 1998; Drgonová i sur., 1999). Dokaze da je upravo

Rho1 zaslužan u regulaciji aktivnosti KGS, pronađeni su nakon što je potvrđeno da se Rho1 i Fks1 mogu kopreciptirati, unosom termolabilne mutacije u *RHO1*, aktivnost Fks1 postaje ovisna o temperaturi, a inaktivacijom Rho1 putem ADP ribozilacije nestane β-1,3-glukanazne aktivnosti u stijenci pri *in vitro* eksperimentu (Drgonova i sur., 1996; Mazur i Baginsky, 1996; Qadota i sur., 1996).

Prethodne studije pokazale su prisustvo homologa gena *FKS* i *RHO* kvasca roda *Saccharomyces* u većini vrsta funga izuzev pripadnika *Microsporidia*. I dok *Saccharomyces* sadrži, kao što je prethodno rečeno, tri *FKS* gena, velik broj kvasaca sadrži samo jednog homologa pri čemu je onda taj gen esencijalan (Thompson i sur., 1999; Ha, Covert i Momany, 2006; Riquelme, 2013). S druge strane, neki kvasci imaju više gena homolognih *FKS* genima pa tako *Schizosaccharomyces pombe* sadrži četiri gena, od kojih jedan nije uključen u rast stanice nego formiranje septuma, drugi je uključen u sintezu stanične stijenke askospore, a preostala dva u sintezu apikalne stijenke (Liu i sur., 1999, 2000; Ruiz-Herrera i Ortiz-Castellanos, 2019).

Sinteza β-1,6-glukana nije dobro razjašnjen proces i točna uloga mnogih proteina uključenih u njega nije odgonetnuta. Metoda kojom se došlo do proteina i gena uključenih u ovaj proces obuhvaćala je izlaganje niza sojeva s delecijama pojedinačnih gena djelovanju *S. cerevisiae* „killer“ proteina K1 koji se veže na β-1,6-glukan. Sojevi s manjom količinom β-1,6-glukana sukladno tomu manje su osjetljivi na djelovanje proteina K1. Na ovaj način identificirano je 10 gena ključnih u sintezi β-1,6-glukana, a to su *KRE1, KRE5, ROT2/GLS2, CNE1, KRE6, SKN1, KNH1, KRE9, KRE11* i *CWH4/GLS1* (Bussey, 1991). U drugim studijama utvrđena je uključenost i *BIG1* gena u sintezu β-1,6-glukana (Lesage i Bussey, 2006), a ukupno je više od 20 gena na neki način povezano sa sintezom β-1,6-glukana, najviše iz *KRE* skupine, u stanicama kvasaca *S. cerevisiae, Candida albicans* i *Candida galbrata* (Mio i sur., 1997; Lussier i sur., 1998; Nagahashi i sur., 1998; Shahinian i Bussey, 2000; Herrero i sur., 2004). *In silico* analiza vrsta iz skupine *Basidiomycota* pokazala je prisustvo homologa *KRE1, KRE9, KRE11* i *CNE1*, dok su kod vrsta iz skupina *Zygomygota i Chitridimycota* pronađeni samo ortolozi *KRE6* i *SKN1* (Ruiz-Herrera i Ortiz-Castellanos, 2010). Kod većine ispitivanih kvasaca, kao ključni geni za sintezu β-1,6-glukana pokazali su se geni *KRE5* i *KRE9* čija disrupcija uzrokuje 80%-100%-tno smanjenje količine β-1,6-glukana u stijenci (Meaden i sur., 1990; Brown i Bussey, 1993; Roemer i sur., 1994). Protein Kre5 lokaliziran je u endoplazmatskom retikulumu te ima značajnu sličnost s UDP-glukoza glikotransferazom

(Fernandez i sur., 1996) i visoko očuvanu sekvencu C-terminalnog dijela koja odgovara mjestu vezanja UDP-glukoze (Shahinian i Bussey, 2000; Herrero i sur., 2004). Delecija gena *KRE5* uzrokuje najniže koncentracije β-1,6-glukana u stijenci te je zbog svega navedenog jedna od prvih pretpostavki bila da je *KRE5* katalitička podjedinica β-1,6-glukan-sintaze, međutim prisustvo β-1,6-glukana u staničnoj stijenci soja *C. albicans* s delecijom obaju kopija gena *KRE5* (Herrero i sur., 2004) ukazalo je da tomu ipak nije tako. Prisustvo β-1,6-glukana detektirano je i u sojevima s delecijom gena *KRE6* (Roemer i Bussey, 1991), pa za sada kao naizgledniji kandidat za katalitičku podjedinicu β-1,6-glukan-sintaze preostaje Kre9 (Aimanianda i sur., 2009). U prilog tomu govori i činjenica da se Kre9 najvjerojatnije izlučuje izvan stanice ili je lociran u stijenci (Brown i Bussey, 1993), a dvostruka delecija gena *KRE9* i njegovog funkcionalnog homologa *KNH1* rezultira letalnošću kod *C. galbrate* i *S. cerevisiae* (Dijkgraaf i sur., 1996; Nagahashi i sur., 1998). Također, studija iz 2017. pokazuje da spore nastale iz mutantnih sojeva s defektom u *KRE1, KRE9* i *BIG1,* ali ne i u *KRE6,* pokazuju promjene u strukturi što se manifestira kao preosjetljivost na eter (Pan i sur., 2017). Delecija gena *KRE1* koji kodira za protein lociran u citoplazmatskoj membrani i/ili u stijenci pak rezultira fenotipom kod kojeg je prisutni β-1,6-glukan znatno manji i njegova β-1,3 grananja su znatno skraćena (Boone i sur., 1990; Roemer i Bussey, 1995). Uloga ostalih proteina okarakteriziranih kao važnih u sintezi β-1,6-glukana još je manje jasna. Primjerice Cwh41 je ER glukozidaza I, a Rot2 ER glukozidaza II te nije jasno zašto mutacije u genima *CWH41/GLS1* i *ROT2/GLS2* uzrokuju smanjenje količine β-1,6-glukana u stijenci (Shahinian i sur., 1998). Nedostatak funkcionalnog Cne1 pak uzrokuje smanjenje sadržaja β-1,6-glukana u stijenci do 30% (Shahinian i sur., 1998), no uzrok tomu također nije poznat. *CNE1* je prvi puta identificiran u potrazi za homologom kalneksina iz *S. pombe* koji je odgovoran za zadržavanje pogrešno smotanih proteina stijenke u ER, međutim heterologna ekspresija tog homologa u *S. cerevisiae* nije utjecala na revertiranje fenotipa u *cne1* mutantu, pa se stoga prava uloga Cne1 ne zna (Shahinian i sur., 1998).

### 2.3.2. Sinteza hitina

Sinteza hitina u stanici odvija se na način da se na rastući linearni polimer β-1,4-N-acetilglukozamina dodaje N-acetilglukozamin (GlcNAc) na njegovom nereducirajućem kraju, a kao donor GlcNAc koristi se UDP-N-acetilglukozamin. Istovremeno sa sintezom lanca, dolazi do sekrecije hitina do stanične stijenke kroz niz transmembranskih domena hitin-sintaze. Po dolasku u staničnu stijenku, hitin se može vezati na druge molekule hitina vodikovom vezom ili može biti deacetiliran djelovanjem hitin-deacetilaze pri čemu nastaje hitozan (Ruiz-Herrera i sur., 2006). Veže se i na nereducirajuće krajeve β-1,3-glukana, a djelovanjem Crh1 i Crh2 dolazi i do vezanja hitina na ogranke β-1,6-glukana (Cabib i sur., 2008). U kvascu *S. cerevisiae* detektirana su tri proteina s hitin sintaznom aktivnošću: hitin-sintaza 1 (Chs1), hitin-sintaza 2 (Chs2) te hitin-sintaza 3 (Chs3). Chs1 sintetizira se u metabolički neaktivnoj formi te je potrebna njegova proteolitička aktivacija što je dokazano i *in vivo* (Duran i Cabib, 1978; Kang i sur., 1984; Orlean, 1987) i *in vitro* (Sburlati i Cabib, 1986; Orlean, 1987) eksperimentima. Unatoč takvoj regulaciji, Chs1 ne pridonosi značajno količini sintetiziranog hitina, čak niti nakon uklanjanja Chs2 i Chs3 (Shaw i sur., 1991), a delecija gena *CHS1* povremeno rezultira lizom pupa, fenotipom koji je ublažen ukoliko se deletira i gen *CTS1* koji kodira za hitinazu (Cabib i sur., 1989). To potencijalno ukazuje da Chs1 možda ima ulogu u sintezi hitina nakon prekomjernog djelovanja hitinaze Cst1, no uloga nije sa sigurnošću potvrđena (Cabib i sur., 1989; Orlean, 2012). Tijekom logaritamskog i stacionarnog rasta stanica, razina aktivnog Chs1 neznatno se mijenja (Orlean, 1987), kao i prilikom stanične diobe (Ziman i sur., 1996), dok se pojačana razina transkripcije i aktivnosti bilježi nakon izlaganja stanica faktorima parenja, iako je navedena aktivnost detektirana tek *in vitro* i to nakon tretmana tripsinom (Schekman i Brawley, 1979; Orlean, 1987; Appeltauer i Achstetter, 1989) te Chs1 ne pridonosi feromon induciranoj sintezi hitina (Orlean, 1987).

Hitin-sintaza 2 (Chs2), sudjeluje u sintezi tek 5% staničnog hitina i može se detektirati samo u rastućim stanicama te uz stimulacijum tripsinom (Sburlati i Cabib, 1986; Orlean, 2012). Za razliku od Chs1, Chs2 pokazuje značajnu razinu aktivnosti bez prethodnog proteolitičkog tretmana što može ukazivati da se Chs2 sintetizira kao aktivan enzim (Uchida i sur., 1996; Oh i sur., 2012). Najviša razina ekspresije *CHS2* povezana je sa sintezom primarnog septuma i doseže vrh u $G_2$/M fazi (Pammer i sur., 1992; Choi, Santos, i sur., 1994; Chuang i Schekman, 1996) nakon čega razina Chs2 u stanici naglo opada. Sinteza Chs2 u ER te njegova kasnija translokacija na mjesto spajanja stanice kćeri i stanice majke povezana je s aktivnošću još niza

enzima uključujući mitotičke kinaze Sic1 i Cdk1 (Zhang i sur., 2006; Teh i sur., 2009), fosfatazu Cdc14 (Chin i sur., 2012), kinazu mitotičkog izlaza Dbf2 (Oh i sur., 2012) te dvaju proteina Inn1 i Cyk3 lokaliziranih u vratu pupa (Nishihama i sur., 2009; Meitinger i sur., 2010; Oh i sur., 2012).

Hitin-sintaza 3 (Chs3) odgovorna je za sintezu više od 90% hitina u stanici prilikom njenog vegetativnog rasta u nestresnim uvjetima te ne treba proteolitičko procesiranje kako bi prešla u aktivnu formu (Orlean, 1987). Razina ekspresije *CHS3* ostaje konstanta tijekom staničnog ciklusa (Choi, Santos, i sur., 1994; Chuang i Schekman, 1996). Međutim, iako Chs3 spada u skupinu transferaza, njena funkcija ovisi o vrlo reguliranom transportu Chs3 od ER do stanične membrane s koje se potom uklanja i pakira u intracelularne vezikule koje nazivamo hitosomima, a iz kojih se opet može ponovno prebaciti na staničnu membranu (Orlean, 2012). U sam proces uključen je niz proteina koji na direktan ili indirektan način utječu na aktivnost Chs3, a neki od njih su Chs4 koji djeluje kao aktivator Chs3 (Choi i sur., 1994; Trilla i sur., 1997), Pfa4 koji vrši palmitoilaciju Chs3 (Lam i sur., 2006; Montoro i sur., 2011) i Chs7 koji je zajedno s Pfa4 potreban za izlazak Chs3 iz ER (Trilla i sur., 1999; Lam i sur., 2006), proteini membrane Rcr1 i Yea4 čiji se način utjecaja na Chs3 ne zna (Orlean, 2012), proteini koji sudjeluju u transportu Chs3 između membrane i hitosoma Chs5, Chs6 i njegovi homolozi Bch1, Bch2 i Bud7 (Santos i sur., 1997; Santos i Snyder, 1997; Ziman i sur., 1998; Sanchatjate i Schekman, 2006; Trautwein i sur., 2006; Wang i sur., 2006) te Bni4 koji sudjeluje u pravilnoj lokalizaciji Chs3 na plazmatskoj membrani i posljedično pravilnoj depoziciji hitina (DeMarini i sur., 1997; Kozubowski i sur., 2003; Sanz i sur., 2004).

Kod drugih funga, pronađeni su homolozi hitin-sintaza, pa tako *C. albicans* ima četiri (Munro i sur., 2003), *Aspergillus fumigatus* sedam (Mellado i sur., 2003), *Cryptococcus neoformans* osam (Banks i sur., 2005; Klutts i sur., 2006), *Neurospora crassa* sedam (Borkovich i sur., 2004), a *S. pombe* dva (Matsuo i sur., 2004), od kojih je jedan neaktivan (Martín-García i sur., 2003). Slično kao i kod *S. cerevisiae*, kod većine funga jedna do dvije hitin-sintaze su odgovorne za sintezu većine hitina, dok ostale sintetiziraju znatno manje (Beth-Din i Yarden, 2000; Munro i sur., 2001; Mellado i sur., 2003) što potencijalno ukazuje na to da različite hitin-sintaze imaju funkciju u različitim fazama životnog ciklusa (Free, 2013).

### 2.3.3. Sekretorni put

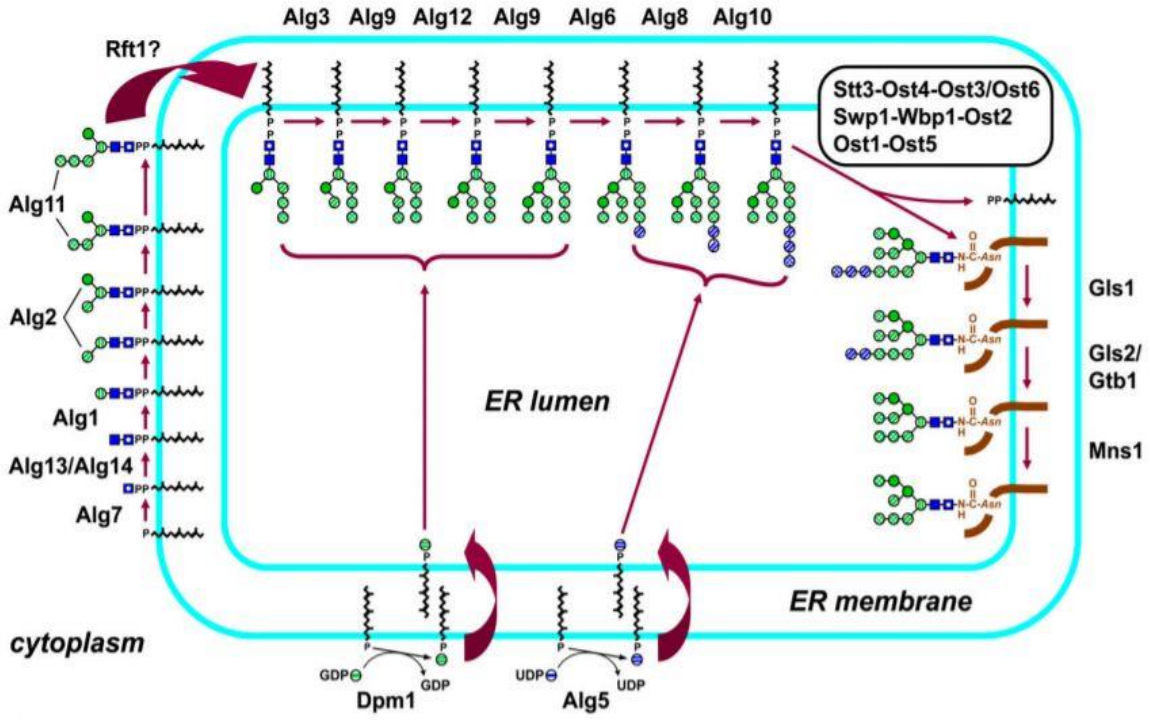
Proteini lokalizirani u stijenci moraju se transportirati izvan stanice što se provodi složenim procesom kojeg nazivamo sekretorni put. Proteini se u sekretorni put usmjeravaju za vrijeme translacije (ribosomski vezano) ili nakon translacije (ne-ribosomski vezano), ovisno o hidrofobnosti već sintetizirane signalne sekvence (Zimmermann i sur., 2011), počevši s prvim korakom sekretornog puta što je prolazak kroz ER membranu. Signalna sekvenca obično je dugačka između 15 i 30 aminokiselina (Briggs i Gierasch, 1984), a započinje bazičnim dijelom na kojeg se nastavlja hidrofoban dio te završava polarnijom regijom (von Heijne, 1986a; b). Hidrofobni dio signalne sekvence kod kvasca *S. cerevisiae* određuje interakciju sa SRP (en. *Signal Recognition Particle*) (Ng i sur., 1996), dok kod primjerice kvasca *Yarrowia lipolytica* potencijalno veću ulogu igra sama konformacija i sastav signalne sekvence (Yaver i sur., 1992). Sam SRP sastoji se od 6 proteina (Srp14, Srp21, Srp54, Srp68, Srp72 i Sec65) te 7S RNA (SCR1) (Siegel i Walter, 1988; Brown i sur., 1994). Protein vezan preko signalne sekvence na SRP potom se usmjerava na jedan od dva tipa translokona, Sec61 i Ssh1, pri čemu se Sec61 sastoji od tri podjedinice (Sec61, Sbh1 i Sss1; (Osborne i sur., 2005)), kao i Ssh1, no uloga i funkcija Ssh1 je nepoznata i uglavnom neistraživana (Delic i sur., 2013). Mutacija neke od podjedinica SRP-a nije dovela do smrti stanice kod kvasca *S. cerevisiae* (Brown i sur., 1994), no jest kod kvasaca *Y. lipolytica* i *S. pombe* (Brennwald i sur., 1988; He i sur., 1990). Kod ne-kotranslacijskog prijelaza proteina u staničnu membranu, poznato je sedam proteina koji sudjeluju pri tomu, a to su Sec61, Sbh1, Sss1, Sec62, Sec63, Sec71 i Sec72 (Delic i sur., 2013). Po ulasku proteina u ER, signalna peptidaza odcjepljuje signalnu sekvencu s polipeptidnog lanca (Blobel i Dobberstein, 1975; Strauss i sur., 1979; Kreil i sur., 1980; Julius i sur., 1983), a ostatak lanca stupa u interakciju s brojnim šaperonima koji omogućavaju njegovo pravilno smatanje. Prilikom ovih procesa, događaju se i druge posttranslacijske modifikacije proteina, uključujući *O*- i *N*-glikozilaciju te vezanje na GPI sidro. Proteini se u Golgi potom transportiraju putom COPII (en. *Coat Protein*) vezikula pri čemu važnu ulogu igraju Sec16 i Sec12 (Montegna i sur., 2012) koji omogućuju interakciju s prvim proteinom COPII kompleksa, malom GTPazom Sar1 pri čemu dolazi do otpuštanja GDP-a i vezanja GTP-a na nju. Time se omogućuje njena interakcija s heterodimerom Sec23/Sec24 koji veže protein u transportu te djeluje kao aktivator Sar1 (Barlowe i sur., 1993; Barlowe i sur., 1994). Potom čitav kompleks stupa u interakciju s heterotetramernim kompleksom Sec13/Sec31 koji formira sloj omotača vezikule (Stagg i sur., 2006). Sa Sec23 proteinom kompleksa u interakciju stupa TRAPPI (en. *TRAnsport Protein Particle I*) kompleks koji usmjerava COPII vezikule ka *cis*-

Golgi membrani, a vezanje vezikule na membranu omogućuju proteini iz Rab porodice. Fuziju membrana vezikule i Golgija omogućavaju komponente iz SNARE (en. *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor*) njihovim dovođenjem na vrlo malu udaljenost pod utjecajem interakcije s prethodno formiranim kompleksom.

2.3.3.1. *N*-glikozilacija

*N*-glikozilacija kod kvasca *S. cerevisiae* katalizirana je uglavnom enzimima iz Alg i Mnn skupina. Proces započinje sintezom oligosaharidnog prekursora na nosaču, tj. molekuli doli kol-fosfata s koje se prenosi na određeni asparaginski aminokiselinski ostatak proteina, najčešće onaj koji se nalazi unutar sekvence Asn-Xxx-Ser/Thr gdje je Xxx bilo koja aminokiselina osim prolina (Roitsch i Lehle, 1989; Burda i Aebi, 1999; Helenius i Aebi, 2004; Lehle i sur., 2006; Larkin i Imperiali, 2011). Sinteza prekursora odvija se u koracima tako da se prvo na molekulu dolikol-fosfata veže N-acetilglukozamin (GlcNAc) koji u reakciju ulazi u obliku UDP-GlcNAc, a reakciju katalizira Alg7 GlcNAc-fosfotransferaza (Sharma i sur., 1982; Barnes i sur., 1984). Potom u reakciju s dolikol-P-P-GlcNAc ulazi nova molekula UDP-GlcNAc pri čemu nova molekula GlcNAc veže na prethodnu β-1,4-glikozidnom vezom u reakciji koju kazalizira heterodimerni Alg13/Alg14 kompleks (Bickel i sur., 2005; Chantret i sur., 2005; Gao i sur., 2005). Zatim se redom na rastući lanac prekursora veže manoza β-1,4-glikozidnom vezom što kazalizira Alg1 (Couto i sur., 1984), a potom molekula manoze α-1,3- te druga molekula manoze α-1,6-glikozidnom vezom što pak katalizira Alg2 (O'Reilly i sur., 2006; Kämpf i sur., 2009). Nakon toga, vežu se još dvije molekule manoze α-1,2-glikozidnom vezom, a reakcije katalizira Alg11 (Cipollo i sur., 2001; O'Reilly i sur., 2006; Absmanner i sur., 2010). Sinteza ovakvog prekursora odvija se s citosolnu stranu membrane ER, a daljnje reakcije odvijat će se u njegovom lumenu nakon što dođe do preokretanja formiranog kompleksa do sada neutvrđenim načinom (Burda i Aebi, 1999; Helenius i Aebi, 2004). Potom se u lumenu na dosad sintetizirani prekursor dodaju još četiri molekule glukoze u reakcijama kataliziranim redom: Alg3, Alg9, Alg12, Alg9 (Aebi i sur., 1996; Burda i sur., 1999; Cipollo i sur., 2001; Frank i Aebi, 2005). U konačnici se dodaju još tri molekule glukoze u reakcijama kataliziranim pomoću Alg6, Alg8 i Alg10 (Stagljar i sur., 1994; Reiss i sur., 1996; Burda i Aebi, 1999). Ovako sintetizirani prekursor unutarnjeg lanca [$GlcNAc_2$-$Man_9$-$Glc_3$] prenosi se na pobočni ogranak asparagina pomoću oligosaharid transferaznog kompleksa (OST) koji se sastoji od Stt3, Ost1, Ost2, Wbp1, Swp1, Ost4, Ost5 i jednog od paraloga Ost3 ili Ost6, od čega je prvih 5 esencijalno (Karaoglu i sur., 1997; Reiss i sur., 1997; Knauer i Lehle, 1999; Orlean, 2012). Nakon vezanja prekursora na protein dolazi do uklanjanja vezanih glukoza pomoću

Gls1/Cwh41 te heterodimera Gls2/Rot2-Gtb1 (Trombetta i sur., 1996; Romero i sur., 1997; Wilkinson i sur., 2006), a potom i do uklanjanja jedne molekule manoze manozidazom Mns1 (Herscovics, 1999). U ovom koraku uključuje se i sustav kontrole kvalitete smatanja proteina pa se tako pravilno smotani proteini upućuju dalje prema Golgiju, a nepravilno smotani proteini bivaju prepoznati i ciljani od strane ER povezanog protein degradacijskog sustava (ERAD) (Helenius i Aebi, 2004) koji provodi njihovu razgradnju. Shematski prikaz procesa N-glikozilacije prikazan je na **Slici 4.**




**Slika 4.** Prikaz sinteze prekursora unutarnjeg dijela lanca *N*-glikana i njegov prijednos na odgovarajući asparagin u proteinu (preuzeto iz Orlean, 2012).

U *cis*-Golgi-u nastavljaju se reakcije *N*-glikozilacije pravilno smotanih proteina na način da se na unutarnji lanac prvo dodaje jedna molekula manoze koja ostvaruje α-1,6-glikozidnu vezu s manozom unutarnjeg lanca, a reakciju prijenosa katalizira manozil-transferaza Och1 (Nakayama i sur., 1997). Potom se nastavlja dodavanje manoznih jedinica reakcijama koje kataliziraju dva manozil transferazna kompleksa: Man-Pol I koji se sastoji od homologa Mnn9 i Van1 te Man-Pol II koji se sastoji od Mnn9, Anp1, Hoc1, Mnn10 i Mnn11 (Hashimoto i Yoda, 1997; Jungmann i Munro, 1998; Jungmann i sur., 1999). Grananja u mananskoj osnovici katalizirana su α-1,2-manozil-transferazama Mnn2 i Mnn5 (Rayner i Munro, 1998), a grananjima pridonose još pet članova Ktr1 potporodice: Kre2/Mnt1, Yur1, Ktr1, Ktr2 i Ktr3

(Lussier i sur., 1996, 1997; Lussier i sur., 1999). Konačni broj manoznih jedinica u *N*-mananu može iznositi i do 150-200 manoza. Čitav proces sinteze manana u Golgiju razlikuje se u različitim kvascima, pa tako primjerice *S. pombe* nema detektirane homologe *MNN2* i *MNN5* pa ne čudi da taj kvasac u *N*-glikanskim lancima ne sadrži α-1,2-manozu nego α-1,2-galaktozu (Delic i sur., 2013). Također, kod kvasaca *S.pombe* i *C. albicans* kao homolog *HOC1* identificirana je njihova verzija gena *OCH1* (Delic i sur., 2013). Također, kvasac *S. cerevisiae* na kraj *N*-manana može dodati manozil fosfat u reakciji koju katalizira Mnn6/Ktr6 (Wang i sur., 1997), a čiji niti jedan jasan homolog nije identificiran u drugim kvascima iako homolog njegovog regulatora Mnn4 jest, osim kod *S. pombe* (Delic i sur., 2013). Na tom tragu su i otkrića da *S. cerevisiae* i *C. albicans* sadrže, a *S. pombe* i *Kluyveromyces lactis* ne sadrže fosforilirane glikane (Gemmill i Trimble, 1999; Jigami i Odani, 1999). Valja primjetiti da *P. pastoris*, *Y. lipolytica* i *S. pombe* ne sadrže homologe gena koji kodiraju za proteine iz Mnn1 porodice, (Delic i sur., 2013), zadužene za tzv. kapiranje i *O*- i *N*- mananskih lanaca, što je i u skladu s pronalaskom da navedene vrste ne sadrže α-1,3-manozilne veze (Goto, 2007), a za koje se zna da su imunogene (Ballou, 1990).

#### 2.3.3.2. O-*glikozilacija*

Proces *O*-glikozilacije, kao i kod *N*-glikozilacije, započinje u ER. U prvoj reakciji, jedinica manoze prenosi se sa donora dolikol-P-manoze na neki od sterički dostupnih serina ili treonina, a cijeli proces kataliziraju manozil-transferaze. Kod kvasca *S. cerevisiae* detektirano je čak sedam manozil-transferaza koje mogu sudjelovati u ovom procesu, Pmt1-7, od kojih mnogi čine homo- i heterodimere, pa tako primjerice nastaju Pmt1-Pmt2 i Pmt5-Pmt3 dimeri, dok Pmt4 čini homodimere (Strahl-Bolsinger i Scheinost, 1999; Strahl-Bolsinger i sur., 1999; Girrbach i Strahl, 2003). Proces *O*-glikozilacije nastavlja se u Golgiju gdje se prvo dodaju dvije manoze reakcijama koje kataliziraju α-1,2-manozil-transferaze (Kre2/Mnt1, Ktr1 i Ktr3) te potom još dvije manozne jedinice reakcijama koje kataliziraju α-1,3-manozil-transferaze (Mnt1, Mnt2 i Mnt3) (Lussier i sur., 1997; Romero i sur., 1999).

#### 2.3.3.3. Sinteza i vezanje GPI sidra na proteine

GPI sidra kod kvasca *S. cerevisiae* imaju osnovnu strukturu protein-CO-$NH_2$-$CH_2$-$CH_2$-$PO_4$-6-Man-α-1,2-Man-α-1,6-Man-α-1,4-GlcN-α-1,6-mioinozitol fosfolipid. Sekvenca koja služi kao signalna za vezanje proteina na GPI sidro obično se sastoji od poteza od desetak polarnih aminokiselina koje služe kao fleksibilna povezujuća regija, potom aminokiselinskog ostatka preko kojeg se protein veže na GPI sidro, a kojeg označavamo s ω i najčešće se radi o

glicinskim, alaninskim, serinskim, asparaginskim, apartatnim ili cisteinskim ostacima, dva aminokiselinska ostatka - najčešće glicin, aspartat i/ili serin, regijom od najmanje 3 do 10 umjereno polarnih aminokiselinskih ostataka te potezom hidrofobnih aminokiselina različite duljine (Udenfriend i Kodukula, 1995; Eisenhaber, Bork i Eisenhaber, 1998; Eisenhaber i sur., 2003, 2004; de Groot i sur., 2007; Orlean i Menon, 2007).

Sama sinteza GPI sidra vrlo je kompleksan i energetski vrlo zahtjevan proces koji uključuje preko 20 proteina, a započinje prebacivanjem GlcNAc s UDP-GlcNAc na fosfatidilinozitol vezan na membranu ER što katalizira kompleks sastavljen od Gpi1, Gpi2, Gpi3, Gpi15, Gpi19 i Eri1, a kao negativni regulator ovog kompleksa služi protein Ras2 (Sobering i sur., 2004). U idućim koracima prvo dolazi do deacetilacije GlcNAc u reakciji koju katalizira Gpi12 (Vidugiriene i Menon, 1993), a potom se prekursor translocira s citoplazmatske strane membrane ER u lumen nerazjašnjenim mehanizmom. Nakon toga, u lumenu ER dolazi do acilacije inozitola u reakciji koju najvjerojatnije katalizira acil-transferaza Gwt1, a delecija gena koji za nju kodira letalna je za stanicu (Tsukahara i sur., 2003). Potom se dodaje molekula manoze formiranjem α-1,4-glikozidne veze u procesu kataliziranom s Gpi14 te uz sudjelovanje Arv1 i Pbn1 (Maeda i sur., 2001; Ashida i sur., 2005; Kajiwara i sur., 2008), a nakon toga dolazi do vezanja još jedne molekule manoze α-1,6-glikozidnom vezom čiji nastanak katalizira Gpi18 uz prisustvo Pga1 (Fabre i sur., 2005; Sato i sur., 2007). Prije dodatka idućih jedinica manoze, na prvu manoznu jedinicu dodaje se molekula etanolamina u reakciji koju katalizira Mcd4, što pak prepoznaje Smp3 koji je u kompleksu s Gpi10, zaduženim za dodatak treće i četvrte jedinice manoze (Grimme i sur., 2001). Nakon ovih reakcija, na strukturu se vežu još dvije molekule etanolamina u reakcijama koje kataliziraju Gpi7 i Gpi13, uz sudjelovanje Gpi11. Ovako formirano sidro prebacuje se na protein u nizu reakcija u kojem sudjeluju Gaa1, Gab1, Gpi16, Gpi17 i Gpi18 (Hamburger, Egerton i Riezman, 1995; Benghezal i sur., 1996; Ohishi i sur., 2000; Ohishi i sur., 2001; Grimme i sur., 2004) uz odcjepljivanje hidrofobne regije proteina na njegovom C-terminalnom dijelu. Neposredno nakon prebacivanja GPI na protein dolazi do remodeliranja GPI sidra pri čemu se odcjepljuje njegov inozitol-acilni dio u procesu kataliziranom pomoću Bst1 (Tanaka i sur., 2004) i Per1. U daljnjim koracima dolazi do transfera GPI-vezanog proteina u Golgi gdje GPI sidro podliježe daljnjim modifikacijama.

### 2.3.4. Proteini stanične stijenke

Proteini locirani u staničnoj stijenci imaju različite uloge, od sudjelovanja u remodeliranju i sintezi stijenke pa sve do sudjelovanja u međustaničnim procesima poput flokulacije i aglutinacije. Međutim, za mnoge proteine u stijenci fiziološka uloga nije poznata. Proteini na staničnu stijenku kvasca mogu biti vezani na tri do sada otkrivena načina od kojih prvi podrazumijeva nekovalentno vezanje, a druga dva načina vezanja podrazumijevaju formiranje kovalentne veze. Detekciju proteina u stijenci omogućila je uspostava metode specifičnog obilježavanja proteina na staničnoj površini korištenjem Sulfo-NHS-LC-LC-biotinskog reagensa koji se veže na primarne aminogrupe u proteinu, što uključuje aminogrupe pobočnih ogranaka lizina te α-aminoterminalnu grupu proteina, a negativni naboj sulfosukcinimidilne grupe onemogućava prolazak reagensa kroz staničnu membranu i time onemogućava obilježavanje intracelularnih proteina. Prilikom reakcije između biotinskog reagensa i proteina dolazi do formiranja amidne veze uz izdvajanje N-hidroksisulfosukcinimida. Biotinska grupa na slobodnom kraju reagensa omogućava detekciju ovako obilježenih proteina različitim avidinskim kompleksima. Kombinacijom ovakvog načina obilježavanja proteina stijenke i selektivne izolacije proteina koji iskorištava prirodu veze koju proteini sa stijenkom ostvaruju, dobivene su informacije o broj prisutnih proteina u stijenci, a uz pomoć sekvenciranja proteina, provedena je i njihova identifikacija (Mrša i sur., 1997). Ipak, ovom metodom nije moguće detektirati sve proteine stijenke s obzirom da su različiti proteini eksprimirani pri različitim uvjetima kao i u različitim fazama staničnog ciklusa. Ovom metodom detektirano je 20 proteinskih vrpci dok je pretpostavka da se ukupni broj proteina stijenke kreće između 50 i 60.

#### 2.3.4.1. Nekovalentno vezani proteini

Nekovalentno vezani proteini čine glavninu od ukupnog broja proteina stijenke, a nazivamo ih i Scw proteinima kao akronimom engleskog naziva ***S**oluble **C**ell **W**all Proteins*. Ova skupina proteina uglavnom je *O*-glikozilirana i ne sudjeluje značajno u ukupnoj količini manana stijenke. Izolacija ovih proteina provodi se tretmanom vrućim SDS-om (natrij dodecil sulfatom) pri reducirajućim uvjetima što dovodi do pucanja nekovalentnih interakcija i njihovog oslobađanja. Još jedan način njihove izolacije je i prekonoćna inkubacija stijenki u 2 mM otopini ditiotreitola (DTT-a), iako je efikasnost ovog postupka lošija u odnosu na prethodno opisani način (Cappellaro i sur., 1998). Točan mehanizam vezanja uglavnom nije poznat iako se smatra da se radi o nespecifičnim interakcijama s β-1,3-glukanom. Popis do sada poznatih nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke nalazi se u **Tablici 1**.

**Tablica 1.** Popis do sada poznatih nekovalentno vezanih proteina stijenke kvasca *S. cerevisiae*

| PROTEIN | FIZIOLOŠKA ULOGA |
|---|---|
| **Bgl2 (Scw9)** | Endo- ili trans-glukozidaza |
| **Cts1 (Scw2)** | Endohitinaza |
| **Dse4 (Eng1)** | Glukanaza |
| **Exg1 (Scw6, Bgl1)** | Egzo-β-1,3-glukanaza |
| **Scw10** | Potencijalna glukanaza |
| **Scw11** | Potencijalna glukanaza |
| **Scw4** | Potencijalna glukanaza |
| **Sun4 (Scw3)** | Sudjeluje u septaciji |
| **Knh1** | Sudjeluje u sintezi β-1,6-glukana |
| **Kre9** | Sudjeluje u sintezi β-1,6-glukana |

Bgl2 prvotno je okarakteriziran kao egzo-β-1,3-glukanaza zbog sličnosti s biljnim glukanazama (Klebl i Tanner, 1989), no kasnije je pokazano da ima endo-β-1,3-glukanaznu ili transglukanaznu aktivnost, ovisno o dostupnom supstratu i njegovoj koncentraciji (Mrsa i sur., 1993; Goldman i sur., 1995). Prvotno je utvrđeno da disrupcija gena *BGL2* ne uzrokuje promjenu fenotipa stanice s obzirom na građu glukanske mreže što ukazuje da postoje druge glukanaze koje kompenziraju nedostatak aktivnosti Bgl2 (Klebl i Tanner, 1989), međutim zanimljivo je da je kasnije primjećeno da delecijom *BGL2* dolazi do porasta količine hitina u stijenci i porasta aktivnosti Chs1 za oko 60% u odnosu na divlji tip (Kalebina i sur., 2003). Delecija *BGL2* homologa u kvascu *C. albicans* rezultirala je snažnijim fenotipom - narušavanjem strukture stijenke i smanjenom virulentnošću (Sarthy i sur., 1997).

Cts1 spada u skupinu endohitinaza čiji nedostatak u stanici rezultira nemogućnošću odvajanja stanica kćeri od stanica majki. Maksimalni nivo transkripcije gena *CTS1* postiže se u G1 fazi staničnog ciklusa, a proces transkripcije pod kontrolom je Ace2 transkripcijskog faktora (O'Conallain i sur., 1999). Na temelju analize aminokiselinskog sastava pretpostavlja se da se aktivno mjesto nalazi između signalne sekvence i regije bogate serinskim i treoninskim ostacima.

Exg1 ili Bgl1 ima egzo-β-1,3-glukanaznu aktivnost, a ekspresija gena *EXG1* u stanicama *S. pombe* uzrokuje pojavu navedene aktivnosti u stijenci (Kuranda i Robbins, 1987). *EXG1* ima paraloga *SPR1* proizašlog iz WGD.

Dse4 ima endo-β-1,3-glukanaznu aktivnost, a lokaliziran je u septumu sa strane stanice kćeri. Sudjeluje u razgradnji stijenke od strane stanice kćeri i time doprinosi procesu odvajanja od stanice majke (Colman-Lerner i sur., 2001).

Proteini Scw10, Scw4 i Scw11 spadaju u skupinu mogućih glukanaza, prvenstveno zbog visokog stupnja sličnosti s Bgl2 i glukanazama drugih organizama, međutim njihova aktivnost još nije dokazana. Scw4 i Scw10 paralozi su proizašli iz WGD te imaju visok postotak homologije (više od 60%). Dvostruki mutant *scw4scw10* ima smanjenu mogućnost parenja, produljeno generacijsko vrijeme uz povećanu osjetljivost na inhibitore sinteze stijenke. Oba proteina imaju signalno mjesto za procesiranje proteazom Kex2 koja prepoznaje specifične sekvence Lys-Arg i Arg-Arg. Procesiranje ovih proteina proteazom Kex2 odvija se tijekom sekretornog puta, u Golgiju gdje je smještena proteaza Kex2. Za protein Scw4 pokazano je također da se dodatno procesira proteazama iz japsinske porodice, skupine aspartatnih proteaza koje mogu procesirati iza dibazičnih sekvenci Lys-Arg i Arg-Arg (Cawley i sur., 1998), ali i iza pojedinačnih bazičnih aminokiselina (Bourbonnais i sur., 1994), što je upravo slučaj kod procesiranja Scw4. Pritom japsini hidroliziraju peptidnu vezu iza lizinskog ostatka koji se nalazi na 39.-oj poziciji u proteinu (Grbavac i sur., 2017). Prethodne studije pokazale su da su neke japsinske proteaze smještene u membrani, neke u stijenci, a lokalizacija nekih nije poznata, pa se ne može sa sigurnošću znati u kojem trenutku dolazi do procesiranja Scw4 ovom grupom proteaza. Također, nije poznato procesiraju li japsini i Scw10, no iz aminokiselinskog slijeda vidljivo je da nema bazične aminokiseline u blizini potencijalnog mjesta procesiranja proteazom Kex2, kao što je to slučaj kod Scw4, izuzev histidinskog ostatka na 37.-oj poziciji. Međutim, do sada nije zabilježeno da japsini mogu hidrolizirati peptidnu vezu u peptidu nakon histidinskog ostatka. Također, prilikom prve izolacije ova dva proteina okarakterizirana su kao nekovalentno vezana (Cappellaro i sur., 1998), no kasnije je utvrđeno da dio ovoga proteina ostaje u stijenci i nakon što se uklone svi nekovalentno vezani proteini (Teparić i sur. 2004) što potencijalno ukazuje na mogućnost kovalentnog vezanja navedenog proteina. S obzirom da ne posjeduje signal za vezanje na GPI sidro i nema značajnu sličnost s Pir proteinima koji čine treću skupinu proteina stijenke s obzirom na način vezanja, Scw4 i Scw10 potencijalno ostvaruju novu vrstu kovalentne interakcije sa stijenkom. Također je pokazano da se udio Scw4 izoliranog nakon prethodnog uklanjanja nekovalentno vezanih proteina smanjuje nakon što protein biva procesiran japsinskim proteazama što ukazuje na potencijalnu ulogu procesiranja u sposobnosti kovalentnog vezanja ovog proteina (Grbavac i sur., 2017). Za Scw11

pretpostavlja se da se ekspirimira samo za vrijeme sporulacije i nije prisutan u većoj količini u stijenci za vrijeme vegetativnog rasta.

Sun4 je s obzirom na homologiju svrstan u skupinu s proteinima Uth1, Sim1 i Nca3, a svi navedeni proteini imaju visok stupanj homologije s glukanazama iz drugih kvasaca poput *Candide wickerhamii (Skory i Freer, 1995)*, međutim njihova glukanazna aktivnost nije dokazana. Fiziološka uloga Sun4 nije sasvim jasna, no poznato je da delecija *SUN4* uzrokuje nemogućnost sinteze septuma između stanica majke i kćeri (Mouassite i sur., 2000).

Knh1 i Kre9 su homolozi uključeni u sintezu β-1,6-glukana i najvjerojatnije su u stijenku vezani nekovalentno. Delecija *kre9* dovodi do značajnih defekata u rastu i mogućnosti spolnog parenja te uzrokuje višestruko pupajuću morfologiju (Brown i Bussey, 1993).

2.3.4.2. Kovalentno vezani proteini stijenke

Kovalentno vezani proteini stijenke mogu se podijeliti u dvije grupe, a to su proteini koji su u staničnu stijenku ugrađeni preko djelomično procesiranog GPI sidra te proteini iz Pir porodice koji sa stijenkom ostvaruju kovalentnu vezu nestabilnu u lužnatim uvjetima. Prva skupina proteina vezana je preko djelomično procesiranog GPI sidra, koji je pak vezan na β-1,6-glukan, te se sa stijenke mogu ukloniti djelovanjem β-1,3- ili β-1,6- glukanaze. Proteine ove skupine nazivamo GPI proteinima. Proteini vezani na GPI sidro mogu ostati usidreni u membrani ili se dosad nerazjašnjenim mehanizmom odcjepljuju s membrane prilikom hidrolitičkog cijepanja unutar ugljikohidratnog dijela GPI sidra. Protein vezan na tako procesirano GPI sidro prenosi se na β-1,6-glukan (Kollár i sur., 1997). Smatra se da se u stijenku prenose svi oni proteini koji nemaju karakterističan dibazični signal koji onemogućava prijenos i sidrenje GPI proteina u membranu (de Groot i sur., 2003). GPI proteini stijenke intenzivno su *O*- i *N*-glikozilirani i odgovorni su za prisustvo većine manana u stijenci. Popis poznatih GPI proteina stijenke dan je u **Tablici 2**. Kao što je vidljivo iz same **Tablice 2**, uloga GPI proteina stijenke uglavnom je nepoznata ili je pripisana nekom složenom metaboličkom procesu do čije je promjene došlo delecijom gena koji kodiraju za određeni protein stijenke. Takvo određivanje uloga nedovoljno je precizno i sklono pogreškama zbog složenosti međusobne povezanosti metaboličkih putova i mreža putova u stanici. Među proteine čiju funkciju smatramo nedovoljno jasnom ubrajamo Ccw12, Ccw14, Cwp1, Cwp2, Dan1, Dan4, Ecm33, Pst1, Sed1, Spi1, Sps2, Sps22, Tip1 te Tir1, Tir2, Tir3 i Tir4. Proteini Dan1, Dan4, Tip1 te Tir1-4 međusobno su vrlo slični te su pojačano eksprimirani pri uvjetima anaerobnog rasta zbog čega se pretpostavlja da imaju ulogu

u odgovoru na hipoksiju (Marguet i sur., 1988; Kowalski i sur., 1995; Sertil i sur., 1997; Abramova i sur., 2001). Također, Tir1-4 eksprimirani su pojačano i pri uvjetima hladnog šoka (Abramova i sur., 2001). Proteini Cwp1 i Cwp2 kodiraju za 50 kDa, odnosno 180 kDa velike proteine čija je ekspresija povećana pri stresnim uvjetima (van der Vaart i sur., 1995; Kapteyn i sur., 1996), ali se smanjuje pri uvjetima anaerobnog rasta (Abramova i sur., 2001). Pst1 ima paraloga Ecm33 proizašlog iz WGD (Byrne i Wolfe, 2005), te njegova uloga nije poznata, dok za Ecm33 postoje indikacije da je uključen u signalni put za efikasni unos glukoze u stanicu (Umekawa i sur., 2017). Sed1 pojačano je eksprimiran u stacionarnoj fazi i pojačava otpornost stanice na djelovanje litičkih enzima (Shimoi i sur., 1998) te ima paraloga Spi1 proizašlog iz WGD (Byrne i Wolfe, 2005), a čija je uloga nepoznata.

**Tablica 2.** Popis do sada poznatih GPI vezanih proteina stijenke kvasca *S. cerevisiae*

| PROTEIN | FIZIOLOŠKA ULOGA |
|---|---|
| **Aga1, Aga2** | Podjedinice a-aglutinina |
| **Sag1 (Agα1)** | α-aglutinin |
| **Ccw12** | Nepoznata uloga |
| **Ccw14 (Ssr1, Icwp)** | Nepoznata uloga |
| **Cwp1-2** | Nepoznata uloga |
| **Dan1 (Ccw13)** | Uloga u anaerobiozi |
| **Dan4** | Uloga u anaerobiozi |
| **Dse2** | Manoprotein eksprimiran u stanici kćeri |
| **Ecm33** | Nepoznata uloga |
| **Egt2** | endoglukanaza |
| **Fig2** | adhezin |
| **Fit1-3** | Sudjelovanje u transportu željeza |
| **Flo1 (Flo2,Flo4), Flo5, Flo9-11** | flokulini |
| **Pst1 (Hpf2)** | Izlučuje se u protoplastima |
| **Sed1** | Nepoznata uloga |
| **Spi1** | Povećana ekspresija u stacionarnoj fazi |
| **Sps2, Sps22** | Uloga u sporulaciji |
| **Tip1** | Nepoznata uloga |
| **Tir1-4** | Uloga u anaerobiozi |
| **Utr1, Utr2 (Crh2)** | Hitin-transglikozilaza |
| **Gas1, Gas3, Gas5** | β-1,3-glukoziltransferaza |
| **Yps7** | Aspartatna proteaza |

Ccw12 i Ccw14 proteini su koji prema aminokiselinskoj sekvenci imaju veličinu od 13, odnosno 23 kDa, međutim oba proteina na SDS elektroforezi putuju kao proteini mase veće od 150 kDa (Mrsa i sur., 1999), što je najvjerojatnije posljedica ekstenzivne glikozilacije. Delecija gena *CCW12* uzrokuje pohranu hitina u stijenci, produljeno generacijsko vrijeme, manju efikasnost parenja kao i pojačanu osjetljivost na djelovanje inhibitora sinteze stijenke (Mrsa i

sur., 1999; Hagen i sur., 2004). Ccw14 poznat je još i pod nazivom Icwp, a disrupcija kao i pojačana ekspresija gena koji kodira za Ccw14 uzrokuje pojačanu osjetljivost na inhibitore sinteze stijenki (Moukadiri i sur., 1997). Ista studija pokazala je i da disrupcija *CCW14* uzrokuje pojačanu osjetljivost stanice na djelovanje zimolijaze što potencijalno ukazuje na strukturalnu ulogu Ccw14.

GPI proteini čija je uloga najispitivanija zapravo sudjeluju u dva procesa vezana uz međustaničnu interakciju. Prvi proces je aglutinacija, povezivanje stanica kvasca kao odgovor na prisustvo stanica suprotnog tipa parenja, prilikom kojeg dolazi do interakcije proteina Agα1 lokaliziranog na površini stanica **α** tipa parenja i aglutininskog komplesa sačinjenog od Aga1 i Aga2 proteina na površini stanica **a** tipa parenja. Aga1 vezan je na glukan preko GPI sidra, a Aga2 vezan je na Aga1 kovalentno, uspostavom disulfidnih mostova između ta dva proteina (Roy i sur., 1991). Drugi proces uključuje flokulaciju, nakupljanje stanica nevezano uz spolno parenje, koje međusobno ostvaruju interakcije lektinskog tipa, a najčešće se javlja kao odgovor na nedostatak nutrijenata u okolišu. Flokulini imaju regije varijabilnog broja ponavljanja te ostvaruju interakcije sa ugljikohidratima susjednih stanica uz prisustvo $Ca^{2+}$ iona.

Također, prisutni su i enzimi iz Gas porodice. Gas proteini skupina su β-1,3-glukanoziltransferaza koji cijepaju β-1,3-glikozidnu vezu unutar β-1,3-glukanskog lanca i prenose odcijepljeni segment lanca s reducirajućim krajem na nereducirajući kraj drugog β-1,3-glukanskog lanca (Mouyna i sur., 2000; Carotti i sur., 2004; Ragni i sur., 2007). U stijenku kovalentno mogu biti vezana tri prestavnika ove skupine, Gas1, Gas3 te Gas5 (De Sampaïo i sur., 1999; Yin i sur., 2005). Gas enzimi igraju veliku ulogu u biogenezi stijenke pri vegetativnom rastu i njihova mutacija dovodi do preosjetljivosti na inhibitore sinteze stijenke te smanjeni udio β-1,3-glukana, a povećani udio hitina i manana (Ram i sur., 1994, 1995; Popolo i sur., 1997; Valdivieso i sur., 2000). *GAS2 i GAS4* ekspirimirani su samo za vrijeme sporulacije i njihova delecija uzrokuje defekte u sporulaciji.

Kao što je ranije spomenuto, japsini su skupina proteaza koje igraju ulogu u obrtaju proteina stijenke. Kod kvasca *S. cerevisiae* identificirano je 5 japsinskih gena koji kodiraju za redom Yps1, Yps2/Mkc7, Yps3/Yps4, Yps6 i Yps7, pri čemu je samo za Yps7 predviđeno da je kovalentno vezan na stijenku (Krysan i sur., 2005; Gagnon-Arsenault i sur., 2006). Disrupcija pojedinačnih japsinskih gena dovodi do osjetljivosti stijenke na djelovanje različitih agenasa, a disrupcija svih 5 gena uzrokuje osjetljivost stanica na okolišni stres, ali i smanjeni udio β-1,3- i β-1,6-glukana te povišeni udio hitina zbog čega se pretpostavlja da japsini djeluju na

aktivnost transglikozidaza i hidrolaza lokaliziranih u stijenci (Krysan i sur., 2005). Japsini se sintetiziraju kao inaktivni zimogeni pri čemu pro-regija stupa u interakciju s pobočnim ograncima u aktivnom mjestu pri neutralnoj pH vrijednosti i time blokira mogućnost vezanja supstrata. Sniženjem pH dolazi do gubitka naboja grupa aminokiselinskih ostataka što uzrokuje otpuštanje pro-regije koja potom postaje podložna proteolizi, a aktivno mjesto može vezati supstrat (Richter i sur., 1998). Iako mehanizam odcjepljivanja proregije nije u potpunosti jasan, studija iz 2008.-e (Gagnon-Arsenault i sur., 2008) ukazuje na mogućnost da se pri nižim pH vrijednostima proces odvija barem djelomično autokatalitički, dok je pri višim pH vrijednostima proces kataliziran vjerojatno drugim proteazama, potencijalno Kex2 (Gagnon-Arsenault i sur., 2006).

Posljednju grupu proteina stijenke prema načinu vezanja čine Pir proteini koji se iz stijenke mogu izolirati postizanjem alkalnih uvjeta ili djelovanjem β-1,3-glukanaze. Mehanizam formiranja veze između Pir proteina i polisaharida stijenke nije u potpunosti jasan te nije poznat enzim koji sudjeluje pri procesu formiranja same veze, no pretpostavlja se da nastaje esterska veza između karboksilne grupe deaminiranog pobočnog ogranka glutamata i hidroksilne grupe šećera stijenke (Ecker i sur., 2006). Pir proteini dobili su naziv prema motivu unutarnih ponavljanja (en. ***P**roteins with **I**nternal **R**epeats*), a čija je sekvenca Ser-Gln-Ile-Gly-Asp-Gly-Gln-Ile-Gln-Ala. Tri glutaminska ostatka unutar ponavljajuće sekvence ključna su za ostvarivanje kovalentne veze Pir proteina sa stijenkom, pri čemu ipak najznačajniju ulogu ima drugi glutaminski ostatak po redu unutar sekvence (Ecker i sur., 2006). Uloga Pir proteina nije poznata, iako se zna da je transkripcija Pir2/Hsp150 značajno povišena pri uvjetima temperaturnog šoka (Russo i sur., 1993). Popis Pir proteina dan je u **Tablici 3**.

**Tablica 3.** Popis Pir proteina stijenke kvasca *S. cerevisiae*

| PROTEIN | FIZIOLOŠKA ULOGA |
|---|---|
| **Pir1** | Paralog Pir5, nepoznata uloga |
| **Pir2/Hsp150** | Paralog Pir3, sudjeluje u odgovoru na temperaturni šok |
| **Pir3** | Paralog Pir2, Nepoznata uloga |
| **Pir4/Cis3** | Nepoznata uloga |
| **Pir5** | Paralog Pir1, nije dokazano prisustvo proteina u stanici |

## 2.4. IZLAGANJE PROTEINA NA POVRŠINI STANICE - BIOTEHNOLOŠKI ZNAČAJ STIJENKE KVASACA

Stanična stijenka kvasca uz druge biotehnološke primjene ima i biotehnološki potencijal koji se temelji na mogućnosti izlaganja homologno i heterologno eksprimiranih proteina na površini stanice. Na ovaj način moguće je na površini ekspirimirati enzimske sustave čime se postiže njihova imobilizacija, lakše razdvajanje produkta i biokatalizatora biotehnološkog procesa, jednostavna produkcija i produljeno prisustvo biokatalizatora u procesu u usporedbi s procesom koji koristi pročišćene enzime. Također, na površini stanice moguće je eksprimirati antigene i/ili antitijela što može poslužiti za razvoj takozvanih „živih“ cjepiva. Stanice kvasca mogu se koristiti i kao biosenzori za detekciju prisustva određenih spojeva u okolini na temelju detekcije produkata reakcije koju provodi enzim izložen na površini stanice ili pak izlaganjem fluorescentnih rekombinantnih proteina na površini stanice čija je ekspresija pod kontrolom promotora koji podliježe indukciji ili represiji analitom kojeg želimo detektirati (Park, 2020). Sustav izlaganja proteina na površini kvasca može se još koristiti za primjenu u bioremedijaciji, biokonverzijama, adheziji stanica na željene površine, kao i za brzo skeniranje knjižnice proteina/peptida.

Sam proces izlaganja željenog proteina na površini stanice podrazumijeva fuziju gena koji kodira za protein od interesa s genom koji kodira za protein stanične stijenke koji se na glukan veže kovalentnim interakcijama. Sustav za izlaganje proteina na staničnu stijenku trebao bi posjedovati određene karakteristike koje uključuju osiguravanje prolaska proteina kroz sekretorni put, pravilno smatanje i stabilnost rekombinantnog proteina te čvrstu imobilizaciju proteina na staničnoj stijenci. Imobilizacija proteina na staničnu stijenku može se izvesti preko N- ili C- terminalnog kraja proteina, iako postoji i opcija da se gen za protein od interesa ubaci unutar sekvence gena za protein stijenke. To daje veću mogućnost pronalaska sustava koji će umanjiti mogućnost promjene konformacije važnih regija proteina poput aktivnog mjesta enzima. Unatoč brojnim prednostima ovakvog načina imobilizacije proteina na staničnoj površini, postoje i nedostatci poput primjerice posttranslacijskih modifikacija proteina, prvenstveno *O*- i *N*-glikozilacije, koja prethodno nije postojala ili nije postojala u danom obliku na proteinu kojeg želimo imobilizirati. Također, u mnogim slučajevima kapacitet stanice za izlaganje proteina na njenoj površini nedovoljan je za potrebe biotehnološke industrije. Stoga se intenzivno radi na povećanju efikasnosti i pronalascima novih sustava za izlaganje proteina na staničnoj površini, kao i pronalaženje novih vrsta kvasaca kao stanica domaćina koje za tu primjenu imaju bolje odlike od stanica *S. cerevisiae*.

Najčešće korišteni sustavi za izlaganje proteina na površini *S. cerevisiae* koriste α-aglutinin, a-aglutinin i Flo1. Za aglutinine uključene u proces parenja pretpostavlja se da se nalaze u vanjskom dijelu stijenke (Lipke i Kurjan, 1992), što ih čini vrlo pogodnima za primjenu u ove svrhe. Prilikom korištenja α-aglutinina, imobilizacija proteina od interesa vrši se preko njegovog C-terminalnog cijela na koji se nastavlja N-terminalni dio α-aglutinina, s obzirom da je C-terminalni dio α-aglutinina potreban za njegovo vezanje na GPI sidro. Slučaj je nešto drugačiji kod upotrebe a-aglutinina koji se sastoji od dvije podjedinice Aga1 i Aga2, pri čemu se Aga1 veže preko GPI sidra u staničnu stijenku, a protein od interesa fuzionira se s Aga2 preko svog N- ili C-terminalnog kraja, s obzirom da se Aga2 preko disulfidnih mostova veže na Aga1 i nije potrebna posebna konformacija njegovih terminalnih regija kako bi se uspostavila navedena veza. Primjeri uspješnih izlaganja rekombinantnih proteina na površini stanice korištenjem aglutininskih sustava uključuju izlaganje glukoamilaza (Murai i sur., 1997), β-galaktozidaza (Schreuder i sur., 1993), β-glukozidaza (Kaya i sur., 2008; Tokuhiro i sur., 2008), lipaza iz *Rhizopus oryzae (Washida i sur., 2001), Rhizomucor miehei (Zhang i sur., 2008)* i *Candida antarctica (Inaba i sur., 2009)* te ksiloza-izomeraza iz *Clostridium cellulovorans (Ota i sur., 2013)*. Flokulin Flo1 sadrži pak regiju s varijabilnim brojem ponavljanja odgovornih za uspostavljanje reakcija s ugljikohidratima na svom N-terminalnom kraju te podliježe intenzivnoj glikozilaciji zbog čega poprima štapićastu strukturu duljine koja odgovara debljini stijenke (Watari i sur., 1994). Na svom C-terminalnom dijelu, vezan je na GPI sidro te se prilikom imobilizacije proteina od interesa vrši fuzija C-terminalnog dijela željenog proteina i N-terminalnog dijela Flo1. Također, razvijen je i sustav imobilizacije koji iskorištava interakcije funkcionalne regije Flo1 s ugljikohidratima stijenke pri čemu je onda protein od interesa imobliziran preko svog N-terminalnog kraja (Matsumoto i sur., 2002). Primjeri uspješnih izlaganja proteina na površini stanice korištenjem Flo1 sustava uključuju izlaganje glukoamilaza (Sato i sur., 2002), lipaza iz *Rhizopus oryzae (Matsumoto i sur., 2002; Nakamura i sur., 2006), Pseudomonas fluorescens (Jiang i sur., 2008)* i *Candida antarctica* (Tanino i sur., 2007) te esteraze EstA iz *Burkholderia gladioli (Breinig i sur., 2006)*. Za izlaganje protein od interesa na površini stanice uz imobilizaciju preko njegovog C-terminalnog kraja korišteni su još i slijedeći GPI proteini: Tip1, Sed1, Cwp1, Cwp2, Ccw12, Spi1, Dan4, Tos6, Srp2 i Tir1.

Druga skupina proteina koji se koriste za izlaganje željenih proteina na površini stanice su Pir proteini. Kao što je ranije rečeno, Pir proteini se vežu kovalentnom vezom na staničnu stijenku koju ostvaruju preko glutaminskih ostataka u ponavljajućim regijama koje se nalaze bliže N-

terminalnom dijelu Pir proteina. Stoga je najčešća strategija korištenja Pir proteina kod sustava izlaganja proteina, vezanje N-terminalnog dijela proteina od interesa na C-terminalni dio Pir proteina. Međutim, također je zabilježeno da se Pir proteini u stijenku mogu vezati i na drugi način, preko svog C-terminalnog dijela, u što su uključeni cisteinski ostaci koji se u njemu nalaze, a pretpostavlja se da sudjeluju u intermolekulskom formiranju disulfidnih mostova (Castillo i sur., 2003). U istoj studiji pokazano je i da se delecijom ponavljanja unutar Pir4 onemogućava njegovo vezanje u stijenku vezom nestabilnom u lužnatom, ali se protein još uvijek mogao vezati disulfidnim mostovima ukoliko prethodno nije bio procesiran Kex2 proteazom. Stoga su razvijene još dvije strategije fuzije željenog proteina s Pir proteinima. Prva od njih je fuzija preko N-terminalnog dijela Pir proteina na način da se konstrukt sastoji redom od signalne sekvence fuzionirane na N-terminalni kraj proteina od interesa nakon čega slijedi Pir protein koji ne sadrži niti signalnu sekvencu niti pro-regiju koja se inače procesira Kex2 proteazom (Tanaka i sur., 2012). Druga strategija podrazumijeva fuziju gena od interesa unutar gena koji kodira za Pir protein iskorištavajući dva od tri upotrebljiva restrikcijska mjesta prisutna u proteinu Pir4, od čega se prvo nalazi na početku pro-regije, drugo nakon ponavljanja i treće prije posljednjeg kodona koji kodira za posljednji cisteinski ostatak u proteinu (Andrés i sur., 2005). Princip intragenske fuzije Pir proteina i proteina od interesa rijeđe se koristi od N- i C-terminalne imobilizacije. Primjeri uspješnog izlaganja homolognih i heterolognih proteina korištenjem Pir proteina za njihovu imobilizaciju uključuju imobilizaciju glikozil-transferaza (Abe i sur., 2003), ksilanaze A iz *Bacillus sp.* BP-7 (Andrés i sur., 2005), VP8* fragmenta površinskog proteina rotavirusa (Andrés i sur., 2006), dvaju glikozil-transferaza sisavaca (Salo i sur., 2005) kao i intracelularne ksiloza-reduktaze *S.cerevisae (Hossain i sur., 2019).*

Iako je većina sustava za izlaganje proteina na staničnoj površini razvijena za kvasac *S. cerevisiae,* sve je veći interes za njihov razvoj u drugim vrstama kvasaca. Druge vrste kvasaca posjeduju druge tipove glikozilacije koji mogu biti manje imunogeni od glikozilacije prisutne u *S. cerevisiae*, mogu rasti u ekstremnijim uvjetima što olakšava i smanjuje potrebe za strogim sterilnim uvjetima biotehnoloških procesa te potencijalno posjeduju i veći kapacitet ugradnje rekombinantnih proteina u stijenku. Trenutno kvasac s najviše razvijenih sustava za izlaganje proteina na staničnoj površini nakon *S. cerevisiae* je *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* kasnijom je reklasifikacijom premještena u rod *Komagataella,* te je utvrđeno da *P. pastoris* nije jedna vrsta, nego se radi o dvije zasebne vrste *Komagataella pastoris* te *K. phaffii*. S obzirom da se ne zna koja je vrsta korištena u ranijim radovima, te radi li se o mješanoj kulturi ovih dviju

vrsta, kod opisa ranijih rezultata često se koristi i starije nazivnje *P. pastoris*. Vrste iz roda *Komagataella* imaju smanjenu glikozilaciju u odnosu na *S. cerevisiae* što smanjuje mogućnost negativnog djelovanja glikozilacija na ispravnu konformaciju enzima ili smanjeni pristup supstrata aktivnom mjestu. Za imobilizaciju proteina od interesa na površini kvasca *P. pastoris* korišteni su Agα1, Aga1, Aga2, Tip1, Sed1, Flo1 i Pir1 iz kvasca *S. cerevisiae* te proteini Pir1 i Pir2 iz kvasca *P. pastoris* (Wang i sur., 2007; Su i sur., 2010; Khasa i sur., 2011; Li i sur., 2015). Osim *P. pastoris*, sustavi za izlaganje proteina na staničnoj površini razvijeni su još i za kvasce *Y. lipolytica, Kluyveromyces marxianus* te *S. pombe*. *Yarrowia lipolytica* biotehnološki je vrlo zanimljiv kvasac sa GRAS statusom koji može metabolizirati hidrofobne supstrate poput masti i ulja, a može i rasti na limunskoj, mliječnoj, octenoj, propionskoj, maličnoj, sukciničnoj i oleinskoj kiselini kao jedinim izvorima ugljika (Rodrigues i Pais, 2000). Također, može rasti u obliku pupajućih stanica, psudohifalno ili hifalno, ovisno prvenstveno o okolišnom pH, ali i drugim uvjetima rasta. *Y. lipolytica* može izlučivati proteine iz stanice velikim kapacitetom te ima nisku razinu glikozilacije proteina (Dominguez i sur., 1998). Za imobilizaciju homolognih i heterolognih proteina na stijenci korišteni su Ylcwp1 (homolog Cwp1 *S. cerevisiae*), Flo1 (homolog Flo1 *S. cerevisiae*), YlCwp2, YlCwp3,YlCwp4, YlCwp5, YlCwp6 i YlPir1. *K. marxianus* termotolerantni je kvasac sa sposobnošću rasta na rasponu jeftinih supstrata što ga čini pogodnim za biotehnološku primjenu, a do sada je uspostavljeno izlaganje heterolognih proteina β-glukozidaze iz *Aspergillus aculeatus* i endoglukanaze iz *Trichoderma reesei* korištenjem α-aglutinina iz *S. cerevisiae* (Yanase i sur., 2010). Za razliku od svih do sada spomenutih kvasaca, *Shizosaccharomyces pombe* koji je fizijski kvasac evolucijski je najudaljeniji od *S. cerevisiae*, a relativno je dobro istražen zbog brojnih zanimljivih metaboličkih karakteristika. U studiji iz 2013.-e (Tanaka i sur., 2013) prikazani su rezultati uspješnog izlaganja β-glukozidaze iz *A. aculeatus* na površini stanica *S. pombe* korištenjem četiriju proteina *S. pombe* SPBC359.04c, SPBC947.04, SPBC21D10.06c i SPBC19C7.05.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. MATERIJALI

### 3.1.1. Kemikalije

Za potrebe provedbe eksperimenata za izradu ovog rada korištene su kemikalije slijedećih proizvođača:

- Agar, kvaščev ekstrakt, sladni ekstrakt - Biolife (Milano, Italija)
- Aminokiseline, natrijev dodecil sulfat (SDS), akrilamid, agaroza, ampicilin, etidij bromid, polietilenglikol (PEG) 4000, sorbitol, β-merkaptoetanol, *N, N, N', N'*-tetrametil etilendiamin (TEMED) - Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Pepton, BactoTriptone, kvaščeva dušična baza bez aminokiselina (YNB) - BD Biosciences (Franklin Lakes, SAD)
- polimeraza *Taq*, polimeraza *Q5*, *Q5* site-directed mutagensis set, deoksiribonukleotidi, standardi za DNA elektroforezu, obojeni standardi za proteinsku elektroforezu, DNA-ligaza T4, sve restrikcijske endonukleaze - New England Biolabs (Ipswich, SAD)
- Standardi niske molekulske mase (LMW) za proteinsku elektroforezu, nitrocelulozna membrana, rendgenski filmovi - Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švedska)
- Amonijev persulfat, *N,N'*- metilenbisakrilamid, Triton X-100 - Fluka (Buch, Švedska)
- Ponceau S - Serva (Heidelberg, Njemačka)
- Anti-HA-peroksidazna antitijela - Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Njemačka)
- ECL otopine za razvijanje imunoblota - BioRad (Hercules, SAD)
- Glukoza, galaktoza, rafinoza - ACROS Organics (Antwerpen, Belgija)
- EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce streptavidin-peroksidaza konjugat - ThermoScientific (Waltham, SAD)
- β-1,3-glukanaza 81A - NZYTech (Lisabon, Portugal)
- Zeocin - Quantazyme (Irvine, SAD)
- pGEM-T Easy vektorski sustav - Promega (Madison, SAD)
- Ostale krutine potrebne za pripremu pufera i ostali eksperimentalni rad pribavljene su od proizvođača Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska), ACROS Organics (Antwerpen, Belgija), Fischer Scientific International (Pittsburgh, SAD), dok su kiseline, alkoholi i organska otapala nabavljeni od proizvođača Carlo Erba (Milano, Italija) i Lach-Ner (Brno, Češka)

3.1.2. Otopine i puferi

- TM pufer (50 mM Tris, 100 mM MgCl) priprema se otapanjem 0,6 g Tris i 1 g MgCl u 100 mL deionizirane vode. Otopina se čuva pri sobnoj temperaturi.
- K- fosfatni pufer (50 mM) pH 8 priprema se otapanjem 16,512 g $K_2HPO_4$ i 0,708 g $KH_2PO_4$ u 1 L deionizirane vode
- K-fosfatni pufer (50 mM) pH 6 priprema se otapanjem 0,522 g $K_2HPO_4$ i 6,392 g $KH_2PO_4$ u 1 L deionizirane vode
- Laemmli pufer (0,03 g $mL^{-1}$ Tris, 3,8 g $mL^{-1}$ EDTA; 0,1 g $mL^{-1}$ SDS; 0,4 mL $mL^{-1}$ glicerol; 0,25 mL $mL^{-1}$ β-merkaptoetanol; 0,05 g $L^{-1}$ brom-fenol plavo) 5x koncentriran priprema se otapanjem 0,75 g Tris i 0,095 g dinatrijeve soli EDTA u 6 mL deionizirane vode te se pH podesi na 6,8 pomoću 36% HCl. Potom se dodaje 2,5 g SDS, 10 mL glicerola, 6,25 mL β-merkaptoetanola i 1,25 mg brom-fenol plavo. Volumen otopine podesi se na 25 mL dodatkom deionizirane vode.
- 10x koncentriran pufer za elektroforetsko razdvajanje proteina (30 g $L^{-1}$ Tris; 144 g $L^{-1}$ glicin; 10 g $L^{-1}$ SDS) priprema se otapanjem 30 g Tris, 144 g glicina i 10g SDS u 1 L deionizirane vode.
- 30% otopina akrilamida priprema se otapanjem 60 g akrilamida i 1,6 g bis-akrilamida u 200 mL deionizirane vode
- TRIS-HCl pufer pH 6,8 priprema se otapanjem 8,4 g Tris i 0,55 g SDS u 0,4 L deionizirane vode. Potom se pH vrijednost podesi na 6,8 dodatkom 36% HCl te se ukupni volumen podesi na 0,5 L dodatkom deionizirane vode.
- TRIS-HCl pufer pH 8,8 priprema se otapanjem 68,2 g Tris i 1,5 g SDS u 0,4 L deionizirane vode uz podešavanje pH vrijednosti na 8,8 dodatkom 36% HCl. Ukupni volumen podesi se na 0,5 L dodatkom deionizirane vode.
- Towbin pufer za polusuhi prijenos na membranu (25 mM Tris; 192 mM glicin; 20% (v/v) metanol) pH 8,3 priprema se otapanjem 3,03 g Tris i 14,4 g glicina u 800 mL deionizirane vode uz dodatak 200 mL metanola.
- Pufer za blokiranje membrane (6 g $L^{-1}$ Tris; 8,8 g $L^{-1}$ NaCl; 0,001 mL $mL^{-1}$ Triton X-100) pH 7,5 priprema se otapanjem 3 g Tris i 4,4 g NaCl u 400 mL deionizirane vode. Potom se pH otopine podesi na 7,5 dodatkom 36% HCl te se dodaje 0,5 mL Triton X-100. Konačni volumen podesi se na 0,5 L dodatkom deionizirane vode.
- BEDS pufer (10 mM Bicin-Cl, 1 M sorbitol) priprema se otapanje bicina uz podešavanje pH vrijednosti na 8,3 dodatkom 36% HCl. Potom se dodaje sorbitol u

finalnoj koncentraciji od 1 M u otopini nakon čega se pufer sterilizira autoklaviranjem. U ohlađen pufer dodaje se 5% (v/v) DMSO

- 50x koncentrirani TAE pufer (2 M Tris; 1 M octene kiseline; 50 mM EDTA) priprema se otapanjem 242 g Tris u 600 mL deionizirane vode, a potom se dodaje 57,1 mL ledene octene kiseline i 100 mL 0,5 M otopine dinatrijeve soli EDTA pH 8. Ukupni volumen podesi se na 1L dodatkom deionizirane vode.
- Otopina etidijevog bromida za vizualizaciju DNA priprema se na način da se osnovna otopina etidijevog bromida (5 g $L^{-1}$) razrijedi u omjeru 1:10 000. Otopinu je čuvati od svjetlosti.
- Otopina ampicilina (100 g $L^{-1}$) priprema se otapanjem 10 g ampicilina u ukupnom volumenu od 100 mL deionizirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na -20°C.

3.1.3. Hranjive podloge

Za uzgoj *E. coli* korištena je LB podloga sastava 10 g $L^{-1}$ baktotriptona, 5 g $L^{-1}$ kvaščevog ekstrakta, 5 g $L^{-1}$ NaCl. Kao selektivna podloga korištena je LB-Amp podloga istog sastava uz dodatak 100 µg $mL^{-1}$ ampicilina. Krute podloge uz sve navedeno sadrže i 16 g $L^{-1}$ agara.

Za uzgoj kvasaca za analizu proteinskih profila stijenki korištena je YM podloga sastava 3 g $L^{-1}$ kvaščevog ekstrakta, 3 g $L^{-1}$ sladnog ekstrakta, 5 g $L^{-1}$ peptona uz 2% glukoze (m/v) kao izvora ugljika. Krute podloge uz sve navedeno sadrže i 16 g $L^{-1}$ agara.

Za uzgoj kvasaca *S. cerevisiae* za analizu proteina Scw4 i Scw10 korištena je YNB $ura^-$ odnosno YNB $leu^-$, ovisno o selektivnom markeru plazmida koji nosi gen za protein koji analiziramo. YNB podloga sastoji se od 6,7 g $L^{-1}$ kvaščeve dušične baze bez aminokiselina, 2 g $L^{-1}$ smjese svih aminokiselina i tvari rasta izuzev onih preko kojih se vrši selekcija rasta auksotrofnih sojeva („drop-out“; sastav prikazan u **Tablici 4**.) te dodatak 20 g $L^{-1}$ šećera. Ovisno o auksotrofnosti soja u podlogu se dodaju još histidin (80 mg $L^{-1}$), uracil (80 mg $L^{-1}$), triptofan (80 mg $L^{-1}$) i/ili leucin (160 mg $L^{-1}$). Krute podloge uz sve navedeno sadrže i 16 g $L^{-1}$ agara.

Za uzgoj kvasca *K. phaffii* korištena je YPD podloga koja sadrži 10 g $L^{-1}$ kvaščevog ekstrakta, 20 g $L^{-1}$ peptona i 20 g $L^{-1}$ glukoze. Nakon transformacije, koristi se selektivna podloga koja uz navedene sastojke sadrži i 0,01 mL $L^{-1}$ osnovne otopine zeocina (100 mg $mL^{-1}$) te 1 M sorbitol.

**Tablica 4.** Sastav smjese aminokiselina i tvari rasta potrebnih za uzgoj kvasca („drop out“)

| | | | |
|---|---|---|---|
| adenin | 3 g | L-izoleucin | 2 g |
| L-alanin | 2 g | L-lizin | 4 g |
| L-arginin | 2 g | L-metionin | 2 g |
| L-asparagin | 2 g | *p*-aminobenzojeva kiselina | 0,2 g |
| L-asparaginska kiselina | 2 g | L-fenilalanin | 2 g |
| L-cistein | 2 g | L-prolin | 2 g |
| L-glutamin | 2 g | L-serin | 2 g |
| L-glutaminska kiselina | 2 g | L-treonin | 2 g |
| L-glicin | 2 g | L-tirozin | 2 g |
| inozitol | 2 g | L-valin | 2 g |

3.1.4. Sojevi kvasaca

Sojevi kvasaca korišteni za potrebe analize proteinskih profila stanične stijenke dani su u **Tablici 5**. Svi sojevi korišteni u ovoj analizi dobiveni su iz ACBR zbirke mikrobnih kultura Zavoda za biotehnologiju BOKU Sveučilišta u Beču, u Austriji.

**Tablica 5.** Sojevi kvasaca korišteni za izradu analize proteinskih profila stijenke. Slijedeće oznake u tablici označavaju: T tip soja; NT neotip soja; ACBR: *Austrian center of Biological Resources and Applied Mycology*, Muthgasse 11, 1190 Beč, Austrija; CBS-KNAW: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, Nizozemska

| Vrsta | Oznaka soja | | Izvor |
|---|---|---|---|
| | ACBR | CBS | |
| *Blastobotrys adeninivorans* | HA1092$^{T}$ | CBS8244$^{T}$ | Tlo, Nizozemska, Wageningen |
| *Debaryomyces hansenii* | HA574 | - | Izmet ptica iz zoološkog vrta |
| *D. vindobonensis* | HA 1076$^{T}$ | CBS11666$^{T}$ | Postrojenje za obradu otpadnih voda, Austrija, Beč |
| *Hanseniaspora uvarum* | HA1216$^{T}$ | CBS314$^{T}$ | Muškatno grožđe, Rusija, Krim |
| *H. osmophila* | HA1225 | - | Zrelo grožđe sorte rizling, Njemačka |
| *Kluyveromyces lactis* | HA118 | CBS2359 | Mljekara, USA |
| *K. marxianus* | HA731$^{T}$ | CBS834$^{T}$ | kefir, Nizozemska |
| *Metschnikowia biscupidata* | HA672$^{NT}$ | CBS5575$^{NT}$ | sporociste *Diplostomum flexicaudum* (trematode), u probavnim žlijezdama puža |
| *M. pulcherrima* | HA665$^{T}$ | CBS5833$^{T}$ | bobice *Vitis labrusca*; SAD, Kalifornija |
| *M. reukaufii* | HA666$^{T}$ | CBS 5834$^{T}$ | Cvijet *Epilobium angustifolium*, Kanada |
| *Pichia kudriavzevii* | HA892$^{T}$ | CBS5147$^{T}$ | Voćni sok |
| *P. membranifaciens* | HA895$^{T}$ | CBS107$^{T}$ | nepoznato |
| *S. cerevisiae* | HA2779 | - | BY4741, derivative of S288C strain |
| *S. cerevisiae v. boulardii* | HA282 | CBS5926 | Voće, Indokina |
| *Schizosaccharomyces japonicus* | HA116$^{T}$ | CBS103$^{T}$ | Koncentrirani sok grožđa, SAD |

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Sch.pombe* | HA983$^{T}$ | CBS357$^{T}$ | Melasa šećerne trske iz postrojenja za proizvodnju ruma, Jamajka |
| *Torulaspora delbrueckii* | HA688$^{NT}$ | CBS1146$^{NT}$ | nepoznato |
| *Yarrowia lipolytica* | HA990$^{T}$ | CBS6124$^{T}$ | Postrojenje za preradu kukuruza; SAD, Illinois |
| *Y. lipolytica* | HA826 | - | Površina zrelog svježeg sira, Austrija |
| *S.cerevisiae var. boulardii* | HA282 | - | nepoznato |
| *S. paradoxus* | HA390 | CBS406 | Smola hrasta, Nizozemska |
| *S. kudriavzevii* | HA2261 | CBS8840 | Trulo lišće, Japan |
| *S. kud. x S. cer.* | HA1836 | - | Plodište gljive *Cyttaria hariotii*, Sjeverozapadna Patagonia, Argentina |
| *S. cerevisiae* | HA2214 | - | Grožđe „Zweigelt“, Austrija |
| *S. cerevisiae* | HA233 | - | Sake, Japan |

Sojevi kvasca *S. cerevisiae* korišteni za analizu načina ugradnje proteina Scw4 u staničnu stijenku kvasca te sojevi za analizu proteolitičkog procesiranja proteina Scw10 i utjecaja procesiranja na kovalentno vezanje Scw10 u stijenku kvasca dani su u **Tablici 6**.

**Tablica 6.** Sojevi kvasca *S. cerevisiae* korišteni za analizu proteina Scw4 i Scw10

| Soj | Genotip | Izvor/Referenca |
|---|---|---|
| **BY4741** | MAT a; *his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0* | Brachmann i sur., 1998. |
| **Y01974 (*kex2*)** | MAT a; *his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0; kex2::kanMX4* | EUROSCARF |
| **CRY1 (W3031A)** | MAT a; *ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112;ura3-1; trp1-1; can1-100* | Krysan i sur., 2005. |

| | | |
|---|---|---|
| **DKY39 (5*yps*)** | MAT a; *ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112;ura3-1; trp1-1; can1-100; yps1::LEU2; yps2::HIS3; yps3::kan; yps6::kan; yps7::kan* | Krysan i sur., 2005. |
| **BY4741Scw4-A** | BY4741 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4)* | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-B** | BY4741 transformiran plazmidom YEp351(*SCW4*) | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-C** | BY4741 transformiran plazmidom YEp351(*SCW4*ΔVR2*)* | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-D** | BY4741 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4*mutVR2) | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-E** | BY4741 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4*mutQ1) | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-F** | BY4741 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4*mutQ2) | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-G** | BY4741 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4*mutQ3) | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-H** | BY4741 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4*mutVR1) | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-I** | BY4741 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4*-QKQ/AKA) | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-J** | BY4741 transformiran plazmidom YEp351(*SCW4*Δ176*)* | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-K** | BY4741 transformiran plazmidom YEp351(*SCW4*Δ202*)* | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-L** | BY4741 transformiran plazmidom YEp351(*SCW4*Δ231*)* | Ovaj rad |
| **BY4741Scw4-M** | BY4741 transformiran plazmidom YEp351(*SCW4*Δ246*)* | Ovaj rad |

| | | |
|---|---|---|
| **Y01974Scw4-A** | Y01974 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4)* | Ovaj rad |
| **Y01974Scw4-D** | Y01974 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4* mutVR2*)* | Ovaj rad |
| **Y01974Scw4-H** | Y01974 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW4* mutVR1*)* | Ovaj rad |
| **BY4741Scw10-A** | BY4741 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW10)* | Ovaj rad |
| **BY4741Scw10-B** | BY4741 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW10*K*)* | Ovaj rad |
| **Y0197Scw10-A** | Y0197 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW10*) | Ovaj rad |
| **Y0197Scw10-B** | Y0197 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW10*K*)* | Ovaj rad |
| **CRY1Scw10-A** | CRY1 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW10)* | Ovaj rad |
| **CRY1Scw10-B** | CRY1 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW10*K*)* | Ovaj rad |
| **DKY39Scw10-A** | DKY39 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW10)* | Ovaj rad |
| **DKY39Scw10-B** | DKY39 transformiran plazmidom pBG1805(*SCW10*K*)* | Ovaj rad |

Za analizu sustava za izlaganje proteina na površini kvasca *K. phaffii* korišteni su sojevi dani u **Tablici 7**.

**Tablica 7.** Sojevi *K. phaffii* korišteni za razvoj i analizu sustava izlaganja proteina na površini stanica

| Soj | Genotip | Izvor/Referenca |
|---|---|---|
| **BSYBG11** | Dobiven iz izolata divljeg kvasca uklanjanjem „killer“ plazmida i delecijom *AOX1* | bisy e.U. (Austrija) |
| **BSYBG11-C** | **BSYBG11-C** transformiran s pBSY3ZCcw12XR | Ovaj rad |
| **BSYBG11-P** | **BSYBG11-P** transformiran s pBSY3ZCPir4XR | Ovaj rad |

3.1.5. Sojevi bakterija

Za umnažanje i izolaciju plazmida korištene su komercijalno dostupne kompetentne stanice *Escherichia coli* proizvođača Invitrogen, SAD; soj DH5α (genotip: $F^-$ φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17($r_K^-$, $m_K^+$) *pho*A *sup*E44 $\lambda^-$ *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1. Prilikom konstrukcije plazmida korištenjem Q5 site-directed mutagenesis seta, korištene su kompetentne stanice *E. coli* dostupne u sklopu navedenog seta, soj NEB®5-alpha (genotip: *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*).

3.1.6. Plazmidi

Opis plazmida korištenih pri izradi ove disertacije nalazi se u **Tablici 8**.

**Tablica 8.** Plazmidi korišteni prilikom izrade disertacije

| **Plazmid** | **Opis** | **Selektivni biljeg** | **Referenca** |
|---|---|---|---|
| pBG1805(*SCW4)* | Plazmid sadrži gen *SCW4* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1* | AmpR, *URA3* | Thermo Scientific Open Biosystems |
| pBG1805(*SCW10)* | Plazmid sadrži gen *SCW10* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1* | AmpR, *URA3* | Thermo Scientific Open Biosystems |
| YEp351(*SCW4)* | Plazmid sadrži gen *SCW4* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1* | AmpR, *LEU2* | ATCC |
| YEp351(*SCW4*ΔVR2) | Plazmid sadrži gen *SCW4* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije ima deletiranu regiju od 231. do 246. aminokiselinskog ostatka nemodificiranog Scw4. | AmpR, *LEU2* | Ovaj rad |
| pBG1805(*SCW4*mutVR2) | Plazmid sadrži gen *SCW10* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije ima na pozicijama od 233. do 241. aminokiselinskog ostatka slijed ALVLGALLG, umjesto slijeda QATPSQVGQ koji se nalazi u nemodificiranom Scw4. | AmpR, *URA3* | Ovaj rad |
| pBG1805(*SCW4*mutVR1) | Plazmid sadrži gen *SCW10* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom | AmpR, *URA3* | Ovaj rad |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | promotora *GAL1*. Produkt ekspresije ima na pozicijama od 197. do 201. aminokiselinskog ostatka slijed GALLG, umjesto slijeda DQIQD koji se nalazi u nemodificiranom Scw4 | | |
| pBG1805(*SCW4*mutQ1) | Plazmid sadrži gen *SCW10* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije sadrži $A_{233}$ umjesto $Q_{233}$ u nemodificiranom Scw4. | AmpR, *URA3* | Ovaj rad |
| pBG1805(*SCW4*mutQ2) | Plazmid sadrži gen *SCW10* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije sadrži $A_{238}$ umjesto $Q_{238}$ u nemodificiranom Scw4. | AmpR, *URA3* | Ovaj rad |
| pBG1805(*SCW4*mutQ3) | Plazmid sadrži gen *SCW10* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije sadrži $A_{241}$ umjesto $Q_{241}$ u nemodificiranom Scw4. | AmpR, *URA3* | Ovaj rad |
| pBG1805(*SCW4*-QKQ/AKA) | Plazmid sadrži gen *SCW10* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije sadrži $A_{38}$ i $A_{40}$ umjesto $Q_{38}$ i $Q_{40}$ u nemodificiranom Scw4. | AmpR, *URA3* | Ovaj rad |
| YEp351(*SCW4*Δ176) | Plazmid sadrži gen *SCW4* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije ima deletiranu regiju od 20. do 175. aminokiselinskog ostatka nemodificiranog Scw4. | AmpR, *LEU2* | Ovaj rad |

| | | | |
|---|---|---|---|
| YEp351(*SCW4*Δ202*)* | Plazmid sadrži gen *SCW4* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije ima deletiranu regiju od 21. do 201. aminokiselinskog ostatka nemodificiranog Scw4. | AmpR, *LEU2* | Ovaj rad |
| YEp351(*SCW4*Δ231*)* | Plazmid sadrži gen *SCW4* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije ima deletiranu regiju od 21. do 230. aminokiselinskog ostatka nemodificiranog Scw4. | AmpR, *LEU2* | Ovaj rad |
| YEp351(*SCW4*Δ246*)* | Plazmid sadrži gen *SCW4* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije ima deletiranu regiju od 21. do 245. aminokiselinskog ostatka nemodificiranog Scw4. | AmpR, *LEU2* | Ovaj rad |
| pBG1805(*SCW10*K*)* | Plazmid sadrži gen *SCW10* (His6-HA-3C-ZZ biljeg) čija ekspresija pod kontrolom promotora *GAL1*. Produkt ekspresije ima na pozicijama od 23. do 29. aminokiselinskog ostatka slijed VLGALLG, umjesto slijeda RHKHEKR koji se nalazi u nemodificiranom Scw10 | AmpR, *URA3* | Ovaj rad |
| pBSY3Z | Plazmidni vektor za ekspresiju željenog gena u stanicama *K. phaffii* pod kontrolom metanol inducibilnog promotora *PDC*. Vektor se ugrađuje u genom navedenog kvasca ilegitimnom rekombinacijom. | ZeoR | Bisy – Biology for Synthesis |
| pRS425Ccw12XR | Plazmid sadrži gen *GRE3* fuzioniran s regijom gena *CCW12* koja kodira za signalnu sekvencu za vezanje na GPI | Amp, | Hossain i sur., 2019 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | sidro pod kontrolom promotora *GAL1* koji omogućava ekspresiju gena u kvascau *S. cerevisiae* | *LEU2* | |
| Yep351Pir4XR | Plazmid sadrži gen *GRE3* fuzioniran s genom *PIR4* pod kontrolom promotora *GAL1* koji omogućava ekspresiju gena u kvascau *S. cerevisiae* | Amp, *LEU2* | Hossain i sur., 2019 |
| pBSY3ZCcw12XR | Plazmid sadrži gen *GRE3* fuzioniran s regijom gena *CCW12* koja kodira za signalnu sekvencu za vezanje na GPI sidro pod kontrolom promotora *PDC* koji omogućava ekspresiju produkta u stanicama *K. phaffii* | ZeoR | Ovaj rad |
| pBSY3ZPir4XR | Plazmid sadrži gen *GRE3* fuzioniran s genom *PIR4* pod kontrolom promotora *PDC* koji omogućava ekspresiju produkta u stanicama *K. phaffii* | ZeoR | Ovaj rad |

3.1.7. Oligonukleotidi

Sekvence oligonukleotida korištenih pri izradi disertacije prikazane su u **Tablici 9**.

**Tablica 9.** Oligonukleotidi korišteni prilikom izrade disertacije

| **Početnica** | **Sekvenca** |
|---|---|
| Galprom_F | GCTGGAGCTCCACCGCGGGAACGGATTAGAAGCC |
| XbaIScw4_R | ATGATGATGTCTAGATTCATTGGATAG |
| ΔVR2_F | GTTTCCATTGGTAACGAATTGGTTAACAGATCTGCCTTGAAGGCTGCC |
| ΔVR2_R | GGCAGCCTTCAAGGCAGATCTGTTAACCAATTCGTTACCAATGGAAAC |
| Δ176_F | TTATCTGCTGCTACTCTTGCTGCTGTTGAAAATGTTTTCAAGGCTAAG |

| | |
|---|---|
| Δ176_R | CTTAGCCTTGAAAACATTTTCAACAGCAGCAAGAGTAGCAGCAGATAA |
| Δ202_F | CTGCTGCTACTCTTGCTGCTGGTGTCAACACCATCAAGTCTGC |
| Δ202_R | GCAGACTTGATGGTGTTGACACCAGCAGCAAGAGTAGCAGCAG |
| Δ231_F | CTGCTGCTACTCTTGCTGCTGGTAACCAAGCTACCCC |
| Δ231_R | GGGGTAGCTTGGTTACCAGCAGCAAGAGTAGCAGCAG |
| Δ246_F | CTGCTGCTACTCTTGCTGCTGGTAGATCTGCCTTGAAGGC |
| Δ246_R | GCCTTCAAGGCAGATCTACCAGCAGCAAGAGTAGCAGCAG |
| mutRV2_F | TGCTCTTCTTGGTTACATTGACTCTGGTAGATC |
| mutRV2_R | CCTAAAACTAAAGCGTTACCGTTAACCAATTC |
| mutRV1_F | TCTTGGTGGTGTCAACACCATCAAG |
| mutRV1_R | CCTAAAACTAAAGCGTTACCGTTAACCAATTC |
| mutQ1_F | AACGTCGCTACCCCATCCCAAGTC |
| mutQ1_R | ACCGTTAACCAATTCGTTACCAATGGAAAC |
| mutQ2_F | CTGTCGGTCAATACATTGACTCTGGTAG |
| mutQ2_R | CGGATGGGGTAGCTTGGTTACCGTT |
| mutQ3_F | CATTGACTCTGGTAGATCTGCCTTG |
| mutQ3_R | TAAGCACCGACTTGGGATGGGGTAGC |
| mutQKQ/AKA_F | AGCTACCACTATCATTGTTAATGG |
| mutQKQ/AKA_R | TTAGCAACAGTGGTAGTGACCAC |

| | |
|---|---|
| Scw10K_F | TGCTGTTGCTGACGTTGTTACTGCCACAG |
| Scw10K_R | ACAGCAACAGCAACAGCAGGAGCTCCTAG |
| Ccw12XR_F | CCGTACGGCTCTTCCATGCAATTTTCTACTGTCGC |
| Ccw12XR_R | GCCGCTTATGAAGAGCCTGGAGCTCTCCG |
| Pir4XR_F | CGTACGGCTCTTCCATGCAATTCAAAAACGTCGCCC |
| Pir4XR_R | GGCCGCTTATGAAGAGCGCCTCACTGATGATTCG |

3.1.8. Proteomi kvasaca

Reference proteomi kvasaca korištenih za sistematsku usporedbu i pronalazak ortologa proteina koji čine sastavni dio proteoma stijenke dane su u **Tablici 10**. Proteomi su preuzeti iz UniProt baze podataka.

**Tablica 10.** Reference proteoma kvasaca i oznake pripadajućih sojeva korišteni za sistematsku usporedbu proteoma stijenke

| Vrsta | Oznaka soja | Referenca |
|---|---|---|
| *Saccharomyces cerevisiae* | S288C | Liachko i sur., 2013. |
| *Saccharomyces cerevisiae v. boulardii* | biocodex | Khatri i sur., 2017. |
| *Saccharomyces eubayanus* | CBS 12357T | Baker i sur., 2015. |
| *Kluyveromyces marxianus* | DMKU3-1042/ NBRC 104275 | Lertwattanasakul i sur., 2015. |
| *Kluyveromyces lactis* | ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37 | Stark i sur., 1984; Tommasino, Ricci i Galeotti, 1988; Dujon i sur., 2004; Zivanovic i sur., 2005. |

| | | |
|---|---|---|
| *Torulaspora delbrueckii* | ATCC 10662 / CBS 1146 / NBRC 0425 / NCYC 2629 / NRRL Y-866 | Gordon i sur., 2011. |
| *Eremothecium gossypii* | ATCC 10895 / CBS 109.51 / FGSC 9923 / NRRL Y-1056 | Dietrich i sur., 2004., 2013. |
| *Pichia kudriavzevii* | SD108 | Xiao i sur., 2014. |
| *Pichia membranifaciens* | NRRL Y-2026 | Riley i sur., 2016. |
| *Brettanomyces bruxellensis* | Multiple strains | Hellborg i Piškur, 2009. |
| *Hanseniaspora osmophila* | AWRI3579 | Sternes i sur., 2016. |
| *Hanseniaspora uvarum* | DSM 2768 | Langenberg i sur., 2017. |
| *Yarrowia lipolytica* | W29/CLIB89 | Magnan i sur., 2016. |
| *Debaryomyces hansenii* | CBS767 | Sacerdot i sur., 2008. |
| *Metschnikowia bicuspidata v. bicuspidata* | NRRL YB-4993 | Riley i sur., 2016. |
| *Blastobotrys adeninivorans* | LS3 | Kunze i sur., 2014. |
| *Schizosaccharomyces japonicus* | yFS275 / FY16936 | Rhind i sur., 2011. |
| *Schizosaccharomyces pombe* | 972 / ATCC 24843 | Wood i sur., 2002. |

## 3.2. METODE ISTRAŽIVANJA

### 3.2.1. Sistematska usporedba proteoma stanične stijenke

Proteomi dobiveni pronalaskom i anotacijom ORF-ova (en. *Open Reading Frame*) u dostupnim sekvencama genoma preuzeti su iz UniProt baze podataka. Analiza proteoma stanične stijenke provodi se usporedbom čitavih proteoma odabranih kvasaca s proteomom stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* korištenjem dostupnog online alata OrthoVenn. OrthoVenn omogućava pronalazak ortologa i formiranje klastera pojedine skupine proteina. Ortologni klasteri definirani su korištenjem inflacijske vrijednosti od 1.5 za određivanje strukture klastera. Prema preporuci (Wang i sur., 2015), za računanje paralelne usporedbe genoma i anotiranje otkrivenih klastera korištena je „cut-off" E-vrijednost od $10^{-5}$. Popis proteina obuhvaćen analizom te koji je definiran kao dio proteoma stijenke formiran je na temelju rada Orlean, 2012.

### 3.2.2. Uzgoj kvasaca

Kvasci korišteni za analizu proteinskih profila stanične stijenke uzgajani su u YM mediju uz glukozu kao izvor ugljika pri 30°C, izuzev vrsti iz roda *Metschnikowia* koji su uzgajani pri 24°C te uzorka *S. cerevisiae* čiji je profil korišten za usporedbu s njima. Kvasac *S. cerevisiae* za potrebe analize proteina Scw4 i Scw10 te njihovih mutanata eksprimiranih s plazmida uzgajao se standardno u YNB mediju pri odgovarajućim selektivnim uvjetima. Za potrebe indukcije promotora *GAL1*, kvasac se prvo uzgaja u podlozi s rafinozom kao izvorom ugljika kako bi došlo do derepresije promotora, a potom se prebacuje u podlogu s galaktozom pri čemu dolazi do indukcije promotora. Kvasac *K. phaffii* transformiran plazmidom koji nosi rekombinantni *PIR4GRE3* ili *GRE3CCW12* uzgaja se u YPD podlozi sa sorbitolom kao izvorom ugljika. Indukcija promotora *PDC* postiže se dodatkom 0,5% (v/v) metanola.

### 3.2.3. Obilježavanje i izolacija proteina stijenke

Za obilježavanje i izolaciju proteina stijenke kvasci su uzgajani pri 30°C (izuzev kvasaca iz roda *Metschnikowia* koji je uzgajan pri 24°C). Za potrebe analize promjena u ekspresiji proteina stanične stijenke u uvjetima temperaturnog šoka, kvasci su prvo uzgojeni pri 30°C, a potom inkubirani 1h pri 42°C. Nakon uzgoja, stanice su odcentrifugirane pri 6000 o/min te je talog stanica ispiran 2x deioniziranom vodom i 2x K-fosfatnim puferom pH 8. Potom su stanice resuspendirane u istom puferu uz dodatak 0.5 mg $mL^{-1}$ EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin reagensa te inkubirane 90 min na ledu. Po isteku vremena inkubacije, uklonjena je otopina reagensa te su stanice ispirane 2x TM puferom i 2x K-fosfatnim puferom pH 8.

Stanice resuspendirane u K-fosfatnom puferu pH 8 potom su mehanički razbijane upotrebom staklenih kuglica i BeadBug homogenizatora (Benchmark Scientific, Inc., SAD). Centrifugiranjem pri 8000 o/min odvajaju se stanične stijenke od intracelularnog sadržaja koje se potom ispiru 4x K-fosfatnim puferom pH 8. Nekovalentno vezani proteini potom su izolirani inkubacijom u 1 mL Laemmli pufera (bez glicerola) 10 minuta u vrijućoj kupelji. SDS ekstrakt proteina dobiven ovim postupkom odvaja se od staničnih stijenki i čuva na -20°C. Ovaj postupak se ponavlja još 2 puta kako bi se uklonili svi nekovalentno vezani proteini u stijenci. Potom se ukupna količina stijenki podijeli na dva jednaka dijela pri čemu se jedan dio tretira s 30 mM NaOH uz prekonoćnu inkubaciju pri +4 °C. Ovim postupkom dolazi do izolacije proteina vezanih na stijenku vezom nestabilom u lužnatom. Druga polovica stijenki ispire se K-fosfatnim puferom pH 6 u kojem se stijenke nakon toga i resuspendiraju uz dodatak 9 U β-1,3-glukanaze. Tako pripremljeni uzorak potom se inkubira 2h pri 55°C, a time se postiže izolacija svih kovalentno vezanih proteina stijenke. Semi-kvantitativnost postupka postiže se vaganjem mokre mase stijenki u koraku koji prethodi izolaciji nekovalentno vezanih proteina stijenke te skaliranjem volumena ekstakata koji se koriste za imunoblot analizu s obzirom na masu stijenki iz kojih je ekstrakt dobiven.

Prilikom izolacije proteina stijenke kvasca *S. cerevisiae* za potrebe analize proteina Scw4 i Scw10, stanice se neposredno nakon uzgoja odvajaju od medija te ispiru 2x deioniziranom vodom i 2x K-fosfatnim puferom pH 8. Nakon toga provodi se razbijanje stanica i izolacija stijenki na prethodno opisani način. Izolacija nekovalentno vezanih proteina također se provodi na prethodno opisan način, a kovalentno vezana frakcija proteina Scw4 i Scw10 provodi se tako da se ukupna masa stijenki u cijelosti tretira 30 mM NaOH, bez tretmana dijela stijenki β-1,3-glukanazom. Proteini stijenke *K. phaffii* izoliraju se također istim protokolom, a izolacija kovalentnih proteina može biti provedena ili tretmanom 30 mM NaOH ili β-1,3-glukanazom, ovisno o korištenom sustavu imobilizacije proteina na staničnoj površini.

### 3.2.4. Elektroforeza i imunoblot

Elektroforeza izoliranih proteina stijenke obilježenih biotinom provodi se prema metodi po Laemmliju (Laemmli, 1970). Ukratko, elektroforeza se provodi u diskontinuiranom sustavu koji se sastoji od gela za sabijanje uzoraka i gela za razdvajanje uzoraka. Gornji gel za sabijanje uzoraka sadrži 4.5 g $L^{-1}$ akrilamida, 1.2 g $L^{-1}$ *N, N'*-bisakrilamida, 1 g $L^{-1}$ SDS, 1 µL $mL^{-1}$ *N, N, N', N'*- tetrametiletilendiamina (TEMED) i 1 g $L^{-1}$ amonij persulfata (APS) otopljenih u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8,8. Gel za razdvajanje uzoraka sadrži 120 g $L^{-1}$ akrilamida, 3 g *N,*

*N'*-bisakrilamida, 1 g $L^{-1}$ SDS, 1 µL $mL^{-1}$ TEMED-a i 1 g $L^{-1}$ APS-a otopljenih u 50 mM Tris-HCl puferu pH 6,8. Uzorci se prije nanošenja tretiraju Laemmli puferom kako bi se postigla denaturacija proteina. Uzorci se na elektroforezi razdvajaju pri naponom od 180 V, a tijek elektroforeze prati se migracijom boje brom fenol plavo te se elektroforeza zaustavlja kada boja dosegne donji rub gela. Prijenos proteina na PVDF membranu provodi se upotrebom uređaja za polu-suhi transfer proteina (TransBlot Turbo, BioRad) uz korištenje Towbin pufera i trajanje prijenosa od 20 min pri naponu od 25 V i jakosti struje od 1 A. Nakon prijenosa, membrana se blokira inkubacijom od jednog sata u puferu za blokiranje uz 5% (m/v) BSA (albumin iz goveđeg seruma). Potom se uklanja otopina za blokiranje te se na membranu dodaje streptavidin-peroksidaza konjugat (Pierce, Thermo Scientific) razrijeđen u puferu za blokiranje uz dodatak 1% (m/v) BSA te se u pripremljenoj otopini membrana inkubira 1 sat. Po proteku vremena inkubacije, membrana se ispire tri puta puferom za blokiranje te se dodaju supstrati peroksidaze u obliku komercijalno dostupnih ECL otopina (BioRad). Vizualizacija se provodi korištenjem C-digit skenera (LI-COR Biosciences), a dobivene slike obrađuju se korištenjem Image Studio Software (LI-COR Biosciences).

Elektroforeza proteina Scw4 i Scw10 *S. cerevisiae*, kao i rekombinantnih proteina izoliranih iz stijenke *K. phaffii* provodi se također prethodno opisanom metodom po Laemmli-ju pri čemu gel za razdvajanje može sadržavati 12% (m/v) ili 10% (m/v) akrilamida, ovisno o potrebi stupnja razdvajanja proteinskih vrpci. Po završetku elektroforeze proteini se prenose na nitroceluloznu membranu pri istim, prethodno opisanim uvjetima prijenosa korištenjem sustava za polu-suhi prijenos. Membrane se potom blokiraju dodatkom pufera za blokiranje uz 1% (m/v) bezmasnog obranog mlijeka u prahu tijekom 1h. Zatim se otopina za blokiranje uklanja, a na membranu se dodaju antitijela anti-HA (Roche) konjugirana s perokisdazom, koja prepoznaju haemaglutininski biljeg kojim su obilježeni Scw4, Scw10 te rekombinantni proteini ekspirimirani u *K. phaffii*, otopljena u puferu za blokiranje te se membrana u istom inkubira tijekom 1,5-3 h pri sobnoj temperaturi ili prekonoćno na +4°C. Po isteku vremena inkubacije, membrana se ispire 3 puta puferom za blokiranje i tretira ECL otopinama. Vizualizacija se provodi ili korištenjem skenera na prethodno opisani način ili upotrebom rendgenskih (RTG) filmova. Duljina ekspozicije RTG filmova obično traje 120 min.

### 3.2.5. Konstrukcija plazmida YEp351(*SCW4*ΔVR2), YEp351(*SCW4*Δ176), YEp351(*SCW4*Δ231) i YEp351(*SCW4*Δ246)

Plazmidi YEp351(*SCW4*ΔVR2), YEp351(*SCW4*Δ176), YEp351(*SCW4*Δ231) i YEp351(*SCW4*Δ246) konstruirani su metodom megapočetnica gdje je kao kalup za lančanu reakciju polimerazom korišten nemodificirani gen *SCW4* koji se nalazi na YEp351(*SCW4*) plazmidu. Metoda se provodi tako da se umnaža cijeli gen *SCW4,* izuzev regije koju želimo deletirati, iz dva dijela na način da se prvi dio gena umnaža korištenjem početnice Galprom_F i odgovarajuće nizvodne (en. *reverse*) početnice, a drugi dio gena korištenjem odgovarajuće uzvodne (en. *forward)* početnice te XbaIScw4_R u dvije odvojene lančane reakcije polimerazom (PCR). Korištena specifična nizvodna početnica prijanja uzvodno, a specifična uzvodna početnica nizvodno od regije koju želimo deletirati. Navedene početnice međusobno su komplementarne što rezultira time da je 3' kraj PCR produkta prve reakcije komplementaran 5' kraju PCR produkta druge reakcije. Potom se provodi novi PCR pri čemu produkti prve i druge reakcije postaju međusobni kalupi za daljnje umnožavanje, odnosno postaju megapočetnice, na način da se lanci jednog i drugog produkta međusobno sparuju na mjestu komplementarne regije. Nakon toga, slijedi novi krug PCR koji koristi produkt nastao u prethodnoj reakciji, a kao početnice se koriste Galprom_F i XbaIScw4_R. Cilj je ove reakcije dobiti dovoljnu količinu PCR produkta kako bi se isti kasnije mogao koristiti kao insert za ubacivanje u odgovarajući plazmidni vektor. Tako dobiveni produkti sadrže informaciju za sintezu produkta gena *SCW4* s delecijom određenih regija proteina. Popis plazmida te parova početnica korištenih za njihovu konstrukciju dan je u **Tablici 11**.

**Tablica 11.** Popis plazmida i početnica korištenih za njihovu konstrukciju metodom megapočetnica

| Plazmid | Parovi početnica |
|---|---|
| ***YEp351(*SCW4*ΔVR2)*** | Galprom_F i ΔVR2_R te ΔVR2_F i XbaIScw4_R |
| ***YEp351(*SCW4*Δ176)*** | Galprom_F i Δ176_R te Δ176_F i XbaIScw4_R |
| ***YEp351(*SCW4*Δ231)*** | Galprom_F i Δ231_R te Δ231_F i XbaIScw4_R |
| ***YEp351(*SCW4*Δ246)*** | Galprom_F i Δ246_R te Δ246_F i XbaIScw4_R |

Lančane reakcije polimerazom provođene su korištenjem komercijalno dostupne polimeraze *Taq* (NEB) prema slijedećim programima.

PCR reakcije 1 i 2 (umnaženje megapočetnica):
98°C, 1min; 30x (98°C, 15 sec; 65°C, 40 sec; 68°C 1 min/ kb); 68°C, 5 min
PCR reakcija 3 (reakcija megapočetnica)
98°C, 1min; 15x (98°C, 30 sec; 60°C, 1 min; 68°C 1 min/ kb); 68°C, 5 min
PCR reakcija 4 (umnažanje konačnog produkta)
98°C, 1min; 30x (98°C, 30 sec; 60°C, 1 min; 68°C 1 min/ kb); 68°C, 5 min

Dobiveni produkti provjeravani su restrikcijskom analizom te elektroforezom u agaroznom gelu, a produkti čija je ispravnost potvrđena takvom analizom, korišteni su kao inserti za ligaciju u pGEM-T Easy vektor.

Odabrani konstrukti izolirani su iz gela korištenjem Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR clean-up seta, prema uputama proizvođača. Koncentracija DNA u uzorku određena je upotrebom Qubit DNA BR seta i Qubit 3.0 fluorimetra (Invitrogen, Life Technologies) prema uputama proizvođača. Masa DNA inserta korištena za ligaciju određivana je prema formuli:

$$\frac{ng\ vektora\ x\ veličina\ inserta\ u\ kb}{veličina\ vektora\ u\ kb}\ x\ omjer\ vektor{:}insert\ = ng\ inserta$$

Kao vektor korišten je komercijalno dostupni pGEM-T Easy vektor iz istoimenog seta (Promega) veličine 3 kb (omjer insert: vektor 3:1) koji omogućuje ligaciju svih inserata umnoženih *Taq* polimerazom na principu TA ligacije te uz korištenje T4 DNA ligaze iz istog seta. Deset mikrolitara ligacijske smjese upotrebljeno je za transformaciju *E. coli*, soj DH5α. Analizom kolonija, odabrane su one koje su sadržavale odgovarajući plazmid što je potvrđeno restrikcijskom analizom. Na taj način dobivamo jako velik broj kopija željenog inserta koji je potom lako izrezati iz pGEM-T Easy plazmida korištenjem restrikcijskih mjesta uvedenih prvim i drugim PCR-om korištenjem Galprom_F i XbaIScw4_R početnica, a koje prepoznaju endonukleaza SacI (na početku gena/modificiranog gena *SCW4*) i endonukleaza XbaI (na kraju gena/modificiranog gena *SCW4*). Restrikcijska smjesa potom se razdvaja na agaroznoj gel elektroforezi, a željeni insert izolira se iz gela kako je prethodno rečeno. Ista restrikcijska mjesta postoje i na plazmidu YEp351(*SCW4*) koji se cijepa na isti način te se istim postupkom vektor YEp351 izolira iz gela. Ligacija inserta i vektora provodi se košištenjem komercijalno dostupne ligaze T4 (NEB) prema preporuci proizvođača, a masa inserta korištena za ligaciju određuje se prema istoj, gore navedenoj formuli. Omjer vektora i inserta kretao se od 1:1 do 1:3, ovisno o konstruktu. Ligacijskom smjesom transformirane su stanice *E. coli*, soj DH5α. Plazmidi su izolirani korištenjem Macherey-Nagel NucleoSpin Plasmid seta prema uputama proizvođača te je njihova ispravnost provjeravana restrikcijskom analizom.

### 3.2.6. Konstrukcija plazmida pBG1805(*SCW4*mutVR1), pBG1805(*SCW4*mutVR2), pBG1805(*SCW4*mutQ1), pBG1805(*SCW4*mutQ2), pBG1805(*SCW4*mutQ3), pBG1805(*SCW4*-QKQ/AKA), pBG1805(*SCW10K*)

Plazmidi pBG1805(*SCW4*mutVR1), pBG1805(*SCW4*mutVR2), pBG1805(*SCW4*mutQ1), pBG1805(*SCW4*mutQ2), pBG1805(*SCW4*mutQ3), pBG1805(*SCW4*-QKQ/AKA), pBG1805(*SCW10K)* konstruirani su umnažanjem cijelog plazmida pBG1805(*SCW4*), odnosno pBG1805(*SCW10*) parom početnica koji u ciljanoj regiji unosi promjene. Umnažanje se vrši lančanom reakcijom polimerazom *Q5* (NEB), a početnice su dizajnirane korištenjem online alata NEBaseChanger (https://nebasechanger.neb.com/). Popis plazmida i odgovarajući parova početnica dan je u **Tablici 12**.

**Tablica 12.** Popis plazmida konstruiranih u svrhu analize Scw4 i Scw10 te parova početnica korištenih za njihovu konstrukciju

| Plazmid | Parovi početnica |
|---|---|
| ***pBG1805(*SCW4*mutVR1)*** | mutRV1_F i mutRV1_R |
| ***pBG1805(*SCW4*mutVR2)*** | mutRV2_F i mutRV2_R |
| ***pBG1805(*SCW4*mutQ1)*** | mutQ1_F i mutQ1_R |
| ***pBG1805(*SCW4*mutQ2)*** | mutQ2_F i mutQ2_R |
| ***pBG1805(*SCW4*mutQ3)*** | mutQ3_F i mutQ3_R |
| ***pBG1805(*SCW4-*QKQ/AKA)*** | mutQKQ/AKA_F i mutQKQ/AKA_R |
| ***pBG1805(*SCW10*K)*** | Scw10K_F i Scw10K_R |

Korišteni program za umnažanje plazmida s unesenim mutacijama:

98°C, 45 sec; 25x (98°C, 10 sec; 65°C, 30 sec; 72°C 30 sec/ kb); 72°C, 2 min

Provjera uspješnosti PCR-a vršena je putem DNA elektroforeze u agaroznom gelu. Po utvrđivanju prisutnosti produkta odgovarajuće veličine, započinje se tzv. KLD reakcija koja je sastavni dio *Q5* Site-Directed Mutagenesis seta (NEB), a sastoji se od tretmana reakcijske smjese nakon provedenog PCR-a enzimima endonukleazom DpnI koji razgrađuje kalupnu DNA, kinazom koja fosforilira PCR produkt te ligazom koja omogućuje cirkularizaciju PCR produkta. Reakcija se provodi prema uputama proizvođača. Pet mikrolitara KLD reakcijske smjese koristi se za transformaciju *E. coli* soj NEB®5-alpha. Izolacija plazmida vrši se upotrebom Macherey-Nagel NucleoSpin Plasmid seta prema uputama proizvođača, a ispravnost plazmida provjerena je restrikcijskom analizom ili sekvenciranjem.

### 3.2.7. Konstrukcija plazmida pBSY3ZCcw12XR i pBSY3ZPir4XR

Plazmidi pBSY3ZCcw12XR i pBSY3ZPir4XR konstruirani su na način da su konstrukti Ccw12XR i Pir4XR umnoženi korištenjem plazmida pRS425Ccw12XR, odnosno YEp351Pir4XR kao kalupa. Navedena dva plazmida konstruirali su Hossain i sur. (2019), a omogućavaju ekspresiju rekombinantnog proteina Ccw12XR, odnosno Pir4XR u stanicama *S. cerevisiae*. Konstrukt Ccw12XR sastoji se od regije koja kodira za signalnu sekvencu za uključivanje proteina u sekretorni put, sekvence koja kodira za haemaglutininski biljeg, sekvence gena *GRE3* koji kodira za intracelularnu ksiloza-reduktazu kvasca *S. cerevisiae* te signalne sekvence za vezanje proteina na GPI sidro, a koja je sastavni dio gena *CCW12* kvasca *S. cerevisiae*. Ovaj konstrukt umnožen je parom početnica Ccw12XR_F i Ccw12XR_R. Konstrukt Pir4XR sastoji se od gena *PIR4* kvasca *S. cerevisiae*, regije razmaknice, gena *GRE3* te regije koja kodira za haemaglutininski biljeg. Konstrukt je umnožen korištenjem para početnica Pir4XR_F i Pir4XR_R.

Prilikom umnažanja navedenih konstrukata korištena je polimeraza *Taq*, a reakcija se odvijala prema sljedećem programu:

98°C, 1min; 30x (98°C, 30 sec; 60°C, 1 min; 68°C 1 min/ kb); 68°C, 5 min

Dobiveni konstrukt provjeravan je restrikcijskom analizom te potom ligiran u pGEM-T Easy vektor prema prethodno opisanom protokolu. Plazmidi izolirani iz *E. coli* izolirani su i provjeravani na prethodno opisane načine. PCR-om uvedena su restrikcijska mjesta koja prepoznaje endonukleaza SapI na oba kraja konstrukata što je poslužilo za izrezivanje inserta iz vektora pGEM-T Easy i ligaciju u vektor pBSY3Z pocijepan istom endonukleazom. Ligacijska smjesa iskorištena je za transformaciju *E. coli*, a potom su iz poraslih kolonija ponovno izolirani i provjeravani sada konačni plazmidi koji omogućavaju transformaciju *K. phaffii* i ekspresiju željenih konstrukata u navednom kvascu.

### 3.2.8. Elektroforetsko razdvajanje DNA u agaroznom gelu

Elektroforetsko razdvajanje molekula DNA provodi se u agaroznom gelu koji se dobiva polimerizacijom 1% (m/v) agaroze otopljene u TAE puferu. Za provođenje elektroforeze korišten je Sub-Cell GT (BioRad) sustav. Gelovi dimenzija 15x20 cm korišteni su u ovu svrhu te je elektroforeza provođena pri naponu od 90V u trajanju od oko 1 h. Nakon elektroforeze, gel se inkubirao u otopini etidij bromida te je vizualizacija vršena na Uvidoc (Uvitec, UK) transiluminatoru.

### 3.2.9. Transformacija *E. coli*

Alikvoti od 50 µL suspenzije komercijalno dostupnih kompetentnih stanica čuvaju se pri -72°C. Prilikom transformacije, alikvot se odmrzava na ledu nakon čega mu se dodaje 1-10 ng plazmidne DNA. Suspenzija stanica s dodanom DNA inkubira se na ledu 30 min. Kao pozitivna kontrola koristi se pUC19 (250 pg), a kao negativna pufer/deionizirana voda u kojem/kojoj je otopljena plazmidna DNA kojom vršimo transformaciju. Nakon proteka 30 min, provodi se temperaturni šok inkubacijom stanica 20 sec pri 42°C, a potom se stanice vraćaju na led u trajanju od 2 min. U suspenziju stanica dodaje se 950 µL LB neselektivnog medija te se inkubira 1 h pri 37°C. Nakon završetka inkubacije, smjesa se nacjepljuje na selektivne LBamp ili LBzeo koje sadrže odgovarajuće antibiotike.

### 3.2.10. Transformacija kvasca *S. cerevisiae*

Transformacija kvasca provedena je prema metodi Gietz i sur. (1995). Ukratko, kvasac uzgajamo do rane eksponencijalne faze rasta nakon čega izdvajamo $5x10^7$ stanica kvasca po transformaciji, odvajamo stanice od medija i ispiremo u sterilnoj deioniziranoj vodi, a potom i sterilnim 0,1 M litij acetatom. Nakon uklanjanja litij acetata, na talog stanica dodajemo redom 240 µL 50% (v/v) polietilen glikola 4000, 36 µL 1M litij acetata, 25 µL jednolančane (tzv. „*carrier DNA*“) te 50 µL pripremljene otopine plazmida (1 ng-1 µg) u sterilnoj deioniziranoj vodi. Uzorak se potom vorteksira do postizanja homogenosti i nakon toga inkubira 30 min pri 30°C. Potom se stanice izlažu temperaturnom šoku inkubacijom od 20 min pri 42°C. Stanice se zatim centrifugiraju 30 sekundi pri 8000 o/min i transformacijska smjesa se odvaja od taloga stanica. Stanice se resuspendiraju u odgovarajućem volumenu sterilne deionizirane vode i alikvot suspenzije nacjepljuje se na odgovarajuće selektivne ploče. Porast kolonija očekuje se 2 do 3 dana od transformacije.

### 3.2.11. Transformacija kvasca *K. phaffii*

Transformacija kvasca *K. phaffii* provodi se elektroporacijom. Prije same transformacije pripremaju se kompetente stanice kvasca na način da se kvasac prekonoćno uzgoji u neselektivnoj podlozi, a potom u jutro idućeg dana razrjeđuje na 0,15-0,2 $ODU_{600}$ u 50 mL YPD medija i uzgaja do dostizanja gustoće stanica od 0,8 do 1 $ODU_{600.}$ Stanice se potom odvajaju od medija i resuspendiraju u 9 mL ledeno hladnog BEDS pufera uz dodatak 1 mL 1 M ditiotreitola. Stanice se inkubiraju 5 min pri 30°C i 180 o/min te potom ponovno odvajaju od otopine. Stanice se resuspendiraju u BEDS puferu. Tako pripremljene stanice spremne su za elektroporaciju. Elektroporacija provodi se upotrebom elektroporatora na način da se 40 µL pripremljene suspenzije stanica dodaje u prethodno ohlađenu sterilnu kivetu za elektroporaciju te se u suspenziju dodaje 10 µg plazmidne DNA. Uzorak se inkubira na ledu 2 min, a potom se kiveta unosi u MicroPulser (BioRad) elektroporator i provodi se elektroporacija jednim pulsom napona 2 kV. Odmah po završetku postupka, u kivetu se dodaje pola mililitra ledeno hladnog 1 M sorbitola i pola mililitra hladnog YPD-a. Suspenzija stanica inkubira se 2 h do prekonoćno pri 30°C bez miješanja. Stanice se potom odvajaju od medija i resuspendiraju u malom volumenu sterilne deionizirane vode te nacjepljuju na selektivne ploče (YPD, 1 M sorbitol, 2% glukoza, zeocin).

### 3.2.12. Određivanje aktivnosti ksiloza-reduktaze

Aktivnost enzima ksiloza-reduktaza određivana je modificiranom metodom opisanu u Hossain i sur. (2019). Ukratko, stanice *K. phaffii* uzgojene su uz dodatak metanola za indukciju promotora *PDC*, odvojene od medija i resuspendirane na koncentraciju od 350 $ODU_{600}$ u 50 mM fosfat-citratnom puferu pH 5. Reakcijska smjesa sastoji se od 150 µL 50 mM fosfat-citratnog pufera, 20 µL ksiloze, 10 µL suspenzije stanica. Reakcijska smjesa predinkubira se 3 do 5 minuta pri 30°C te se u nju potom dodaje 20 µL 2 mM NADPH čime započinje reakcija. Nakon 10 min, reakcijska smjesa odvaja se od stanica i koristi se za mjerenje apsorbancije pri 340 nm. Mjernjem pada apsorbancije nakon 10 min pri 340 nm, moguće je odrediti stopu oksidacije NADPH kao ko-supstrata reakcije.

# 4. REZULTATI

## 4.1. REZULTATI SISTEMSKE USPOREDBE PROTEOMA STIJENKE

U svrhu razvoja sustava za izlaganje homolognih i heterolognih proteina na površini stanice u drugim kvascima izuzev kvasca *S. cerevisiae* potrebno je dobiti više informacija o proteinskom sastavu stijenki različitih kvasaca. Opsežna analiza proteina stijenke provedena je za kvasce *S. cerevisiae* i *C. albicans*, no postoji jako malo dostupnih podataka za proteine stijenke drugih kvasaca. S obzirom da najviše znamo o proteinima stijenke kvasca *S. cerevisiae* u ovoj disertaciji prikazani su rezultati usporedbe proteoma stijenke kvasca *S. cerevisiae* ograničenog na 93 proteina od kojih se većina nalazi u staničnoj stijenci, dok je 40 proteina uključeno u sintezu stijenke, s proteomima 17 vrsta kvasaca (**Tablice 13. i 14.).** U **Tablici 13**. vidimo prikaz rezultata pronalaženja ortologa proteina koji sudjeluju u sintezi stanične stijenke *S. cerevisiae* u drugim analiziranim kvascima. Rezultati pokazuju značajnu razinu konzerviranosti ovih proteina uz pronalazak ortologa gotovo svih analiziranih proteina u većini analiziranih vrsta. Kod proteina uključenih u sintezu hitina, nešto niži broj ortologa u različitim vrstama kvasaca vidimo za proteine Chs6 i Shc1 koji sudjeluju u transportu i aktivaciji hitin-sintaze Chs3. Međutim, valja imati na umu da Chs6 ima čak tri homologa u kvascu *S. cerevisiae* Bch1, Bch2 i Bud7 koji nisu obuhvaćeni ovom analizom, a Shc1 ima paraloga Skt5 koji je obuhvaćen analizom i pokazuje visok nivo evolucijske konzerviranosti u svim analiziranim kvascima. Stoga razlog ovim rezultatima vjerojatnije leži u divergenciji homolognih gena proizašlih iz WGD pri čemu dolazi do manjih međusobnih homologija. To rezultira slabijom sposobnošću pronalaska ortologa jednog od tako nastalih paraloga pa se prividno pojavljuje njihov nedostatak u analiziranim proteomima. Zanimljivo je još da je zabilježena relativno niska evolucijska očuvanost Yea4 koji ima ulogu transportera UDP-GlcNAc pri sintezi hitina te Inn1 koji se smatra esencijalnim u kvascu *S. cerevisiae (Sanchez-Diaz i sur., 2008),* a odgovoran je za uvrtanje membrane u grlo pupa tijekom citokineze uz aktiviranje hitin-sintaze Chs2. Pretpostavka je da te uloge u drugim vrstama kvasaca obavljaju drugi proteini, značajno različiti od ova dva proteina u *S. cerevisiae*.

U procesu sinteze β-1,6-glukana, Keg1 protein čija uloga nije u potpunosti jasna, ali je poznatno da pri navednom procesu stupa u interakciju s glukozil transferazom Kre6 nije prisutan u većini evolucijski udaljenijih kvasaca od kvasca *S. cerevisiae*. S obzirom na nejasnu ulogu ovog proteina, teško je govoriti o razlogu njegove slabije evolucijske konzerviranosti.

**Tablica 13.** Prikaz rezultata pronalaženja ortologa uključenih u sintezu stijenke u različitim kvascima. Brojevi u poljima označavaju broj pronađenih ortologa pojedinog proteina. S lijeve strane tablice naznačeni su procesi u kojima sudjeluju (sinteza hitina i glukana), porodica kojoj pripadaju (japsini) ili pak njihova specifična lokalizacija (na stijenci pupa ili spore).

| | **S. cerevisiae protein** | **Systematic name** | ***S. cerevisiae, var. boulardii*** | ***S. eubayanus*** | ***K. marxianus*** | ***K. lactis*** | ***T. delbrueckii*** | ***E. gossypii*** | ***P. kudriavzevii*** | ***P. membranifaciens*** | ***B. bruxellensis*** | ***H. osmophila*** | ***H. uvarum*** | ***Y. lipolytica*** | ***D. hansenii*** | ***M. bicuspidata*** | ***B. adeninivorans*** | ***S. japonicus*** | ***S. pombe*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **HITIN** | Cdc14 | YFR028C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Cdc28 | YBR160W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Chs1 | YNL192W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | - | 1 |
| | Chs2 | YBR038W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - |
| | Chs3 | YBR023C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Chs5 | YLR330W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Chs6 | YJL099W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| | Chs7 | YHR142W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Shc1 | YER096W | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 |
| | Skt5 | YBL061C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Pfa4 | YOL003C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Cyk3 | YDL117W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | 1 | - | - |
| | Dbf2 | YGR092W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Yea4 | YEL004W | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | - | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 |
| | Rcr1 | YBR005W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | Bni4 | YNL233W | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Inn1 | YNL152W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| **GLUKAN** | Kre5 | YOR336W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Kre6 | YPR159W | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Keg1 | YFR042W | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Gsc2 | YGR032W | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | - | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 4 |
| | Big1 | YHR101C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | Skn1 | YGR143W | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Rot1 | YMR200W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Fks1 | YLR342W | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | - | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 4 |
| | Fks3 | YMR306W | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| | Rho1 | YPR165W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | - | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| | Exg2 | YDR261C | 1 | 3 | - | - | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | Acf2 | YLR144C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | - | 2 |

| | S. cerevisiae protein | Systematic name | *S. cerevisiae, var. boulardii* | *S. eubayanus* | *K. marxianus* | *K. lactis* | *T. delbrueckii* | *E. gossypii* | *P. kudriavzevii* | *P. membranifaciens* | *B. bruxellensis* | *H. osmophila* | *H. uvarum* | *Y. lipolytica* | *D. hansenii* | *M. bicuspidata* | *B. adeninivorans* | *S. japonicus* | *S. pombe* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| JAPSINI | Yps1 | YLR120C | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 4 | - | 1 | 2 | 2 | 1 | - | - |
| | Mkc7 (Yps2) | YDR144C | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | - | 1 | 4 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | - | - |
| | Yps3 (Yps4) | YLR121C | 1 | 1 | - | - | - | 1 | 2 | - | 1 | 4 | - | 1 | 2 | 2 | 1 | - | - |
| | Yps6 | YIR039C | 1 | 2 | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | 2 | 1 | - | - |
| SPORA | Crr1 | YLR213C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | Cda1 | YLR307W | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Cda2 | YLR308W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Sps2 | YDR522C | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | - | 2 |
| | Sps22 | YCL048W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | - | 2 |
| PUP | Dfg5 | YMR238W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | 1 | 1 |
| | Dcw1 | YKL046C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |

Egzo-β-1,3-glukanaza Exg2 također se pokazala kao evolucijski slabije konzervirana, no s obzirom da čak tri gena kodiraju za egzoglukanaze u kvascu *S. cerevisiae,* te da najveću aktivnost ima Exg1 čiji su homolozi detektirani u većini drugih kvasaca, uključujući i *C. albicans* (Larriba i sur., 1993), koja nije obuhvaćena ovom analizom, za pretpostaviti je da ulogu Exg2 preuzimaju druge glukanaze.

Kod skupine japsinskih proteaza, nije poznato imaju li proteaze različite uloge i o kojim ulogama se radi, ali se vidi trend visoke evolucijske konzerviranosti ovih proteaza, uz manju iznimku Yps6 koji ima manje detektriranih ortologa. Proteini koji sudjeluju u sintezi stijenke spora uglavnom su evolucijski očuvani, izuzev proteina Crr1 čija se uloga ne zna, ali pretpostavlja se da sudjeluje u međusobnom umrežavanju glukana i hitozana. Cda1 i Cda2 dio su istog kompleksa koji sudjeluje u sintezi hitozana (Christodoulidou i sur., 1996), a s obzirom da je ortolog Cda2 prisutan u većini analiziranih vrsta, najvjerojatnije je taj proces očuvan u većini kvasaca unatoč smanjenom broju detektiranih ortologa Cda1.

Već prvi pogled na **Tablicu 14**. koja daje pregled rezultata pretrage homologa proteina lokaliziranih u stijenci kvasca *S. cerevisiae* pokazuje znatno drugačiju situaciju nego što je to bio prethodno opisani slučaj s proteinima važnima u sintezi stijenke. Proteini koji se nalaze u samoj stijenci pokazuju znatno nižu razinu evolucijske konzerviranosti. Prvu skupinu analiziranih proteina stijenke čine nekovalentno vezani proteini (Scw). Od svih proteina u

stijenci, ova skupina proteina pokazuje najviši stupanj konzerviranosti. Na prvi pogled čini se da ortologa nekoliko nekovalentno vezanih proteina stijenke *S. cerevisiae* nedostaje u drugim kvascima, no detaljnijom analizom jasno je kako je zapravo samo Srl1 vrlo specifičan za kvasce iz roda *Saccharomyces*. Funkcija ovog gena je nepoznata i stoga je teško govoriti zašto nije prisutan u drugim kvascima i je li njegova fiziološka uloga u drugim kvascima kompenzirana postojanjem sličnog proteina. Iz tablice je moguće vidjeti i da primjerice u većem broju vrsta nedostaju Spr1, Scw11 ili primjerice Cst2, no Spr1 ima paraloga Exg1, Cst2 ima paraloga Cst1, a Scw11 ima značajnu homologiju s glukanazama poput Bgl2 i vjerojatnim glukanazama Scw4 i Scw10. Analizom rezultata vidljivo je da kvasci koji nemaju prisutnost navedena tri proteina, imaju prisutnost njihovih paraloga i proteina slične funkcije što ponovno ukazuje na konzerviranost procesa/reakcija u kojima sudjeluju. Nedostatak pojedinih ortologa nekovalentno vezanih proteina stijenke pokazuje kvasac *Hanseniaspora uvarum*. Međutim, s obzirom da je prisustvo ortologa potvrđeno u vrlo srodnoj vrsti, *Hanseniaspora osmophila*, za pretpostaviti je da je navedeni rezultat posljedica ili specifičnosti analiziranog soja ili može ukazivati na probleme u samom sekvenciranju ili postupku pronalaženja ORF-ova u analiziranom soju. Također, ono što se ističe u analizi nekovalentno vezanih proteina jest da je najmanji broj ortologa ovih proteina kvasca *S. cerevisiae* vidljiv u evolucijski najudaljenijoj skupini kvasaca, a to su kvasci iz roda *Schizosaccharomyces*. *S. pombe* i *S. japonicus* pokazuju nedostatak svih potencijalnih glukanaza s međusobno visokim stupnjem homologije Scw4, Scw10 i Scw11, iako je u stijenci prisutna glukanaza Bgl2 koja najvjerojatnije obavlja ulogu preostalih glukanaza. Uz njih nedostaje i prethodno spomenuti protein Srl1, kao i endohitinaze Cst1 i Cst2. Također nedostaju ortolozi proteina Knh1 i Kre9 uključenih u biosintezu β-1,6-glukana. Takvi rezultati mogu ukazivati na postojanje drugih mehanizama remodeliranja stijenke kod kvasaca iz roda *Schizosaccharomyces* s obzirom da većina nekovalentno vezanih proteina u stijenkama kvasca većinom ima ulogu u tom procesu.

**Tablica 14.** Prikaz rezultata pronalaženja ortologa proteina lokaliziranih u stijenci u različitim kvascima. Brojevi u poljima govore o broju pronađenih ortologa pojedninog proteina.

| | S. cerevisiae protein | Sistemski naziv | *S. cerevisiae, var. boulardii* | *S. eubayanus* | *K. marxianus* | *K. lactis* | *T. delbrueckii* | *E. gossypii* | *P. kudriavzevii* | *P. membranifaciens* | *B. bruxellensis* | *H. osmophila* | *H. uvarum* | *Y. lipolytica* | *D. hansenii* | *M. bicuspidata* | *B. adeninivorans* | *S. japonicus* | *S. pombe* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SCW | Bgl2 (Scw9) | YGR282C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 |
| | Cts1 (Scw2) | YLR286C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | 3 | - | - |
| | Dse4 (Eng1) | YNR067C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | - | 2 |
| | Exg1 (Scw6) | YLR300W | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| | Scw10 | YMR305C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Scw4 | YGR279C | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Scw11 | YGL028C | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | 1 | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 | - | - | - |
| | Sun4 (Scw3) | YNL066W | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 |
| | Srl1 | YOR247W | 1 | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Spr1 | YOR190W | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| | Cts2 | YDR371W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - |
| | Knh1 | YDL049C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | - | - |
| | Kre9 | YJL174W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | - | - |
| GPI-CWP | Aga1 | YNR044W | - | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Sag1 (Agα1) | YJR004C | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Ccw12 | YLR110C | 1 | 1 | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - |
| | Ccw14 | YLR390W-A | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| | Cwp1 | YKL096W | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 5 | - | - | - | 2 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | Cwp2 | YKL096W-A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | Dan1 (Ccw13 | YJR150C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Dse2 | YHR143W | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | - | 1 | - | - |
| | Ecm33 | YBR078W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 2 | 2 |
| | Pst1 | YDR055W | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 2 | 2 |
| | Egt2 | YNL327W | 1 | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| | Fig2 | YCR089W | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Fit1 | YDR534C | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Fit2 | YOR382W | 1 | 1 | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Fit3 | YOR383C | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Dan4 | YJR151C | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - |
| | Kre1 | YNL322C | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Flo1 | YAR050W | 1 | 1 | 8 | 9 | 1 | - | - | - | 3 | 18 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | Flo10 | YKR102W | - | - | - | - | - | - | - | - | 3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Flo5 | YHR211W | - | - | - | - | - | - | - | - | 3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Flo9 | YAL063C | - | - | - | - | - | - | - | - | 3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Flo11 | YIR019C | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 18 | - | 1 | - | 1 | 1 |
| | Sed1 | YDR077W | 1 | - | 1 | - | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Spi1 | YER150W | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Tip1 | YBR067C | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Tir1 (Srp1) | YER011W | 2 | - | - | - | - | 1 | - | - | 4 | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | Tir2 (Srp2) | YOR010C | 2 | - | - | - | 1 | 1 | - | - | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Tir3 (Yib1) | YIL011W | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Tir4 | YOR009W | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Crh1 | YGR189C | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | 2 | 1 | 1 | - | 1 | - |
| | Utr2 (Crh2) | YEL040W | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | 2 | 1 | - | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Gas1 | YMR307W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| | Gas3 | YMR215W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| | Gas2 | YLR343W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - |
| | Gas4 | YOL132W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| | Gas5 | YOL030W | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 2 | 1 | - | 2 |

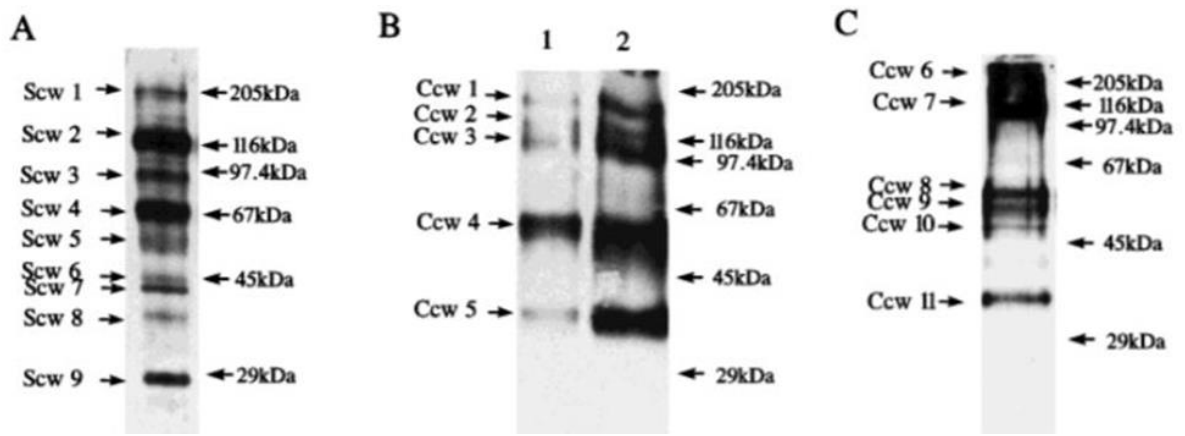
| | S. cerevisiae protein | Sistemski naziv | *S. cerevisiae, var. boulardii* | *S. eubayanus* | *K. marxianus* | *K. lactis* | *T. delbrueckii* | *E. gossypii* | *P. kudriavzevii* | *P. membranifaciens* | *B. bruxellensis* | *H. osmophila* | *H. uvarum* | *Y. lipolytica* | *D. hansenii* | *M. bicuspidata* | *B. adeninivorans* | *S. japonicus* | *S. pombe* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PIR | Pir1 (Ccw6) | YKL164C | - | - | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| | Pir2 (Hsp150) | YJL159W | - | - | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| | Pir3 (Ccw8) | YKL163W | - | - | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| | Pir4 (Cis3) | YJL158C | 1 | 1 | - | 2 | - | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | - | 1 | - | - | - |

Drugu skupinu proteina stijenke obuhvaćenih ovom analizom čine GPI proteini vezani u stijenku kovalentno, preko GPI sidra. Ova skupina proteina stijenke *S. cerevisiae* ima znatno manje ortologa u drugim kvascima. Kao evolucijski očuvani pokazuju se β-1,3-glukanoziltransferaze koje sudjeluju u organizaciji β-1,3-glukana pa ne čudi njihova prisutnost u svim analiziranim kvascima. Zanimljivo, visok stupanj konzerviranosti pokazuju i Ecm33 i njegov paralog Pst1 čija uloga nije u potpunosti poznata. Međutim primjećeno je da nedostatak Ecm33 uzrokuje poremećaj u strukturi stijenke i dovodi do aktivacije MAPK signalnog puta (Pardo i sur., 2004) što ukazuje da ovaj protein igra značajnu ulogu u formiranju stijenke u svim analiziranim vrstama kvasaca. Evolucijski su relativno očuvani i flokulini, za koje u pojedinim vrstama kvasaca pronalazimo velike brojeve ortolognih gena.

Posljednju skupinu analiziranih proteina stijenke čine Pir proteini vezani u stijenku kovalentnom vezom nestabilnom u lužnatom. Ortologe ovih proteina pronalazimo u većini kvasaca, izuzev evolucijski udaljenijih vrsta *D. hanseni*, *B. adeninivorans* te *S. pombe* i *S. japonicus*.

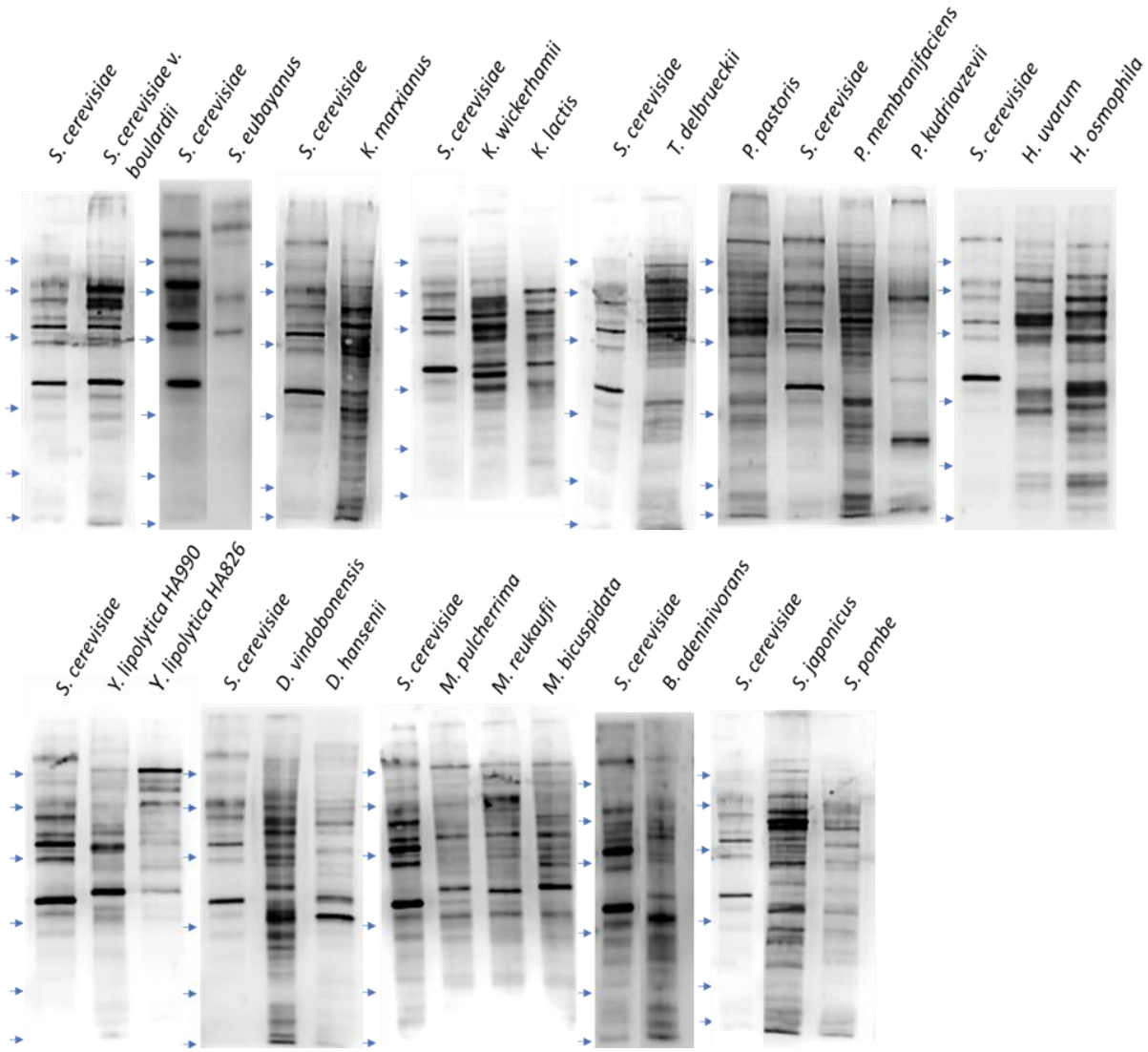
## 4.2. REZULTATI ANALIZE PROTEINSKIH PROFILA STIJENKE

Rezultati analize usporedbe proteoma pokazuju nam prisustvo ortolognih gena u analiziranim kvascima, no ne daje nam dovoljno informacija o proteinskom sastavu stijenke pojedinih kvasaca u smislu identifikacije pojedinačnih proteina. Za razvoj novih sustava izlaganja proteina na površini stijenke i pronalazak odgovarajućih vrsta kvasaca kao domaćina za ove sustave važna je informacija koliko i kakve proteine možemo pronaći u stijenkama različitih kvasaca pri uzgoju u standardnim laboratorijskim uvjetima. Jedan od relativno jednostavnih i informativnih pristupa je izrada proteinskih profila stijenke koji se temelje na specifičnom obilježavanju proteina na staničnoj površini EZ-Sulfo-NHS-LC-LC-biotin reagensom te selektivnom izolacijom proteina stijenke na temelju njihovog načina ugradnje u stijenku. Nekovalentno vezani proteini izolirani su tretmanom vrućim SDS-om u reducirajućim uvjetima te će se ovako dobiveni ekstrakti u nastavku teksta nazivati SDS ekstraktima. Proteini vezani kovalentnom vezom nestabilnom u lužnatom izolirani su tretmanom stijenki, prethodno tretiranih SDS-om, s 30 mM NaOH te će se isti u nastavku teksta nazivati pojednostavljeno NaOH ekstraktima. Proteini vezani na stijenku kovalentno, bilo preko GPI sidra ili kovalentnom vezom nestabilnom u lužnatom, izolirani su tretmanom stijenki, prethodno tretiranih SDS-om, pomoću β-1,3-glukanaze pa će se u nastavku teksta ova vrsta ekstrakta nazivati β-glukanaznim ekstraktom. Ovakva analiza proteinskih profila provedena je za kvasac *S. cerevisiae*, kao što je ranije spomenuto, te su identificirani proteini kojima pripadaju pojedine proteinske vrpce u ekstraktima što je i prikazano na **Slici 5.**



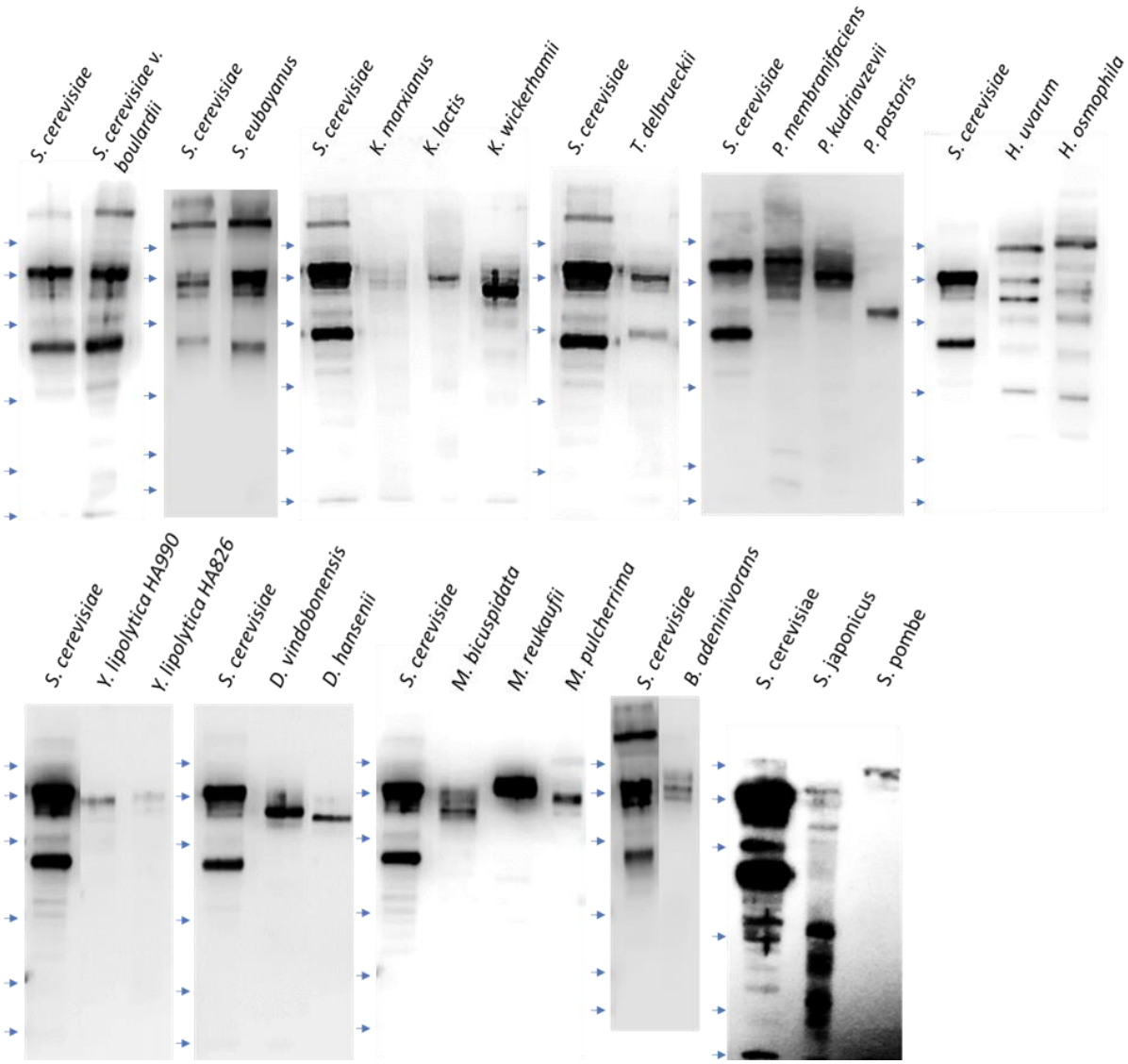

**Slika 5.** Prikaz biotiniliranih proteina stijenke kvasca *S. cerevisiae* izoliranih tretmanom SDS-om (A), zimolijazom (B) i 30 mM NaOH (C). Proteini su razdvojeni SDS elektroforezom na poliakrilamidnom gelu i vizualizirani korištenjem konjugata streptavidin-peroksidaza. (Preuzeto i prilagođeno iz Mrša i sur., 1997).

S obzirom na to, moguće je provesti isti postupak za obilježavanje i ekstrakciju proteina stijenke drugih kvasaca te profile usporediti s profilima proteina stijenke *S. cerevisiae*. Za analizu odabrana je 21 vrsta kvasaca, uključivši 16 vrsta prisutnih u analizi usporedbe proteoma stijenki. Na **Slici 6.** prikazani su proteinski profili proteina stijenki prisutnih u SDS ekstraktu. S obzirom na velik broj proteinskih vrpci u ovom ekstraktu, najteže je provesti usporednu analizu proteinskih profila različitih kvasaca. Ono što je vidljivo jest da je proteinski profil *S. cerevisiae* vrlo sličan još proteinskim profilima *Saccharomyces eubayanus* te *K. marxianus* i *K.lactis*, dok se već kod iduće grupe evolucijski nešto udaljenijih kvasaca značajno razlikuje. Najveće razlike proteinskih profila unutar roda pokazuju kvasci iz roda *Pichia*, s napomenom da je pri ovoj analizi u istoj grupi analizirana *Komagataella phaffii* koja je donedavno spadala u ovaj rod, ali je kasnijom klasifikacijom izdvojena u novu taksonomsku grupu. Također, zanimljivo je da razlike u proteinskim profilima pokazuju i dva soja iste vrste kvasca, *Yarrowia lipolytica*, koja u istom mediju pokazuju dva različita tipa rasta pri čemu soj HA826 raste u formi pupajućeg kvasca, dok soj HA990 preferencijalno raste u formi pseudohifa što bi ukazivalo na potencijalno različitu ekspresiju proteina stijenke ovog kvasca, ovisno o načinu njegova rasta.




**Slika 6.** Proteinski profili stijenki dobivenih ekstrakcijom proteina tretmanom vrućim SDS-om u reducirajućim uvjetima. Proteini su razdvojeni SDS elektroforezom u 12%-tnom poliakrilamidnom gelu. Veličine standarda iznose redom 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20.1 kDa i 14.4 kDa.

Proteinski profili stijenki kvasaca u NaOH ekstraktu dani su na **Slici 7.** Kod ovog ekstrakta već vidimo značajnu razliku u profilima ne-*Saccharomyces* kvasaca pri čemu većina kvasaca ima tek jednu do dvije izražene proteinske vrpce. Više proteinski vrpci vidljivo je kod kvasca iz roda *Hanseniaspora*.

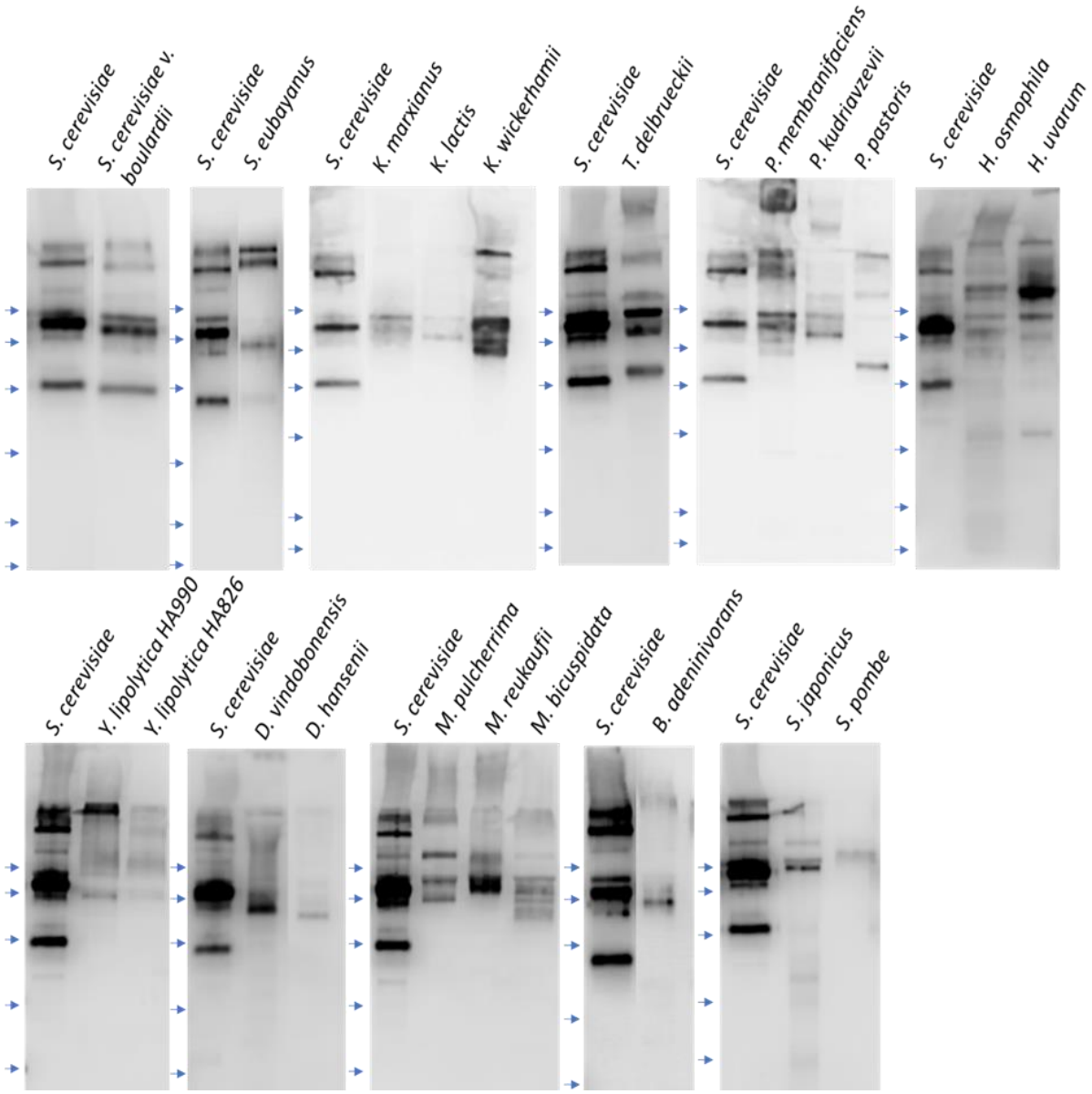



**Slika 7.** Proteinski profili stijenki dobivenih ekstrakcijom proteina tretmanom 30 mM NaOH, nakon što su prethodno sa stijenke uklonjeni nekovalentno vezani proteini. Proteini su razdvojeni SDS elektroforezom u 12%-tnom poliakrilamidnom gelu. Veličine standarda iznose redom 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20.1 kDa i 14.4 kDa.

S obzirom na značajno manji broj proteinski vrpci u NaOH ekstraktu u odnosu na SDS ekstrakt te specifičnost vezanja proteina koji se ekstrahiraju u lužnatom, moguće je izvući više informacija analizom ovih proteinskih profila u odnosu na prethodne. Vrlo je važna usporedba rezultata komparativne analize proteoma i rezultata analize proteinskih profila. Na temelju takve usporedbe, vidljivo je da se broj detektiranih vrpci u NaOH ekstraktu razlikuje od broja ortologa Pir proteina koje u ovom ekstraktu očekujemo temeljeno na komparativnoj analizi proteoma. Kod triju analiziranih vrsta iz roda *Kluyveromyces* pronalazimo 1 proteinsku vrpcu koja nije iste veličine kod sva tri kvasca, a masa vrpce kreće se između 60-66 kDa. Broj

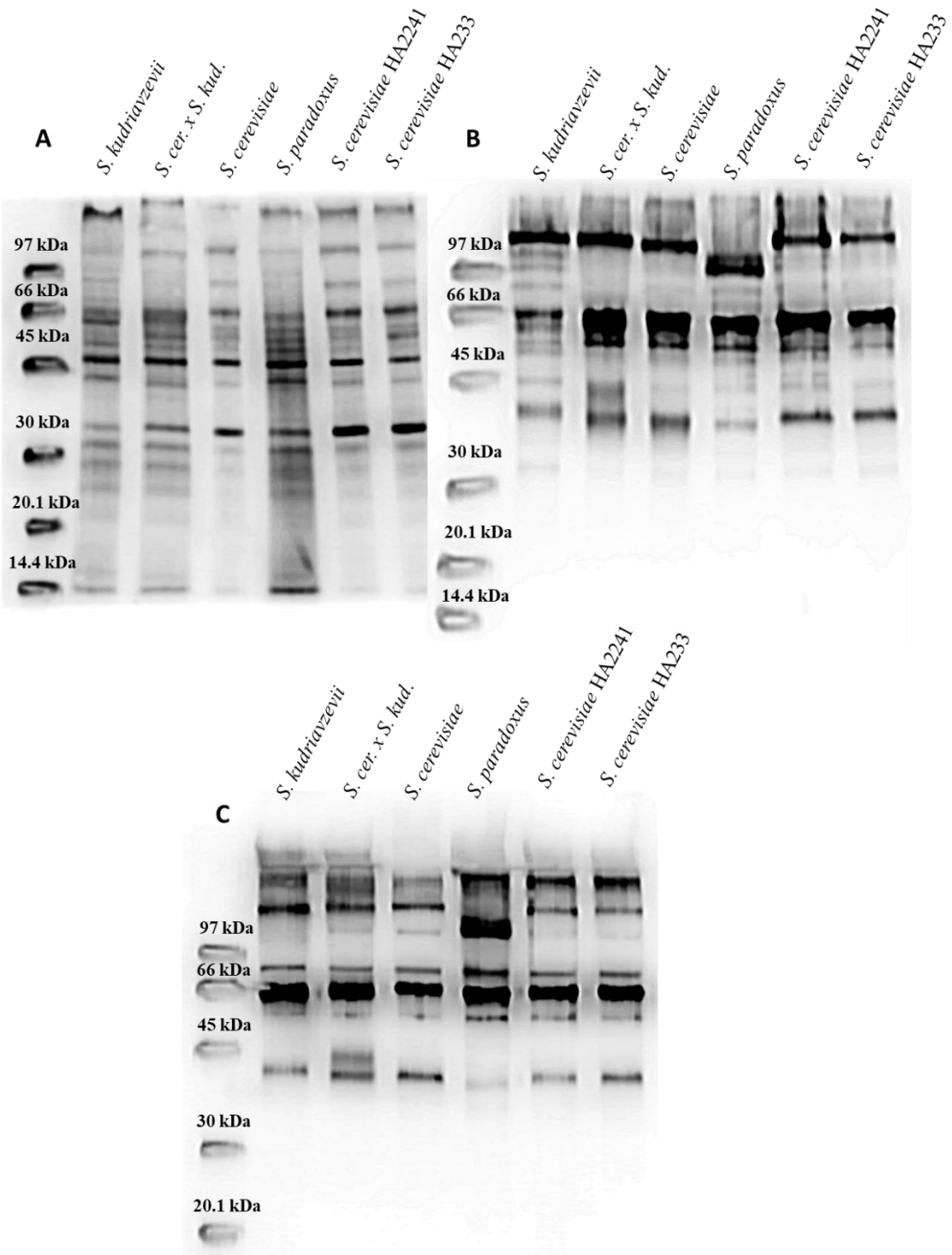
detektiranih ortologa Pir proteina kod ovih kvasaca je 2, a treba imati na umu da sva tri kvasca sadrže i ortologe Scw4 za koji je pokazano da se može pronaći u NaOH ekstraktu kvasca *S. cerevisiae*. Scw4 sam ima masu od oko 67 kDa, te je moguće da je detektirana vrpca u NaOH ekstraktu ovih kvasca upravo ortolog Scw4. Postoji mogućnost da su ortolozi Pir proteina kod ovih kvasaca eksprimirani samo pri određenim uvjetima. Kod kvasca *Torulaspora delbrueckii* vidljive su dvije proteinske vrpce, jedna mase od oko 66 kDa, a jedna mase od oko 45 kDa. Ako to usporedimo s rezultatima usporedbe proteoma, najvjerojatnije se radi o vrpcama ortologa Scw4 i ortologa jednog od Pir proteina. Isti rezultat usporedbe proteoma dobiven je i za kvasac *Y. lipolytica* kod koje su također detektirani ortolog Scw4 i ortolog jednog Pir proteina, no u proteinskom profilu vidljiva je samo jedna proteinska vrpca veličine od oko 66 kDa koja bi također najvjerojatnije mogla odgovarati ortologu Scw4. I kod kvasaca iz roda *Metschnikowia* detektiran je isti broj ortologa Scw4 i Pir proteina kao i kod prethodnih kvasaca, no ovi kvasci, posebice vrste *M. reukaufii* i *M. bicuspidata* u proteinskom profilu sadrže dvije ili više proteinskih vrpci, vrlo slične proteinske mase što bi moglo ukazivati na više proteina ili pak na više formi istog proteina, ovisno o njegovim posttranslacijskim modifikacijama. I ove vrpce imaju masu između 66 kDa i 70 kDa što je vrlo slično masi proteina Scw4 u kvascu *S. cerevisiae*. Kvasac *P. membranifaciens* ima detektiran jedan ortolog Pir proteina, a *P. kudriavzevii* dva, međutim oba kvasaca imaju deblju proteinsku vrpcu mase između 66 i 90 kDa, a koja se potencijalno sastoji od više proteinskih vrpci slične mase. *K. phaffii (P. pastoris)* u NaOH ekstraktu sadrži jednu proteinsku vrpcu veličine oko 50 kDa. Kvasac *Hanseniaspora uvarum* ima detektirana dva ortologa Pir proteina, a *H. osmophila* jedan, no u svom proteinskom profilu NaOH ekstrakta pokazuju čak 6 proteinskih vrpci, a masa vrpci razlikuje se između ove dvije vrste. Kvasci *B. adeninivorans* i *D. hansenii* nemaju detektiranih ortologa Pir proteina, ali u svom profilu proteina iz NaOH ekstrakta pokazuju prisustvo jednog proteina mase između 60 i 66 kDa, što također indicira da bi ta proteinska vrpca mogla pripadati ortologu Scw4 koji je pronađen usporedbom proteoma kod ovih dvaju kvasaca. Kvasci *S. pombe* i *S. japonicus* nemaju detektirane ortologe niti Pir proteina, niti Scw4 proteina, no svejedno imaju vidljve vrpce prisutne u NaOH ekstraktu pri čemu *S. pombe* ima jednu proteinsku vrpcu mase od oko 90 kDa, a *S. japonicus* jednu vrpcu na oko 66 kDa, jednu na oko 50 kDa, te više vrpci manjih od 30 kDa.

Proteinski profili u β-glukanaznom ekstraktu stijenki kvasaca prikazani su na **Slici 8.** Proteinski profili β- glukanaznog ekstrakta vrlo su slični proteinskim profilima NaOH ekstrakata stijenki kvasaca, što je i u skladu s očekivanim s obzirom na činjenicu da u β-glukanaznom ekstraktu dobivamo sve proteine kovalentno vezane na stijenku, bilo preko GPI sidra ili vezom nestabilnom u lužnatom. Također, uočljiv je pomak veličine proteinskih vrpci za otprilike 10-20 kDa što je najvjerojatnije posljedica mase ostatka β-glukanskog lanca koji ostaje vezan na ove proteine prilikom ovog tipa izolacije. Ono što je još značajno jest da se javljaju gotovo kod profila stijenki svih kvasaca i proteinske vrpce veće od 200 kDa koje nisu bile vidljive u NaOH ekstraktu, a koje najvjerojatnije pripadaju GPI proteinima. Ove vrpce nisu jasne i oštre, nego se javljaju u obliku takozvanih „razmaza“ (en. *smear*). Ta pojava, kao i vrlo velika masa ovih proteinskih vrpci vjerojatno je posljedica značajne razine glikozilacije ovih proteina koji mogu imati i vrlo dugačke i razgranate *N*-glikozilacijske lance što je pokazano na kvascu *S. cerevisiae* i nekolicini drugih kvasaca. Također valja naglasiti da su proteini preko GPI sidra vezani na β-1,6-glukan, pa stoga ti proteini u ovom ekstraktu mogu sadržavati vezane i znatne količine β-glukana uključujući dijelove i β-1,3- i β-1,6-glukana.

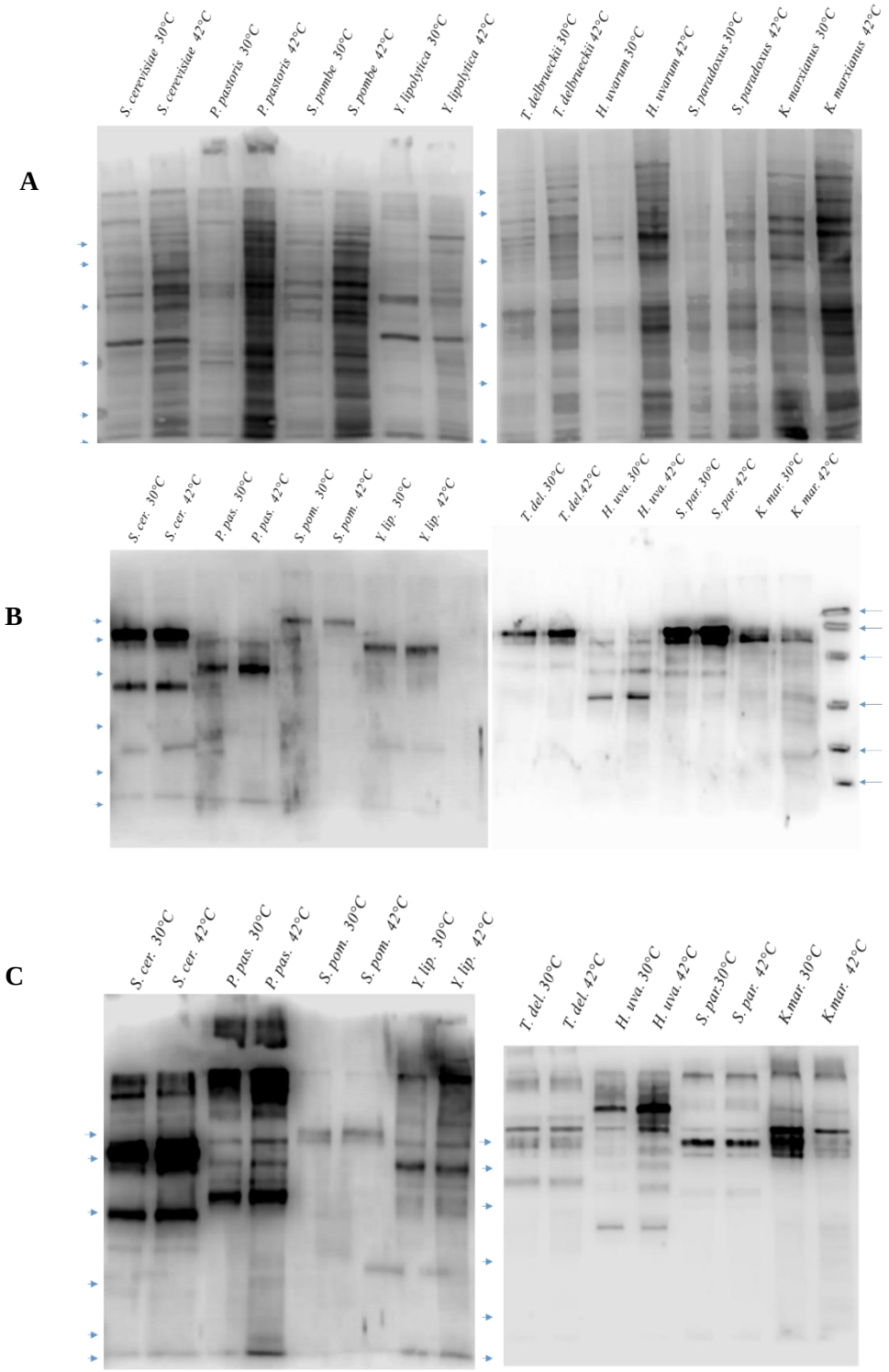



**Slika 8.** Proteinski profili stijenki dobivenih ekstrakcijom proteina tretmanom β-1,3-glukanazom, nakon što su prethodno sa stijenke uklonjeni nekovalentno vezani proteini. Proteini su razdvojeni SDS elektroforezom u 12%-tnom poliakrilamidnom gelu. Veličine standarda iznose redom 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20.1 kDa i 14.4 kDa.

Za provjeru konzerviranosti proteina stijenke unutar iste taksonomske grupe, kao i provjeru razlikovanja proteinskih profila stijenki između različitih sojeva iste vrste kvasca, napravljena je dodatna analiza kvasaca iz roda *Saccharomyces*. Osim prethodno analiziranih sojeva *S. cerevisiae var. boulardii* te *S. eubayanus*, za ovu analizu odabrani su još *S. kudriavzevii*, *S. paradoxus*, hibridni soj nastao iz parijentalnih sojeva *S. kudriavzevii* i *S. cerevisiae* (označen kao *S. cer. x S. kud.*) te dva divlja soja *S. cerevisiae* (HA2241 i HA233) izolirani iz prirodnih staništa. Rezultati ove analize prikazani su na **Slici 9.**, a pokazuju vrlo male razlike između analiziranih sojeva. Sva tri analizirana soja *S. cerevisiae* (HA2241, HA233 te laboratorijski soj BY4741) pokazuju identične profile dobivene iz sva tri ekstrakta. Najznačajnija razlika uočena je kod soja *S. paradoxus* koji ima vrpcu veličine oko 100 kDa, odnosno 120 kDa u NaOH, odnosno β-glukanaznom ekstraktu, koju ostali sojevi nemaju, dok mu nedostaje vrpca veličine oko 120 kDa/150 kDa u NaOH/ β-glukanaznom ekstraktu. Možemo pretpostaviti da se zapravo radi o pomaku proteinske vrpce, uslijed smanjene mase ortologa proteina Pir2 kvasca *S. cerevisiae*. Za ovaj protein već je i ranije pokazano da može biti različite molekulske mase čak i između različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae* ovisno o broju „Pir“ ponavljanja koja sadrži unutar sekvence (Kovács i sur., 2008). Također, još jedna uočljiva razlika je pojava vrpce veličine oko 40 kDa u hibridnom soju, koja nije jasno vidljiva u parentalnim sojevima *S. cerevisiae* i *S. paradoksus* u β-glukanaznom ekstraktu. S obzirom na vrlo nejasnu dinamiku genomskih rearanžmana u hibridnim sojevima kvasaca, teško je reći kojem proteinu pripada ova vrpca bez daljnjih analiza koje bi uključivale sekvenciranje proteina. Iz cjelokupne analize moguće je izvući zaključak da se proteinski profili stijenke vrlo malo razlikuju unutar roda *Saccharomyces* te su razlike vidljive u proteinskim profilima drugih kvasaca uistinu odraz evolucijskih promjena u proteinskom sastavu stijenke. Kao dodatna kontrola plastičnosti stijenke pri različitim uvjetima uzgoja, napravljen je eksperiment koji je uključivao osam vrsta kvasaca obuhvaćenih prethodnim analizama, a koji je za cilj imao uočiti promjene u proteinskom sastavu stijenke u uvjetima temperaturnog šoka. U tu svrhu kvasac je uzgojen pri 30°C, a onda je polovica ukupnog volumena suspenzije stanica tretirana 1h pri 42°C nakon čega su stanice inkubirane s biotinskim reagensom te je napravljena izolacija proteina stijenke. Rezultati ove analize prikazani su na **Slici 10.**, a pokazuju da nije bilo značajne promjene u ekspresiji pojedinih proteina. Zabilježen je jedino porast ukupne količine proteina u nekovalentno vezanoj frakciji proteina (SDS ekstrakt), što je moguća posljedica pojačane ekspresije ove skupine gena ili ukupno povećane stope izlučivanja proteina iz stanice uslijed nepovoljnih okolišnih uvjeta.



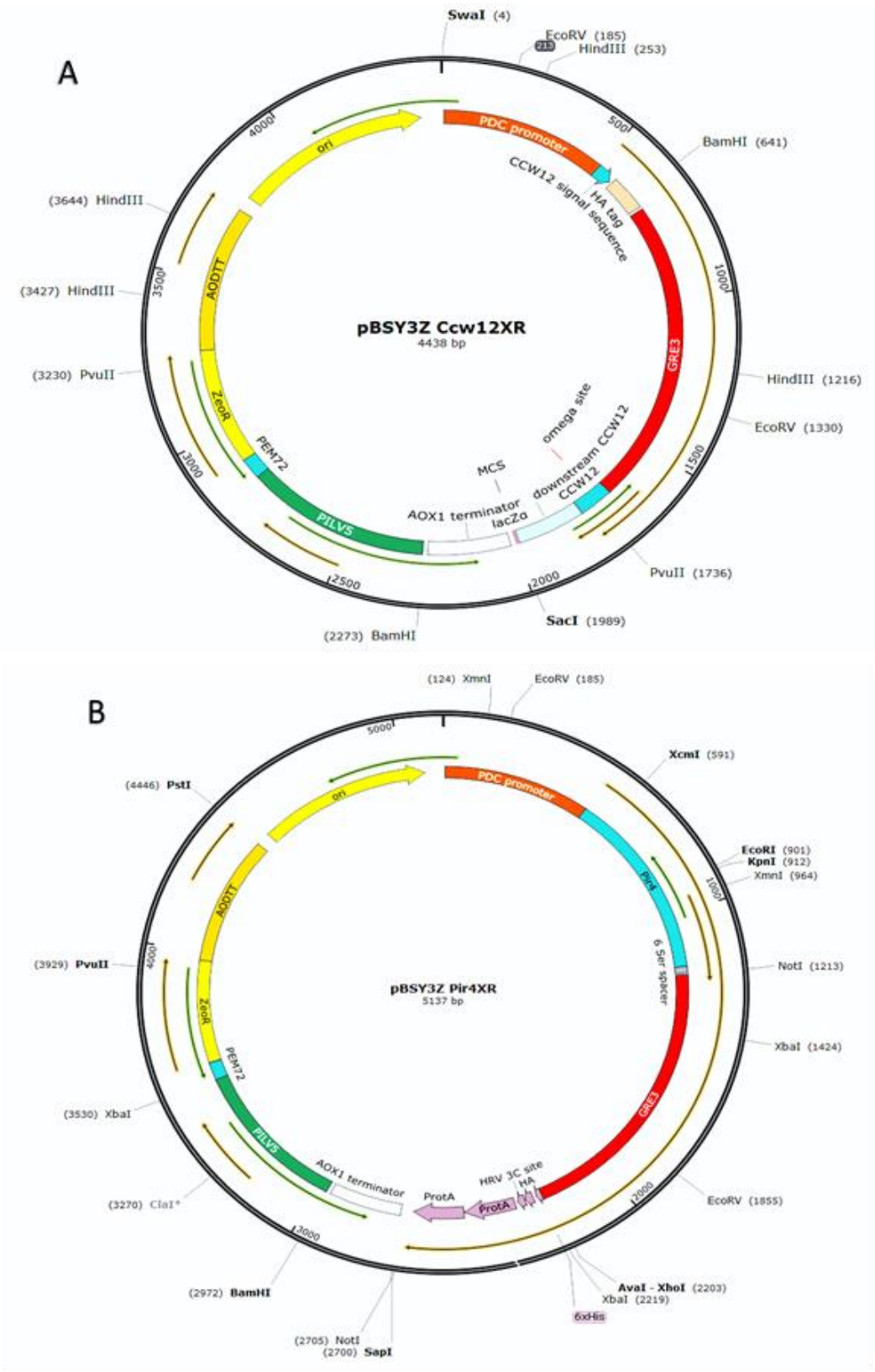

**Slika 9.** Proteinski profili stijenki kvasaca roda *Saccharomyces* dobiveni tretmanom SDS-om (**A**), 30 mM NaOH (**B**) i β-1,3-glukanazom (**C**). Proteini su razdvojeni SDS elektroforezom u 12%-tnom poliakrilamidnom gelu.




**Slika 10.** Proteinski profili stijenki kvasaca izloženi temperaturnom šoku pri 42°C /1h te kontrolne skupine kvasaca uzgajanih pri 30°C, dobiveni tretmanom SDS-om (**A**), 30 mM NaOH (**B**) i β-1,3-glukanazom (**C**). Proteini su razdvojeni SDS elektroforezom u 12%-tnom poliakrilamidnom gelu. Veličine standarda iznose redom 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20.1 kDa i 14.4 kDa.

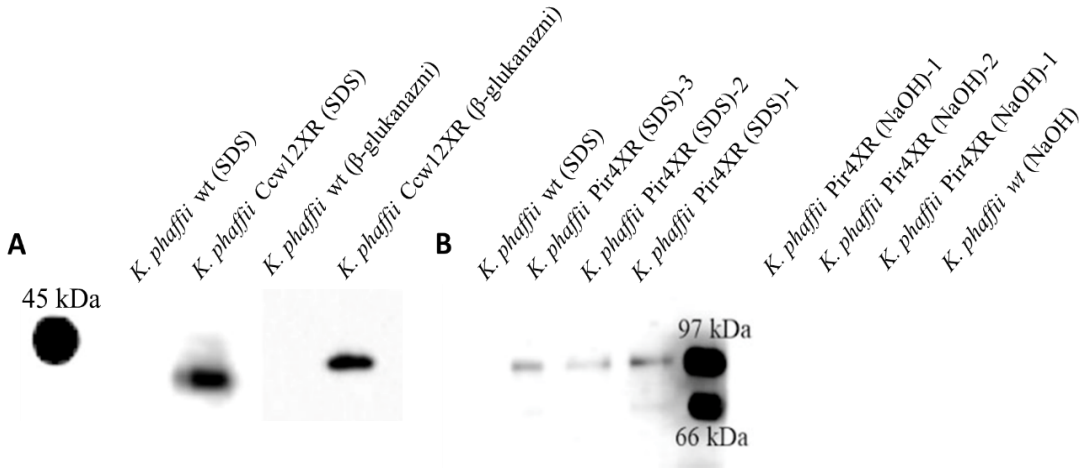
## 4.3. REZULTATI RAZVOJA SUSTAVA ZA IZLAGANJE PROTEINA NA POVRŠINU STANICE KVASCA *K. PHAFFII*

Iako *Komagataella phaffii* nije uvrštena u prethodno opisanu analizu usporedbe proteoma, od ranije je poznato da u stijenci sadrži barem dva ortologa Pir proteina koja su i iskorištena za uspostavu sustava za izlaganje proteina na staničnoj površini (Khasa i sur., 2011). Kasnijom analizom usporedbe proteoma stijenke *K. pastoris (vrlo srodne vrste K. phaffii)* i *S. cerevisiae* pronađeni su ortolozi proteina Scw4 i Scw10, ali istovremeno i jako mali broj ortologa GPI proteina stijenke *S. cerevisiae,* iako je uočena prisutnost ortologa proteina Ccw14 te Sed1 i Tip1 (Lozančić i sur., 2021). Proteini Sed1 i Tip1 kvasca *S. cerevisiae* već su korišteni kao dio sustava za izlaganje proteina na površini kvasca *P. pastoris* (Li i sur., 2015). Kao što je već objašnjeno u prethodnim poglavljima, *P. pastoris (K.phaffii)* ima potencijalno brojne prednosti za izlaganje proteina na površini u odnosu na *S. cerevisiae,* a s obzirom da se radi o kvascu za koji postoje razvijeni sustavi za heterolognu ekspresiju proteina te već neki uspostavljeni sustavi za izlaganje proteina na površini, ovaj kvasac odabran je kao domaćin za uspostavu novog sustava izlaganja proteina. Cilj ove grupe eksperimenata bio je isprobati funkcionalnost sustava prethodno razvijenih za kvasac *S. cerevisiae* u drugim kvascima što bi moglo rezultirati nekim boljim karakteristikama heterologno eksprimiranih proteina u odnosu na iste ekspirimirane u *S. cerevisiae*. Upotreba već postojećih sustava smanjila bi dugotrajan proces pronalaska odgovarajućeg proteina stanice domaćina koji bi služio kao veza za imobilizaciju proteina od interesa na staničnoj površini. Kao sustavi za ove eksperimente odabrani su sustavi koji omogućavaju imobilizaciju enzima ksiloza-reduktaze (XR) vezanjem na GPI sidro pomoću signalne sekvence proteina Ccw12 ili vezanjem na stijenku pomoću uspostave kovalentne veze nestabilne u lužnatom koja se uspostavlja preko proteina Pir4 genski fuzioniranog s *GRE3* koji kodira za ksiloza-reduktazu. Ova dva sustava za imobilizaciju XR prethodno su razvijeni za kvasac *S. cerevisiae* te je potvrđeno kovalentno vezanje obaju rekombinantnih proteina u stijenku, kao i aktivnost enzima (Hossain i sur., 2019). Rekombinantni geni koji kodiraju za jedan i drugi sustav ubačeni su u plazmid koji omogućava integraciju konstrukata u genom te inducibilnu ekspresiju rekombinantnog proteina koji se nalazi pod kontrolom promotora *PDC.* Mape konstruiranih plazmida dane su na **Slici 11.**




**Slika 11.** Mape plazmida pBSY3Z Ccw12XR (**A**) i pBSY3Z Pir4XR (**B**) koji omogućavaju heterolognu ekspresiju konstrukata Ccw12XR i Pir4XR u kvascu *K. phaffii*

Konstrukt Ccw12XR sastoji se od sekvence koja kodira za signalnu sekvencu Ccw12 koja usmjerava protein u sekretorni put, potom gena *GRE3* koji kodira za intracelularnu ksiloza-reduktazu kvasca *S. cerevisiae* (XR) i završava sekvencom koja kodira za C-terminalni dio Ccw12 koji sadrži signal za vezanje proteina na GPI sidro. Ovakav konstrukt, sukladno opisanom, omogućava C-terminalnu imobilizaciju XR. Konstrukt Pir4XR pak sadrži sekvencu cijelog gena *PIR4*, regiju razmaknicu i gen *GRE3* te ovaj konstrukt omogućava N-terminalnu imobilizaciju XR. Nakon ubacivanja konstrukata u odabrani vektor, kvasac *K. phaffii* transformiran je navedenim plazmidima te je uzgajan pri uvjetima inducije promotora *PDC*. Nakon uzgoja, pristupilo se izolaciji stijenki kako bi se potvrdila uspješnost imobilizacije rekombinantnih proteina na stijenci. Oba konstukta sadrže i sekvencu koja kodira za haemaglutininski biljeg (HA) uz pomoć koje je lako vizualizirati proteine na imunoblotu korištenjem anti-HA-peroksidaza konjugata. Detekcija konstrukta Pir4XR vršena je u SDS te NaOH ekstraktu, a konstrukta Ccw12XR u SDS te β-glukanaznom ekstraktu. Rezultati su prikazani na **Slici 12.**

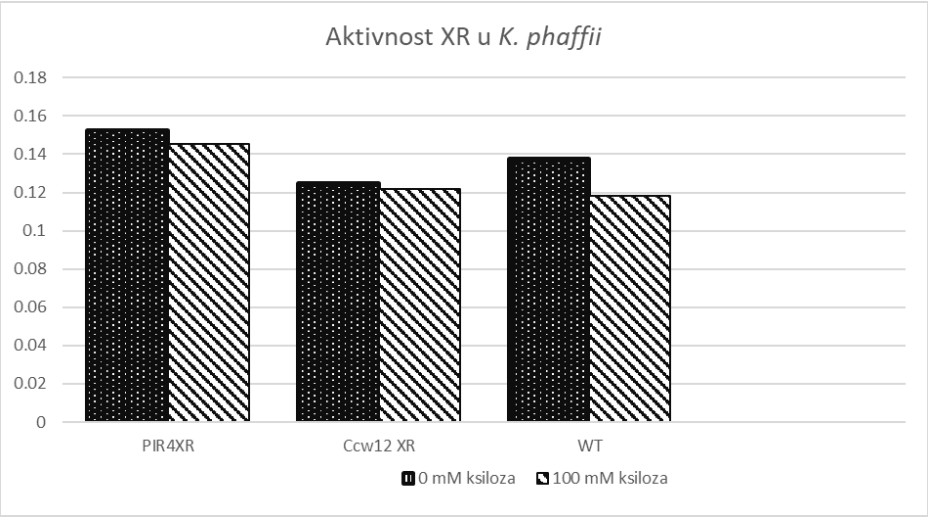



**Slika 12.** Rezultati imunoblot analize SDS i β-glukanaznog ekstrakta proteina stijenki kvasca *K. phaffii* transformiranog s pBSY3Z Ccw12XR (**A**) te SDS i NaOH ekstrakta proteina stijenki istog kvasca transformiranog s pBSY3Z Pir4XR (**B**). Imunoblot kvasca transformiranog s pBSY3Z Pir4XR proveden je u tri biološke paralele. Kao kontrola korišteni su netransformirani sojevi kvasca *K. phaffii* označeni na slikama s wt oznakom.

Iz rezultata prikazanih na **Slici 12.** vidljivo je da u stijenci, u nekovalentnoj i kovalentnoj frakciji, prisutan rekombinantni protein Ccw12XR (**Slika 12.A**), veličine oko 50 kDa. Ovaj rezultat potvrda je da se sustav za izlaganje proteina na površini stanice temeljen na proteinu Ccw12 kvasca *S. cerevisiae* može koristi za izlaganje proteina u kvascu *K. phaffii* pri čemu dolazi do kovalentnog vezanja rekombinantnog proteina u stijenku kvasca. Međutim, isti željeni rezultat nije dostignut korištenjem sustava za izlaganje proteina koji se temelji na proteinu Pir4 kvasca *S. cerevisiae*. Naime, rekombinanti protein Pir4XR detektiran je u nekovalentnoj frakciji proteina stijenke što potvrđuje uspješnu ekspresiju genskog konstrukta i prolazak sekretornog puta, no ne dolazi do kovalentne ugradnje proteina u stijenku. Eksperiment je ponovljen u tri biološke paralele, a rezultati su vidljivi na **Slici 12.B.** Više je mogućih objašnjenja ovakvog rezultata, a najvjerojatnije se radi o nepravilom smatanju Pir4 dijela rekombinantnog proteina što je onemogućilo stvaranje interakcije i formiranja kovalentne veze sa stijenkom. Kako bi se provjerila aktivnost ksiloza-reduktaze, provedeno je mjerenje prema metodi opisanoj u Hossain i sur. (2019). Metoda se zasniva na padu apsorbancije reakcijske smjese koja sadrži NADPH mjereno pri 340 nm, uslijed aktivnost ksiloza-reduktaze. Ksiloza-reduktaza katalizira reakciju redukcije ksiloze u ksilitol uz oksidaciju NADPH u $NADP^+$. Mjerenje se izvodi tako da se izmjeri apsorbancija reakcijske smjese u trenutku započinjanja reakcije dodatkom NADPH te nakon 10 minuta trajanja reakcije. Pad apsorbanicije ukazuje na aktivnost enzima. Pri tomu valja voditi računa da pri danim uvjetima dolazi do spontanog raspada NADPH pa je kao kontrola korišten netransformirani soj kvasca *K. phaffii*. Nažalost, unatoč brojnim mjerenjima pri različitim koncentracijama obaju supstrata, nije zabilježena enzimatska aktivnost XR. Primjer rezultata mjerenja prikazan je na **Slici 13.**

Sve razlike apsorbancije između vremena trajanja reakcije T0 i T10 za oba konstrukta bilo je statistički unutar intervala koji se dobije praćenjem spontanog raspada NADPH u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala stanice divljeg tipa. Aktivnost nije detektirana u reakcijama s rasponom koncentracija ksiloze od 5 mM do 250 mM, dok je za kvasac *S. cerevisiae* standardno mjerena pri koncentraciji ksiloze od 100 mM. Aktivnost nije detektirana niti nakon povišenja koncentracije NADPH u reakcijskoj smjesi te se sa određenom sigurnošću može tvrditi kako koncentracije supstrata nisu bile ograničavajući faktor reakcije te da do reakcije ne dolazi zbog neaktivnosti enzima. M oguće je da enzim u oba konstrukta nije imao nužnu ispravnu konformaciju aktivnog mjesta te stoga nije bio katalitički aktivan. Drugi mogući razlog je dostupnost supstrata samom enzimu s obzirom na gusti mananski sloj kojim je enzim okružen,

a koji kod *K. phaffii* možda negativnije utječe na enzimsku aktivnost XR, nego što je to slučaj kod *S. cerevisiae.*




**Slika 13.** Rezultati mjerenja aktivnosti ksiloza-reduktaze u sojevima *K. phaffii* transformiranih s pBSY3Z Pir4Xr, odnosno pBSY3Z Ccw12XR. Mjerene vrijednosti dobivene je kao razlika prosjeka u vremenu T0 i vremenu T10. Aktivnost je mjerena bez dodatka ksiloze kao supstrata te pri 100 mM koncentraciji ksiloze u reakcijskoj smjesi.

## 4.4. REZULTATI ANALIZE VEZANJA I PROTEOLITIČKOG PROCESIRANJA PROTEINA SCW4 I SCW10

S obzirom da postoji stalna potreba za razvojem novih sustava za izlaganje proteina na staničnoj površini, potrebno je ispitati mogućnost korištenja novih proteina stijenke kao temelja novih sustava izlaganja proteina. Kao potencijalni kandidat ističu se proteini Scw4 i Scw10. Kao što je pokazano rezultatima usporedbe proteoma stanične stijenke te analize proteinskih profila stijenki, ortolozi ovih dvaju proteina nalaze se u velikom broju kvasaca, izuzev kvasca roda *Schizosaccharomyces*, te postoje snažne indicije da se ti ortolozi vežu u stijenku djelomično i kovalentnom vezom. Iako su ova dva proteina kvasca *S. cerevisiae* prvotno okarakteriziran kao nekovalentno vezani, kasnije je potvrđeno nijhovo prisustvo u kovalentno vezanoj frakciji proteina stijenke koji s njom uspostavljaju vezu nestabilnu u lužnatom mediju. S obzirom da su jedini prethodno poznati proteini koji tvore takvu vezu Pir proteini, pretpostavka je bila da se Scw4 i Scw10 u stijenku vežu na sličan način. Međutim, usporedbom proteina Pir skupine s proteinima Scw4 i Scw10 ne pronalazi se značajna razina homologije te ostaje pitanje načina njihovog vezanja. Kako bi se došlo do više informacija o potencijanoj regiji proteina Scw4 koja ostvaruje kovalentnu vezu s stijenkom, provedena je delecijska analiza pri čemu su genetičkim alatima uklonjeni dijelovi sekvence gena Scw4 te su takvi konstrukti ubačeni u plazmide te stavljeni pod kontrolu inducibilnog promotora *GAL1*. Delecije Δ176Scw4, Δ202Scw4, Δ231Scw4 i Δ246Scw4 provedene su na način da se izbaci dio sekvence gena koji kodira za regije od kraja signalne sekvence do kraja određene regije koja bi mogla imati potencijalnih sličnosti s Pir ponavljajućim regijama koje su kod Pir proteina odgovorne za njihovo kovalentno vezanje u stijenku.

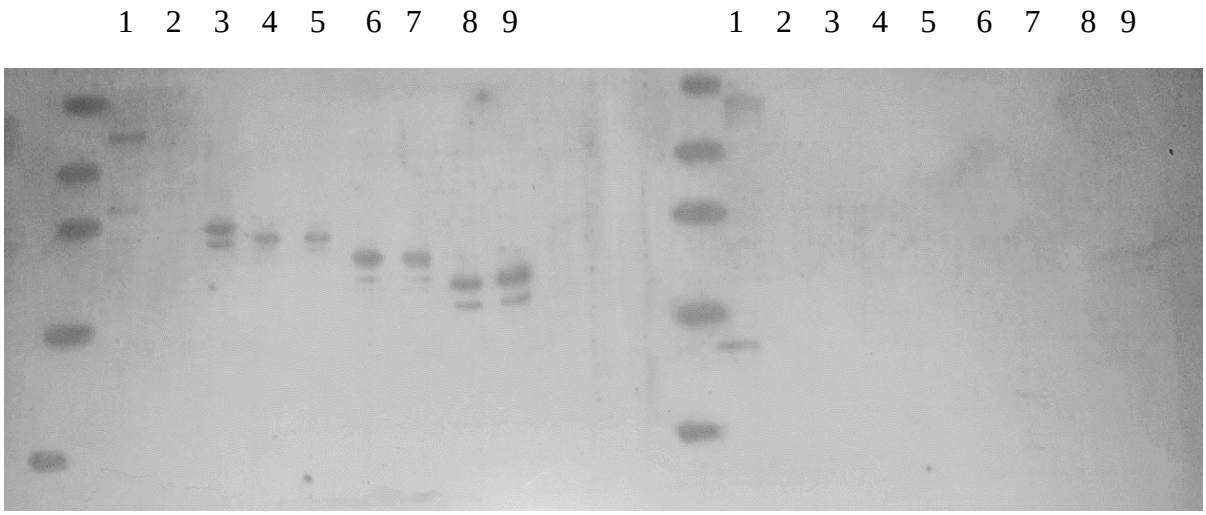
Na **Slici 14.** (**A**) prikazana je aminokiselinska sekvenca Scw4 te su označena mjesta gdje počinje aminokiselinska sekvenca delecijskih produkata gena *Δ176SCW4, Δ202SCW4, Δ231SCW4, Δ246SCW4*. Na **Slici 14.** (**B**) prikazani su rezultati imunoblot analize proteinskih produkata ovih gena izoliranih iz stijenke kvasca. Kao što je moguće primjetiti na slici, u SDS ekstraktu vidljive su proteinske vrpce u svim uzorcima, izuzev uzorka proteinskog ekstrakta stijenke netransformiranog soja kvasca, što je u skladu s očekivanim, te su proteinske vrpce očekivane molekulske mase. Međutim, u NaOH ekstraktu jasno je vidljiva samo vrpca u uzorku kvasca transformiranim s plazmidom koji nosi uputu za nativni Scw4. Potencijalno se nazire slabi signal ostalih uzoraka, ali u nedovoljnoj jačini da bi se mogla potvrditi stvarna prisutnost analiziranih proteina u tim uzorcima. S obzirom da je u svim analiziranim mutantima deletiran znatan dio proteinske sekvence, posebice regije s nizom serinskih i treoninskih ostataka za koje

se pretpostavlja da je veći dio njih *O*-glikoziliran, može se pretpostaviti da ovakvi proteini ne zauzimaju pravilnu konformaciju koja bi omogućila njihovo vezanje u stijenku.

**A**

```
1   MRLSNLIASA SLLSAATLAA PANHEHKDKR AVVTTTVQKQ TTIIVNGAAS TPVAALEENA
61  VVNSAPAAAT STTSSAASVA TAAASSSENN SQVSAAASPA SSSAATSTQS SSSSQASSSS
                                                          Δ176
121 SSGEDVSSFA SGVRGITYTP YESSGACKSA SEVASDLAQL TDFPVIRLYG TDCNQVENVF
                           Δ202                           Δ231
181 KAKASNQKVF LGIYYVDQIQ DGVNTIKSAV ESYGSWDDVT TVSIGNELVN GNQATPSQVG
                Δ246
241 QYIDSGRSAL KAAGYTGPVV SVDTFIAVIN NPELCDYSDY MAVNAHAYFD KNTVAQDSGK
301 WLLEQIQRVW TACDGKKNVV ITESGWPSKG ETYGVAVPSK ENQKDAVSAI TSSCGADTFL
361 FTAFNDYWKA DGAYGVEKYW GILSNE*
```

**B**




**Slika 14.** (**A**) Prikaz aminokiselinske sekvence Scw4 s označenim mjestima početaka aminokiselinskog slijeda produkata mutiranih inačica gena *SCW4*. Regija podcrtana crveno označava regiju najsličniju sekvenci unutarnjih ponavljanja Pir proteina. Plavom bojom označeno je mjesto procesiranja djelovanjem proteaze Kex2, a zelenom mjesto procesiranja japsinskim proteazama. Crvenom bojom označena je signalna sekvenca za usmjeravanje proteina u sekretorni put te je ista očuvana u svim konstruktima. (**B**) Rezultat imunoblot analize detekcije Scw4 i različitih mutanata eksprimiranih s episomalnih plazmida- lijeva polovica slike pokazuje rezultate elektroforeze SDS ekstrakata, a desna polovica NaOH ekstrakata. Uzorci su nanošeni redom: BY4741Scw4-B, BY4741, BY4741Scw4-J (1), BY4741Scw4-K (1), BY4741Scw4-K (2), BY4741Scw4-L (1), BY4741Scw4-L (2), BY4741Scw4-M (1) i BY4741Scw4-M (2), pri čemu (1) i (2) označavaju dvije biološke paralele.

Stoga je promjenjen pristup pretraživanju mjesta vezanja proteina na način da se tražila sekvenca koja bi imala barem djelomičnu sličnost sa sekvencom unutarnjeg ponavljanja Pir proteina preko koje Pir proteini uspostavljaju kovalentnu vezu sa stijenkom. Kao najsličnija pokazala se sekvenca između 231.-og i 246.-og aminokiselinskog ostatka s tri glutaminska ostatka na pozicijama $Q_{233}$, $Q_{238}$ i $Q_{241}$ (**Slika 15**.).

V I S Q I G D G Q V - Q A T S Pir4
G N Q A T P S Q V G Q Y I D Scw4

**Slika 15.** Usporedba sekvenci ponavljanja unutar Pir4 te regije Scw4 najsličnije tom ponavljanju

Kako bi se ispitalo je li spomenuta sekvenca uistinu i vezna sekvenca Scw4 proteina, konstruirano je nekoliko sojeva kvasca koji nose plazmide s mutiranim genom *SCW4* kod kojih je regija koja kodira za spomenutu sekvencu deletirana (BY4741Scw4-C), mutirana na način da su aminokiselinski ostaci $Q_{233}A_{234}T_{235}P_{236}S_{237}Q_{238}V_{239}G_{240}Q_{241}$ zamijenjeni s $A_{233}L_{234}V_{235}L_{236}G_{237}A_{238}L_{239}L_{240}G_{241}$ (BY4741Scw4-D; regija VR2), ili su pak aminokiselinski ostaci $Q_{233}$, $Q_{238}$ i $Q_{241}$ zamijenjeni s $A_{233}$ (BY4741Scw4-E), $A_{238}$ (BY4741Scw4-F) i $A_{241}$ (BY4741Scw4-G). Kao kontrola, napravljen je konstrukt koji ima mutacije u drugoj sekvenci nalik Pir sekvenci, a kod kojeg su aminokiseline $D_{197}Q_{198}I_{199}Q_{200}D_{201}$ zamjenjene s $G_{197}A_{198}L_{199}L_{200}G_{201}$ (BY4741Scw4-H; regija VR1). Također, Grbavac i sur. (2017) pokazali su da proteolitičko procesiranje Scw4 japsinskim proteazama značajno utječe na njegovu mogućnost kovalentnog vezanja na stijenku. S obzirom da se u neposrednoj blizini lizinskog ostatka kojeg prepoznaju japsinske proteaze nalaze dva glutaminska ostatka koja bi potencijalno mogla ostvarivati kovalentnu vezu sa stijenkom, napravljena je mutacija ovih dvaju glutaminskih ostataka u alaninske (BY4741Scw4-I). Uloga ovih glutaminskih ostataka u ostvarivanju kovalentne veze sa stijenkom jedno je od potencijalnih objašnjenja zašto proteolitičko procesiranja Scw4 utječe na njegovo vezanje. Unesene promjene u aminokiselinskom slijedu proteina nastali ekspresijom opisanih konstrukata prikazani su na **slici 16**. Svi navedeni sojevi uzgajani su pri pH 7 pri čemu je smanjena aktivnost japsinskih proteaza kako bi smo smanjili efekt procesiranja ovim proteazama na smanjenje udjela kovalentno vezane frakcije ovog proteina, a kao kontrola

proveden je uzgoj u puferiranom mediju pri pH 4. Također, kao dodatna kontrola, svim opisanim konstruktima transformiran je i soj Y01974 koji ima deletiran gen za proteazu Kex2 te su tako konstruirani sojevi Y01974Scw4-D, Y01974Scw4-E, Y01974Scw4-F, Y01974Scw4-G, Y01974Scw4-H i Y01974Scw4-I. Ovi sojevi također su uzgajani pri pH 7 i pH 4 vrijednosti medija pri čemu se očekuje minimalna aktivnost japsinskih proteaza pri uzgoju ovih sojeva na pH 7.

**A**

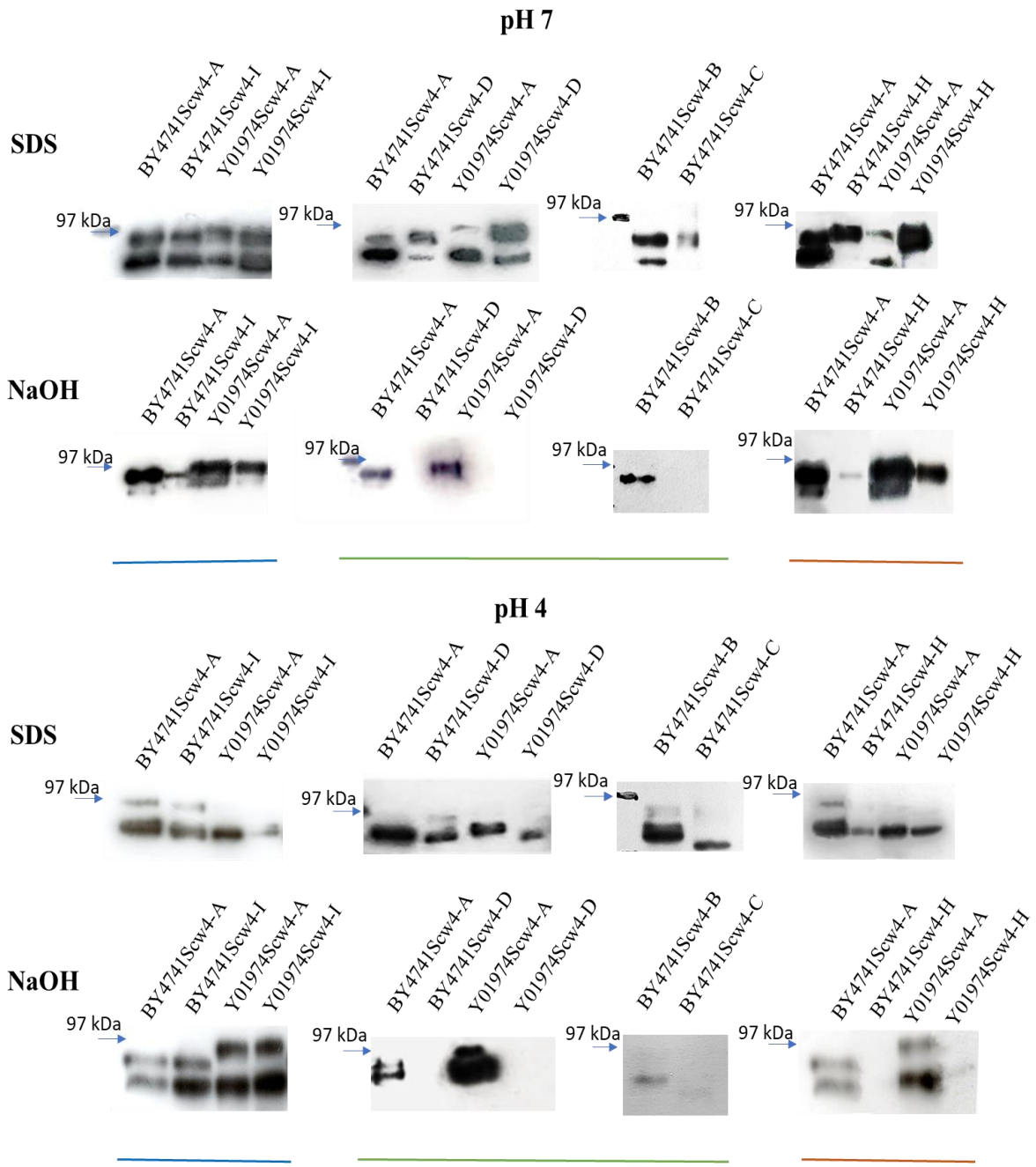
Regija proteolitičkog procesiranja

```
  1 MRLSNLIASA SLLSAATLAA PANHEHKDKR AVVTTTVQKQ TTIIVNGAAS
 51 TPVAALEENA VVNSAPAAAT STTSSAASVA TAAASSSENN SQVSAAASPA
101 SSSAATSTQS SSSSQASSSS SSGEDVSSFA SGVRGITYTP YESSGACKSA
                                                  VR1
151 SEVASDLAQL TDFPVIRLYG TDCNQVENVF KAKASNQKVF LGIYYVDQIQ
                                          VR2
201 DGVNTIKSAV ESYGSWDDVT TVSIGNELVN GNQATPSQVG QYIDSGRSAL
251 KAAGYTGPVV SVDTFIAVIN NPELCDYSDY MAVNAHAYFD KNTVAQDSGK
301 WLLEQIQRVW TACDGKKNVV ITESGWPSKG ETYGVAVPSK ENQKDAVSAI
351 TSSCGADTFL FTAFNDYWKA DGAYGVEKYW GILSNE*
```

**B**

```
228…LVN GNQATPSQVG QYIDSGRSAL…→ …LVN RSAL…        Scw4-C
228…LVN GNQATPSQVG QYID…→ …LVN GNALVLGALL GYID…  Scw4-D
228…LVN GNQATPSQVG QYID…→ …LVN GNAATPSQVG QYID…  Scw4-E
228…LVN GNQATPSQVG QYID…→ …LVN GNQATPSAVG QYID…  Scw4-F
228…LVN GNQATPSQVG QYID…→ …LVN GNQATPSQVG AYID…  Scw4-G
191…LGIYYVDQIQ DGVNTIKS…→ …LGIYYVGALL GGVNTIKS…  Scw4-H
27…KDKR AVVTTTVQKQ TTII…→ …KDKR AVVTTTVAKA TTII…Scw4-I
```

**Slika 16**. Prikaz aminokiselinskog slijeda proteina dobivenih unosom mutacija u gen *SCW4*. Na slici (**A**) prikazan je aminokiselinski slijed nativnog Scw4 pri čemu je crvenom bojom označena signalna sekvenca, plavom bojom aminokiselinski ostaci koje prepoznaje Kex2 proteaza, zelenom bojom aminokiselinski ostaci koje prepoznaju japsinske proteaze; plavim pravokutnikom obilježena je regija proteina unutra koje dolazi do proteolitičkog procesiranja; smeđim pravokutnikom VR1 regija, a zelenim VR2 regija. Na slici (**B**) prikazane su promjene u aminokiselinskom slijedu (desno) u odnosu na aminokiselinski slijed nativnog Scw4 (lijevo). Crvenom bojom označene su izmjenjeni aminokiselinski ostaci.

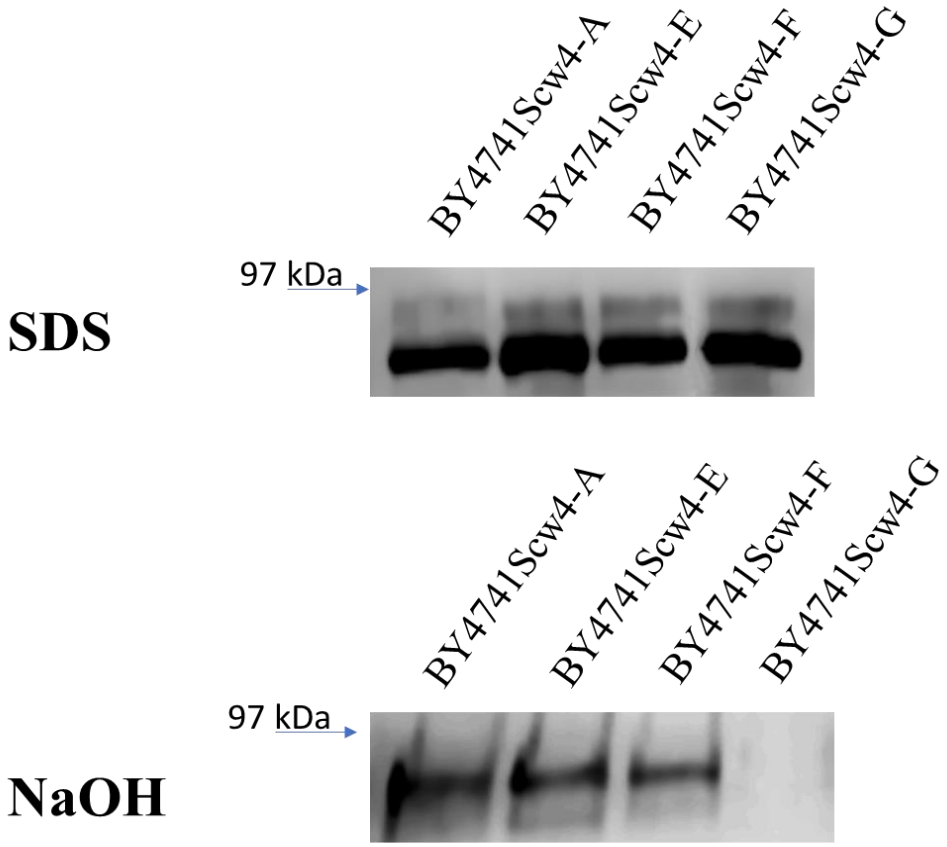



**Slika 17.** Imunoblot analiza različitih mutiranih formi Scw4 eksprimiranih s episomalnog plazmida pri pH 7 i pH 4 u stanicama divljeg tipa (BY4741) te *kex2* mutanta (Y01974). Scw4-A te Scw4-B označavaju nativni Scw4 protein, dok Scw4-C označava Scw4 s delecijom VR2 regije; Scw4-D Scw4 s mutacijom u VR2 regiji; Scw4-H Scw4 s mutacijom u VR1 regiji, a Scw4-I označava Scw4 s mutacijom u regiji procesiranja japsinskim proteazama.

Prema rezultatima imunoblot analize vidljivima na **Slici 17.**, vidljivo je da mutacije glutaminskih ostataka $Q_{38}$ i $Q_{40}$ (soj BY4741Scw4-I) koji okružuju lizinski ostatak $K_{39}$ kojeg prepoznaju japsini ne utječu značajno na smanjenje količine proteina Scw4 u kovalentno vezanoj frakciji, iako je mali efekt zabilježen u stanicama divljeg tipa pri pH 7. Na temelju rezultata moguće je sa sigurnošću ustvrditi da spomenuti glutaminski ostaci nisu odgovorni za formiranje kovalentne veze sa staničnom stijenkom. Delecijom regije VR2 najsličnije Pir ponavljanju (soj BY4741Scw4-C) kao i njenom mutacijom opisanom u prethodnom tekstu (soj BY4741Scw4-D te Y01974Scw4-D) postiže se potpuni gubitak kovalentno vezane frakcije proteina Scw4 u stijenci s obzirom da isti nije detektiran u NaOH ekstraktu niti divljeg tipa niti *kex2* mutanta, niti pri jednoj pH vrijednosti uzgojnog medija. To ukazuje na veliku vjerojatnost kako je upravo VR2 odgovorna za formiranje kovalentne veze između stanične stijenke i proteina Scw4. Mutacija kontrolne regije VR1 također pokazuje zanimljiv efekt. Naime, protein Scw4 s mutacijama u VR1 regiji nije pronađen u NaOH ekstraktu proteina stijenke stanica divljeg tipa uzgajanog pri pH 4, a kod stanica *kex2* mutanata tek se jedva nazire. S druge strane, protein je moguće detektirati u stanicama obaju tipova pri uzgoju u mediju čija je pH vrijednost 7. Također, u stanicama uzgajanim pri pH 7, ovaj mutant se nalazi u nešto manjoj koncentraciji u odnosu na nativni Scw4 u kovalentno vezanoj frakciji, iako je efekt manje primjetan u stanicama *kex2* mutanta. Pretpostavka je, da je smanjena količina ovog proteina u kovalentnoj frakciji zapravo posljedica kombiniranog efekta mutacije spomenute regije i proteolitičkog procesiranja s obzirom da je efekt najmanji u soju u kojem praktički ne dolazi do procesiranja zbog nedostatka proteaze Kex2 i vrlo niske aktivnosti japsina. S obzirom da je već objavljeno kako proteolitičko procesiranje utječe na smanjenu sposobnost kovalentnog vezanja Scw4, moguće je da je rezultat koji vidimo zbroj tog efekta i efekta promjene konformacije samog proteina uslijed unesenih mutacija, no ovu hipotezu bilo bi potrebno dodatno potvrditi.

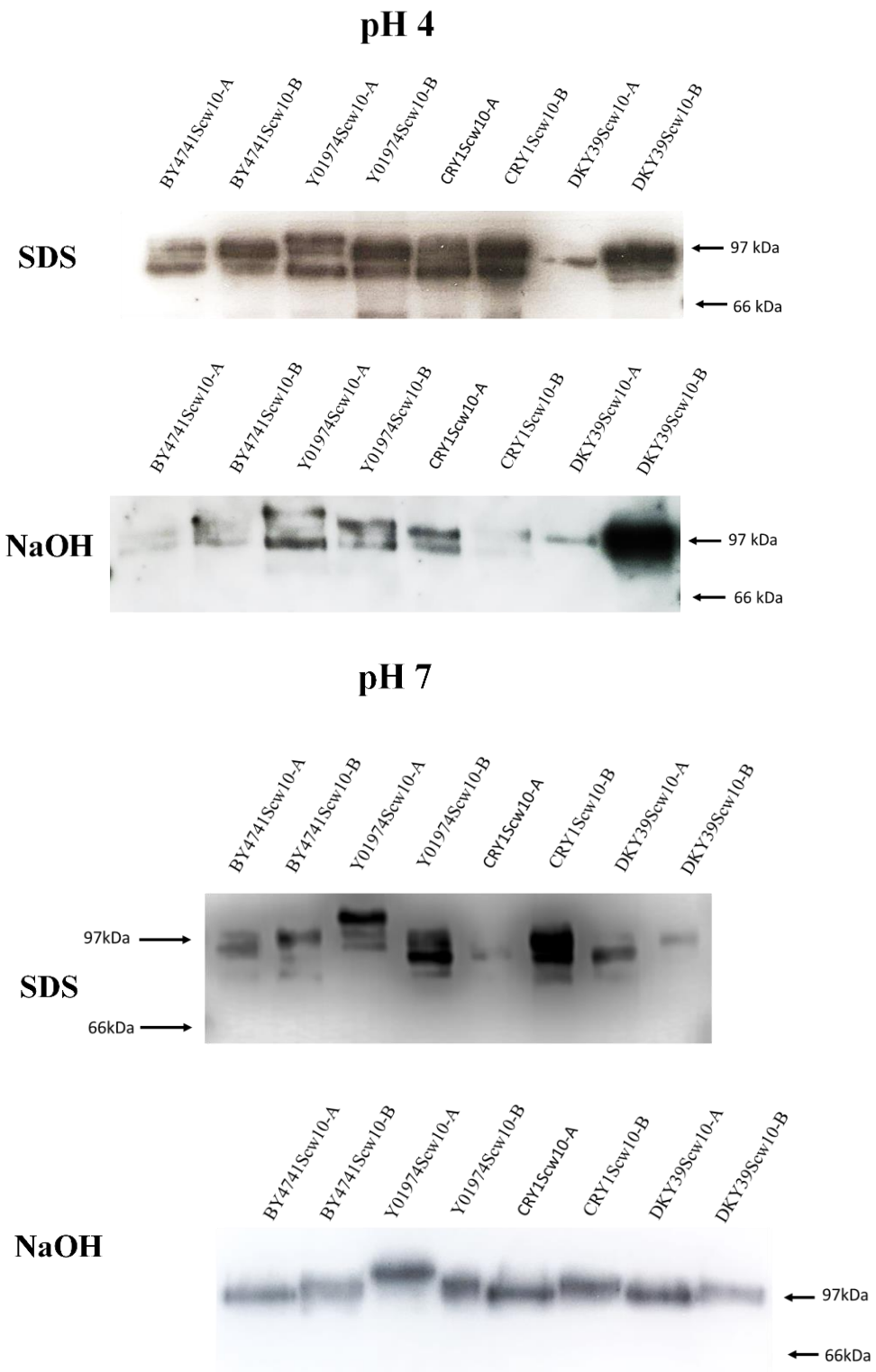
S obzirom da je mutacija kao i delecija VR2 regije dala jasan efekt, pristupilo se određivanju aminokiselinskog ostatka direktno odgovornog za uspostavljanje kovalentne veze sa stijenkom. S obzirom da su glutaminski ostaci ključni za formiranje iste veze kod Pir proteina, pristupilo se mutaciji glutaminskih ostataka $Q_{233}$, $Q_{238}$ i $Q_{241}$ kako bi se provjerilo je li jedan od njih ključan za uspostavu kovalentne veze. Rezultati imunoblot analize ovih mutanata Scw4 dani su na **Slici 18.** i jasno pokazuju da mutacija $Q_{241}$ uzrokuje potpuni nestanak kovalentno vezane

frakcije proteina Scw4 što dovodi do zaključka kako upravo ovaj aminokiselinski ostatak sudjeluje u kovalentnoj vezi sa staničnom stijenkom.




**Slika 18.** Imunoblot analiza Scw4 proteina s mutacijama u $Q_{233}$ (Scw4-E), $Q_{238}$ (Scw4-F) i $Q_{241}$ (Scw4-G), izoliranih iz kvasaca uzgajanim u nepuferiranom mediju. Scw4-A označava nativni Scw4 protein. Svi konstrukti eksprimirani su u stanicama divljeg tipa (BY4741).

Za protein Scw10 prethodno je poznato da se procesira proteazom Kex2 (Cappellaro i sur., 1998), no ne zna se postoji li dodatno proteolitičko procesiranje drugom proteazom kao što je to slučaj kod Scw4 te nije poznato kako proteolitičko procesiranje Scw10 utječe na njegovu sposobnost kovalentnog vezanja na stijenku. Kako bi se istražilo proteolitičko procesiranje Scw10 analizirana je prisutnost različitih formi Scw10 u stijenci soja divljeg tipa (BY4741), soja mutanta *kex2* (Y01974) te sojeva mutanata *yps1, yps2, yps3, yps6* i *yps7* (DKY39). Također, konstruiran je mutant koji umjesto aminokiselinskih ostataka $R_{23}H_{24}K_{25}H_{26}E_{27}K_{28}R_{29}$ ima slijed $V_{23}L_{24}G_{25}A_{26}L_{27}L_{28}G_{29}$ (sojevi BY4741Scw10-B; Y01974Scw10-B i DKY39Scw10-B). Slijed RHKHEKR paradigmatsko je mjesto procesiranja proteazom Kex2.




**Slika 19.** Imunoblot analiza Scw10 (Scw10-A) i Scw10 s mutacijom u mjestu procesiranja (Scw10-B), eksprimiranih s episomalnih plazmida. Nativni i mutirani gen *SCW10* ekspirimirani su u stanicama divljih tipova (BY4741 i CRY1) te sojevima s deletiranim genom *KEX2* (Y01974) ili genima koji kodiraju za japsinske proteaze (DKY39)

Na **Slici 19**. prikazani su rezultati imunoblotova proteina Scw10 i proteina Scw10K koji ima izmjenjenu sekvencu koju prepoznaje proteinaza Kex2. Vidljivo je da su u SDS ekstraktu soja Y01974Scw10-A , koji ima deletiran gen *KEX2*, uzgajanom pri pH 4, prisutne tri vrpce od kojih najviša ima molekulsku masu 102 kDa, srednja 96 kDa i najniža 84 kDa. Ovakav rezultat ukazuje na mogućnost postojanja dvaju mjesta procesiranja proteina Scw10 koja prepoznaju proteaze koje nisu Kex2, s obzirom da ista nije prisutna u ovom soju. Pogledom na uzorke SDS ekstrakata dobivenih iz dva soja divljeg tipa transformirana s plazmidom koji nosi uputu za sintezu Scw10 (BY4741Scw10-A i CRY1Scw10-A), vidljivo je da su u tim uzorcima prisutne samo dvije proteinske vrpce pri čemu nedostaje najviša vrpca. Promotrimo li iste uzorke pri pH 7, primjetno je da je najniža vrpca koja odgovara proteinu mase 84 kDa slabo vidljiva u SDS ekstraktu BY4741Scw10-A soja, dok se ne vidi u uzorcima Y01974Scw10-A i CRY1Scw10-A, a vrpca koja odgovara proteinu mase 102 kDa, vidljiva je ponovno samo u SDS ekstraktu soja Y01974Scw10-A. Nedostatak najniže vrpce u spomenutim uzorcima dobivenima pri pH 7 te njena prisutnost na pH 4 snažno indiciraju da bi nepoznata proteaza koja procesira Scw10 mogala biti upravo iz skupine japsinskih proteaza s obzirom na njihovu nisku aktivnost pri neutralnim pH vrijednostima zbog nemogućnosti njihove aktivacije. Tvrdnju je moguće dodatno potkrijepiti pogledom na rezultate imunoblot analize SDS ekstrakata DKY39Scw10-A koji ima deletiranih svih 5 gena koji kodiraju za japsinske proteaze, a u kojem je prisutna samo jedna proteinska vrpca veličine 96 kDa, neovisno o pH uzgoja. Sve navedeno ukazuje da bi srednja vrpca (96 kDa) mogla biti rezultat procesiranja Scw10 proteazom Kex2. Međutim, prisustvo navedene vrpce u *kex2* mutiranom soju, ukazuje da bi na istom mjestu mogle procesirati i japsinske proteaze. Ova tvrdnja mogla bi se sa sigurnošću potvrditi tek konstruiranjem soja koji ima deletirane gene za svih 5 japsinskih proteaza te *kex2*, međutim prethodni pokušaji konstrukcije ovog soja nisu rezultirali vijabilnim stanicama (neobjavljeni rezultati).

Ostaje još nepoznanica koja su točno mjesta procesiranja spomenutim proteazama. U tu svrhu na prethodno opisani način konstruiran je gen koji kodira za Scw10 protein s izmijenjenom sekvencom za koju se pretpostavlja da ju prepoznaje i procesira proteaza Kex2. Svi sojevi transformirani plazmidom koji nosi uputu za sintezu takvog izmijenjenog gena, izuzev soja DKY39Scw10-A pokazuju prisustvo dviju proteinskih vrpci u SDS ekstraktu, a koje odgovaraju proteinima veličine 98 kDa i 94 kDa, dok je u SDS ekstraktu soja DKY39Scw10-A vidljiva samo vrpca veličine 98 kDa. Rezultat je zanimljiv zbog činjenice da ove dvije vrpce ne odgovaraju niti jednoj vrpci dobivenoj analizom Scw10. Prisustvo dvaju vrpci može

ukazivati da navedenom mutacijom nije obuhvaćeno mjesto nizvodno od sekvence koju prepoznaje Kex2, a koje bi mogle prepoznavati japsinske proteaze pa stoga iste još uvijek mogu procesirati dobiveni protein. U prilog tomu govori i nedostatak niže vrpce u soju koji ima deletirane gene koji kodiraju za japsinske proteaze. Međutim, istovremeno je očekivano da će upravo u ekstraktu soja DKY39Scw10-A biti prisutna proteinska vrpca veličine 102 kDa, a koja odgovara najvišoj vrpci prisutnoj u mutantu *kex2* transformiranim s genom koji kodira za nativni Scw10, s obzirom da se mutirani oblik Scw10 u spomenutom soju ne bi trebao moći biti procesiran niti s Kex2 niti s japsinskim proteazama. No, veličina vrpce koja odgovara potpuno neprocesiranoj formi nije dobivena, što nije moguće jednostavno objasniti. Postoji mogućnost da je prilikom promjene spomenute sekvence došlo do konformacijskih promjena koje mogu utjecati na promjene postranslacijskih modifikacija kao što su stupanj *O*-glikoziliranosti proteina što bi pak rezultiralo drugačijim putovanjem protei na za vrijeme SDS elektroforeze. Za dokazivanje spomenutih pretpostavki bilo bi nužno provesti dodatna ispitivanja koja bih zahtjevala analizu razina *O*- glikozilacije nativnog i promijenjenog proteina Scw10. Ovom analizom nije utvrđeno niti mjesto nizvodno od analizirane sekvence koje bi mogle prepoznavati proteaze iz japsinske skupine, s obzirom da, kao što je ranije rečeno, u sekvenci Scw10 nije prisutna bazična aminokiselina dovoljno blizu paradigmatskog mjesta procesiranja proteazom Kex2, nakon koje bi procesiranje rezultiralo vrpcom veličine 84 kDa. Postoji samo histidinski ostatak na 37.-oj poziciji, osam aminokiselinskih ostataka nizvodno od prethodno analizirane sekvence, koji bi potencijalno mogao biti mjesto procesiranja japsinskim proteazama, no ne postoje literaturni podatci koji bi ukazivali na mogućnost da japsini prepozaju i procesiraju iza histidinskog aminokiselinskog ostatka. Također, valja uzeti u obzir i naboj histidinskog ostatka pri analiziranim pH vrijednostima, s obzirom na relativno nisku pK vrijednost imidazolne grupe u pobočnom ogranku histidina, a koja se može kretati od 6.6 do 6.9, ovisno o položaju histidina unutar proteinske sekvence (Hansen i Kay, 2014). Ukoliko je $His_{37}$ uistinu mjesto procesiranja japsinskim proteazama, smanjena pristunost potpuno procesirane forme mogla bi biti rezultat smanjene količine proteina s protoniranom formom pobočnog ogranka histidina koji potom neće biti prepoznat kao mjesto procesiranja. U daljnjem istraživanju, bit će potrebno zamijeniti histidinski aminokiselinski ostatak drugom aminokiselinom kako bi prethodne pretpostavke mogle biti provjerene.

Analizom NaOH ekstrakata svih korištenih sojeva, moguće je primjetiti da procesiranje ne utječe značajno na sposobnost kovalentnog vezanja Scw10 na stijenku kvasca. Iako je kod Scw4 primjećeno da potpuno procesiranje japsinskim proteazama značajno smanjuje mogućnost njegove kovalentne ugradnje u stijenku (Grbavac i sur., 2017), analizom imunoblota NaOH ekstrakata sojeva uzgojenih pri pH 4 vidljiv je podjednak intenzitet svih prisutnih vrpci u uzorku. Pri uzgoju pri pH 7, potpuno procesirana forma proteina relativno je slabo prisutna u SDS ekstraktu, pa stoga ne čudi njen izostanak u kovalentno vezanoj frakciji. Valja imati na umu da je razlika u količinama uzorka nanesenih na elektroforezu oko 10 puta veća kod NaOH ekstrakata, kako bi se postigla približno jednaka količina signala dobivenih kod SDS ekstrakata.

## 5. RASPRAVA

Stanična stijenka kvasaca koju čini unutarnji polisaharidni sloj te vanjski sloj sačinjen uglavnom od glikoproteina, kompleksna je struktura u čijoj izgradnji i regulaciji sudjeluje velik broj gena. Izložena je konstantnim vanjskim utjecajima te omogućava stanicama preživljenje u nepovoljnim uvjetima. Zbog potrebe za prilagodbom promjenama u okolini, kao i uslijed promjena stanice sukladno staničnom ciklusu, stanična stijenka mora uz mehaničku stabilnost koju pruža stanici, posjedovati i značajnu dozu fleksibilnosti što se postiže rearanžmanima stijenke u kojima sudjeluju primarno enzimi locirani u stijenci. Unatoč iznimne važnosti stijenke za preživljenje stanice, postoje još uvijek brojne nepoznanice vezane za procese koji se u njoj odvijaju, kao i za uloge proteina koji se u njoj nalaze. S obzirom na značajan biotehnološki potencijal stijenke koji se ostvaruje primarno kroz mogućnost upotrebe stijenke kao stanične površine za imobilizaciju proteina od interesa, potrebno je generirati dovoljnu količinu znanja o stijenci koja bi pak omogućila manipulaciju i iskorištavanje njenih karakteristika. Izlaganje i kovalentna ugradnja proteina na staničnoj površini omogućava njihovu stabilizaciju, relativno jednostavno obnavljanje biokatalizatora potrebnih za provođenje biotehnološkog procesa te njegovo jednostavno odvajanje od otopine željenog produkta reakcije. Osim u biotehnološkim procesima, ovakvi sustavi mogu se koristiti u imunološkim studijama ekspresijom antitijela ili antigena na staničnoj površini, kao i u studijama karakteristika pojedinih proteina i protein-protein interakcija izlaganjem čitavih knjižnica generiranih proteina na staničnim površinama (Cherf i Cochran, 2015). Kvasci se ističu kao vrlo dobri sustavi za izlaganje proteina u navedene svrhe s obzirom da omogućavaju provođenje posttranslacijskih modifikacija na sličnom principu na kojem se one odvijaju u drugim, složenijim eukariotskim organizmima kao što su biljne ili animalne stanice, što dodatno omogućava promatranje utjecaja ovih procesa na strukturu i funkciju proteina te smanjuje mogućnost zauzimanja nepravilne konformacije enzima ili nedostatka njegove fiziološke uloge uslijed izostanka spomenutih modifikacija. Međutim, kao što je već rečeno, ne provode svi kvasci postsintetske modifikacije proteina na isti način, što se posebno očituje kod procesa *N*-glikozilacije pri čemu postoje značajne razlike u veličini i sastavu dodanih ugljikohidratnih lanaca. Stoga je važno omogućiti korištenje šireg spektra kvasaca kao stanica domaćina za sustave izlaganja homolognih i heterolognih proteina. No, da bi to bilo moguće, potrebno je poznavati određene karakteristike stanica domaćina kako bi se konstruirali kvalitetni sustavi izlaganja proteina primjenjivi u njima, a koje odlikuju značajna zastupljenost proteina koji služi za imobiliziranje proteina od interesa u stijenku, njegova čvrsta vezanost na

stijenku i nužno osiguravanje prolaska čitavog rekombinantnog proteina kroz sekretorni put. U svrhu prikupljanja što više informacija o stijenkama različitih kvasaca, posebice njihovom proteinskom sastavu, u sklopu ove studije provedena je usporedba proteoma stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* sa proteomima 17 različitih vrsta kvasaca. Sličnu studiju proveli su Coronado i sur. (2007) koji su odabrali 187 gena koji su na neki način vezani uz stijenku, te proveli usporednu analizu genoma 18 vrsta funga, od čega je 8 vrsta kvasaca vrlo srodno kvascu *S. cerevisiae,* dok su ostali evolucijski udaljeniji, a studija uključuje i bazidiomicetne funge kao i različite vrste plijesni. Njihova analiza pokazala je strogu povezanost evolucijske konzerviranosti gena s funkcijom koju njihovi produkti obavljaju, pa je tako najveća konzerviranost uočena za gene koji sudjeluju u procesima sinteze stijenki i njenih prekursora. Rezultati dobiveni unutar ovdje prezentirane studije podupiru rezultate i hipoteze iznesene u studiji koju su proveli Coronado i sur., s obzirom da je usporedna analiza i identifikacija homologa gena koji čine proteom stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* rezultirala najvećim brojem identificiranih homologa među genima odgovornima za sintezu β-1,3-glukana i hitina. Analiza 40 gena uključenih u procese sinteze β-1,3-glukana, β-1,6-glukana i hitina pokazala je visoku konzerviranost gotovo svih gena u svim analiziranim kvascima (**Tablica 13.**), uz rijetke iznimke koje uključuju postojanje više paraloga u kvascu *S. cerevisiae* pri čemu bi nedostajali homolozi jednog od paraloga u drugim analiziranim kvascima. To potvrđuje visoki stupanj konzerviranosti procesa u kojima ti geni sudjeluju. Jedina stvarna iznimka je protein Yea4 koji igra važnu ulogu u sintezi hitina kod kvasca *S. cerevisiae,* a čiji homolozi nisu pronađeni u evolucijski udaljenijim kvascima. Međutim, naglasak ove analize stavljen je na proteine koji se nalaze u samoj stijenci, a koje dijelimo s obzirom na način njihove ugradnje u stijenku, u tri skupine. Prvu skupinu čine proteini koji su u stijenku ugrađeni nekovalentnim interakcijama. Ova skupina proteina također pokazuje značajan nivo evolucijske očuvanosti među analiziranim vrstama kvasaca (**Tablica 14.**). Ovaj rezultat nije toliko neočekivan, obzirom da većina nekovalentno vezanih proteina stijenke ima ulogu u remodeliranju stijenke rearanžmanom glukana i hitina te zapravo omogućavaju onu nužnu fleksibilnost stijenke o kojoj je bilo govora na početku ovog poglavlja. Za većinu gena ili barem za njihove paraloge, detektirani su ortologni geni u drugim vrstama kvasaca, uz iznimku *SRL1* koji je prisutan samo u kvascima roda *Saccharomyces*. S obzirom da njegova uloga nije poznata, ne zna se postoji li protein koji može funkcionalno kompenzirati nedostatak Srl1 u stanicama drugih vrsta kvasaca. Također, studija je pokazala kako najmanju sličnost sa proteinima ove skupine kvasca *S. cerevisiae* pokazuju kvasci iz roda *Schizosaccharomyces* koji ne sadrže ortologe većine potencijalnih glukanaza kvasca *S. cerevisiae,* kao ni ortologe endohitinaza te Knh1 i Kre9

uključenih u sintezu β-1,6-glukana. S obzirom da su kvasci iz roda *Schizosaccharomyces* fizijski kvasci, za vjerovati je da posjeduju druge enzime koji na drugačiji način reguliraju i sudjeluju u rearanžmanu stijenke. Također, ovaj rezultat indicira potencijalnu ulogu proteina čiji ortolozi nisu pronađeni, u procesima usko vezanima uz pupanje kvasaca. To je posebno važno jer za dio tih proteina njihova stvarna fiziološka uloga nije poznata, a ovi rezultati mogu ukazati na neke od potencijalnih funkcija koji se zatim mogu dalje potvrđivati biokemijskim i genetičkim ispitivanjima. Paralelno s *in silico* analizom, provedena je i analiza proteinskih profila stijenke dobivenih specifičnim obilježavanjem proteina na staničnoj površini te selektivnom izolacijom proteina koja iskorištava karakteristike veze koju proteini tvore sa stijenkom. Nekovalentno vezani proteini stijenke izoliraju se tretmanom SDS-om, a rezultati analize ovog ekstrakta ukazuju na prisustvo značajnijeg broja nekovalentno vezanih proteina u svim analiziranim kvascima (**Slika 6.**). Prema položaju proteinskih vrpci, sličnost s kvascem *S. cerevisiae* pokazuju još kvasci evolucijski vrlo bliski njemu poput ostalih vrsta iz rodova *Sacchromyces* te *Kluyveromyces*, dok se već kod idućeg kvasca prema evolucijskoj udaljenosti profili značajno razlikuju. S obzirom na veći broj proteina u ovom ekstraktu teško je donijeti zaključke o potencijalnom proteinskom sastavu stijenki analiziranih kvasca, ali pokazuje značajnu evolucijsku fleksibilnost ove skupine proteina. Također, prema istim rezultatima moguće je zaključiti kako se razina ekspresije ove grupe proteina ne razlikuje značajno između analiziranih vrsta.

Drugu skupinu proteina stijenke čine proteini koji su u stijenku vezani preko GPI sidra. Iako stanice troše znatne količine energije i resursa za sintezu GPI sidra i vezanje ovih proteina na samu staničnu stijenku, začudo ova skupina proteina pokazuje gotovo pa nikakvu razinu evolucijske konzerviranosti. Evolucijski konzervirani su samo rijetki proteini uključeni u organizaciju β-1,3-glukana te paralozi Ecm33 i Pst1 čija uloga nije poznata, ali njihov izostanak uzrokuje smanjenu stabilnost stijenke i aktivaciju signalnog puta za održavanje stabilnosti stijenke. Konzervirane su i proteaze iz skupine japsina, no s obzirom da točna lokalizacija ovih proteaza nije poznata, teško je govoriti o očuvanosti njihove prisutnosti kao kovalentno vezanih proteina stijenke. Zanimljiva je i evolucijska očuvanost flokulina, proteina koji sudjeluju u nespolnom procesu agregiranja stanica kvasca, a za koje analiza pokazuje prisutnost velikog broja ortologa u pojedinim vrstama kvasaca pa tako pronalazi čak 18 ortologa u kvascima *Hanseniaspora osmophila* i *Yarrowia lipolytica*. No, unatoč tomu, generalno je moguće zaključiti kako su proteini iz ove skupine evolucijski slabo očuvani, pa se povlači pitanje što je tomu uzrok. Jedan od mogućih razloga je potencijalna uloga ove skupine proteina u prilagodbi

života pojedine vrste kvasca odabranoj niši, odnosno specifičnim okolišnim uvjetima. Evolucijski pritisak okoline na prisustvo i funkciju ovih proteina mogao bi biti uzrokom njihove velike različitosti među vrstama kvasaca. Ovu tezu moguće je djelomično poduprijeti opsežnom studijom GPI proteina kvasca *Candida albicans* (Richard i Plaine, 2007), a koja ukazuje na ulogu GPI proteina u procesima koji omogućavaju virulenciju te preživljavanje kvasca u organizmu domaćinu, uključujući procese adhezije stanica, otpornosti na oksidativni stres ili pak zaštitu od negativnog djelovanja imunosnog sustava stanica domaćina. Značajno je i da ova skupina proteina stijenke najviše pridonosi formiranju mananskog sloja na površini stanice te na taj način dodatno utječe na njena svojstva. Postoje pretpostavke da GPI proteini stijenke doprinose hidrofobnosti membrane kao i smanjenju poroznosti čitave stanice (De Groot i sur., 2005), što je također oblik odgovora na okolišne stresne uvjete. Sličnu ulogu GPI proteinima smatra se da imaju i Pir proteini, odnosno treća skupina proteina stijenke vezana na stijenku kovalentnom vezom nestabilnom u lužnatim uvjetima. Iako se uloga ove skupine proteina ne zna, poznato je da je Pir2 (Hsp150) pojačano eksprimiran u uvjetima temperaturnog šoka (Russo i sur., 1993), a njegova heterologna ekspresija u plijesni *Fusarium oxysporum* rezultirala je smanjenjem poroznosti stanica te većom otpornosti na biljni protein osmotin (PR-5) koji stanice biljaka luče kao zaštitu od patogenih funga (Narasimhan i sur., 2003). Stoga je za pretpostaviti da je i ova skupina proteina uključena u održavanju stabilnosti stijenke i odgovoru na okolišne promjene i stresore. Homolozi Pir proteina kvasca *S. cerevisiae* pronađeni su u većini analiziranih kvasaca, izuzev nešto evolucijski udaljenijh vrsta što uključuje kvasce iz roda *Schizosaccharomyces* te *Blastobotrys adeninivorans* i *Debaryomyces hansenii*. Prisustvo Pir proteina u stijenkama kvasaca potvrđeno je analizom proteinskih profila dobivenih izolacijom proteina stijenki postizanjem alkalnih uvjeta dodatkom 30 mM NaOH pri čemu dolazi do pucanja kovalentne veze koju ovi proteini tvore sa stijenkom. Zanimljivo je primjetiti kako i kvasci za koje nije zabilježena prisutnost ortologa Pir proteina u stijenci, posjeduju proteinske vrpce u NaOH ekstraktu. U najvećem broju slučajeva može se pretpostaviti da barem jedna od pronađenih vrpci pripada zapravo ortolozima proteina Scw4, odnosno njegovom paralogu Scw10. Naime, ova dva proteina prvotno su okarakterizirana kao nekovalentno vezana, no kasnije je potvrđena njihova prisutnost u kovalentno vezanoj frakciji proteina stijenke *S. cerevisiae* (Teparić i sur., 2004). Iako njihova enzimatska aktivnost nikad nije dokazana, Scw4 i Scw10 smatraju se potencijalnim glukanazama s obzirom na homologiju s glukanazom Bgl2 te nekim glukanazama biljnog porijekla. Unatoč nepotvrđenoj funkciji, ova studija pokazuje njihov visok stupanj evolucijske očuvanosti pri čemu su homolozi ovih dvaju proteina bili prisutni u svim kvascima izuzev vrsta roda *Schizosaccharomyces*. Analizom

proteinskih profila dobivenih u NaOH ekstraktu (**Slika 7.**), vidljivo je da većina proteina sadrži proteinsku vrpcu veličine oko 60-tak kDa što odgovara veličini Scw4 proteina u kvascu *S. cerevisiae* (67 kDa), pa bi lako bilo moguće da se kod svih tih vrsta uistinu radi o prisutnosti ortologa Scw4, no za potvrdu ove hipoteze bilo bi potrebno provesti sekvenciranje tih proteinskih vrpci. U ekstraktima proteina stijenki kvasaca iz roda *Kluyveromyces* te kvasca *Y. lipolytica* detektirani su ortolozi i Pir proteina i proteina Scw4/10, međutim u proteinskom profilu NaOH ekstrakta vidljiva je samo jedna proteinska vrpca. Ukoliko pretpostavimo da ova proteinska vrpca pripada ortologu Scw4/10, to bi potencijalno moglo ukazivati na mogućnost ekspresije ortologa Pir proteina samo u specifičnim uvjetima. Kvasci *D. hansenii* i *B. adeninivorans* nemaju detektirane ortologe Pir proteina, no imaju ortolog proteina Scw4/10, a u NaOH ekstraktu vidimo jednu proteinsku vrpcu, koja bi i prema molekulskoj masi mogla odgovarati ortologu Scw4/10. Zanimljiv rezultat zabilježen je kod kvasaca iz roda *Metschnikowia* kod kojih je zabilježen značajno veći broj proteina u NaOH ekstraktu nego što je detektirano ortologa Scw4/10 i Pir proteina. Postoji mogućnost da se u ovim kvascima pojavljuju i drugi proteini koji se mogu vezati istim tipom veze. Slično se može pretpostaviti i za kvasce iz roda *Schizosaccharomyces* koji nemaju detektirane ortologe niti Scw4/10 niti Pir proteina, ali posjeduju proteinske vrpce u NaOH ekstraktu. U prilog postojanju i drugih proteina koji se na stijenku mogu vezati vezom nestabilom u lužnatom govori i činjenica da je u ekstraktu dobivenom tretmanom blagom lužinom proteina stijenki kvasca *S. cerevisiae* detektiran i protein Tos1 (Yin i sur. 2005), čija uloga nije poznata, a koji nije obuhvaćen ovdje prezentiranom usporedbom proteoma. Kao ni Scw4 ili Scw10, niti Tos1 ne posjeduje karakterističnu „Pir sekvencu“, odnosno unutarnju ponavljajuću sekvencu Pir proteina odgovornu za njihovu kovalentnu ugradnju u staničnu stijenku. Rezultati analize ekstrakata proteina dobivenih tretmanom stijenki enzimom β-1,3-glukanazom potvrđuju rezultate dobivene NaOH ekstrakcijom, s obzirom da se ovom vrstom ekstrakcije uklanjaju svi proteini kovalentno vezani na stijenku što uključuje i proteine vezane vezom nestabilnom u lužnatom i GPI proteine. GPI proteini zapravo su tek vidljivi u gornjoj polovici imunoblotova β-glukanaznog ekstrakta (veličine iznad 200 kDa) gdje ne tvore jasne vrpce već formiraju veće područje signala (**Slika 8.**) što je najvjerojatnije posljedica većeg broja ovih proteina, različito glikoziliranih što može tvoriti više različitih proteinskih vrpci koji pripadaju istom proteinu. S obzirom na nepostojanje jasnih vrpci teško je govoriti o točnoj veličini i broju GPI proteina pristutnih u stijenkama različitih kvascima samo na temelju ove analize.

Analiza plastičnosti stijenke, odnosno promjena u ekspresiji proteina stijenke uslijed temperaturnog šoka (**Slika 10.**) pokazala je zapravo relativno nisku razinu promjena u stijenci. Najznačajnije promjene vidljive su u proteinskim profilima dobivenima u SDS ekstraktu, gdje se vidi pojačana količina svih nekovalentno vezanih proteina nakon temperaturnog šoka. Moguće je da se radi o specifičnom odgovoru stanica na potencijalna oštećenja stijenke nastala toplinskim tretmanom. Gotovo nikakve promjene nisu zabilježene u razini ekspresije proteina koje je moguće detektirati u NaOH i β-glukanaznom ekstraktu. Ovo je zanimljivo s obzirom da na genomskoj razini dolazi do povećanja razine ekspresije gena *PIR2* (Russo i sur., 1993), međutim to nije zabilježeno u prezentiranoj analizi na proteinskoj razini u danom vremenskom trajanju temperaturnog šoka. Značajnije razlike u proteinskim profilima vidljive su kod dva analizirana soja kvasca *Y. lipolytica* pri čemu jedan od svojeva preferencijalno raste u obliku pupajućeg kvasca, dok drugi raste u pseudohifalnom obliku na danom hranjivom mediju. Iz proteinskih profila danih na **slikama 6., 7.** i **8.**, vidljive su značajne razlike u visini i broju proteinskih vrpci što bi moglo ukazivati na ekspresiju različitih gena, ovisno o načinu rasta, ili pak na promjene u glikozilacijskim obrascima također kao direktnoj posljedici načina rasta kvasaca. Usporedba proteinskih profila triju sojeva kvasca *S. cerevisiae* pri čemu se radi o jednom laboratorijskom soju te dvama divljim sojevima, nije zabilježena nikakva značajna razlika (**Slika 9.**). Na istoj slici vidljivi su i rezultati analize proteinskih profila dodatnih kvasaca iz roda *Saccharomyces* (*S. paradoxus, S. kudriavzevii* te hibridni soj *S. cerevisiae x S. kudriavzevii*) kako bi se utvrdio stupanj različitosti proteinskih profila između izrazito srodnih vrsta. Ova analiza pokazala je iznimnu sličnost proteinskih profila, pri čemu su jedine razlike vidljive u proteinskoj vrpci kvasca *S. paradoxus* koja najvjerojatnije odgovara proteinu Pir2. Varijacije u veličini ovog proteina objavljene su i ranije, gdje je uočeno kako različiti vinarski sojevi kvasca *S. cerevisiae* koji tvore biofilm imaju manji broj „Pir“ ponavljanja te su detektirane proteinske vrpce manje molekulske mase u odnosu na laboratorijski soj (Kovács i sur., 2008). Triploidni hibridni soj korišten u ovoj analizi, također nije rezultirao drugačijim proteinskim profilom, izuzev proteinske vrpce veličine 40 kDa koja nije jasno vidljiva u parentalnim sojevima ovog hibrida. Unatoč brojnim genomskim rearanžmanima koji se odvijaju u ovakvim hibridnim sojevima te višestrukom ploiditetu stanica, proteinski profili stijenke pokazuju se relativno stabilni i konzistentni što također može ukazivati na važnost stijenke i njene konzerviranosti.

Uzevši sve rezultate u obzir, može se primjetiti da kvasac *S. cerevisiae* i vrlo srodni kvasci pokazuju prisustvo u pravilu nešto više proteinskih vrpci nego što je to slučaj kod ostalih kvasaca, posebice u NaOH i β-glukanaznom ekstraktu. Međutim, isto tako je moguće zaključiti kako sve analizirane vrste kvasca posjeduju sva tri tipa veza koju proteini *S. cerevisiae* ostvaruju sa stijenkom, što je informativno u svjetlu razvoja sustava za izlaganje proteina u novim stanicama domaćinima. Vrste s manjim brojem proteina u stijenci također su potencijalno dobri kandidati za domaćine ovim sustavima jer je time omogućeno da se delecijom manjeg broja gena, koji kodiraju za kovalentno vezane proteine stijenke, konstruiraju sojevi koji bi mogli imati veći kapacitet za vezanje rekombinantnih proteina. Kvasci iz roda *Kluyveromyces* te *Torulaspora delbrueckii* pak također mogu biti dobri kandidati, upravo zbog sličnosti njihovih proteinskih profila s proteinskim profilom stijenke kvasca *S. cerevisiae*. Takva sličnost mogla bi ukazivati na mogućnost primjene već razvijenih sustava za izlaganje na površini kvasca *S. cerevisiae* u ovim kvascima, čime se smanjuje dugotrajnost postupka konstrukcije novih sustava.

Iako su sustavi za izlaganja proteina razvijeni za *S. cerevisiae* već korišteni u drugim kvascima, u ovoj studiji korišteni su sustavi izlaganja proteina upotrebom proteina Ccw12 i Pir4 koji prethodno nisu korišteni za izlaganje proteina u drugim kvascima. Kao gen reporter korišten je gen *GRE3* koji kodira za intracelularnu ksiloza-reduktazu (XR) kvasca *S. cerevisiae*. Ovaj odabir napravljen je kako bi se mogli usporediti rezultati analize korištenja ovih sustava u kvascu *S. cerevisiae* s upotrebom istih sustava u drugom kvascu domaćinu. U studiji koju su proveli Hossain i sur. (2019), razvijeni su sustavi od kojih prvi omogućava N-terminalnu imobilizaciju XR genetskom fuzijom *GRE3* s *PIR4*. Na ovaj način nastaje rekombinantni protein koji je preko svog N-terminalnog kraja vezan na stijenku vezom nestabilnom u lužnatom, dok na svom C-terminalnom kraju ima funkcionalan XR enzim. Drugi konstrukt osigurava C-terminalnu imobilizaciju XR na način da je genetski dodan dio sekvence gena *CCW12* koji kodira za dio proteina Ccw12 koji služi kao signalna sekvenca za vezanje proteina na GPI sidro. U navednoj studiji ustvrđeno je kako su oba konstrukta uspješno kovalentno vezana u stijenku te je u oba konstrukta detektirana aktivnost XR. Ova dva konstrukta iskorištena su za izlaganje XR na površini kvasca *Komatagaella phaffii*. *K. phaffii* odabran je kao kvasac domaćin u ovoj studiji s obzirom na prethodno dobre rezultate izlaganja homolognih i heterolognih proteina na njegovoj površini korištenjem drugih sustava, relativno velikoj razini sekrecije proteina te drugčije razine glikozilacije u odnosu na kvasac *S. cerevisiae (Jacobs i sur., 2008; Khasa i sur., 2011; Ahmad i sur., 2014; Li i sur., 2015)*. Odabrani

konstrukti stavljeni su pod kontrolu promotora *PDC* te je indukcija provedena dodatkom metanola u uzgojni medij. Dobiveni rezultati pokazuju uspješnu ekspresiju i prolazak rekombinantnog proteina kroz sekretorni put i lokalizaciju u stijenci, no kovalentna imobilizacija nije postignuta s oba korištena konstrukta (**Slika 12.**). Naime, prilikom korištenja sustava za N-terminalnu imobilizaciju, nije došlo do uspostavljanja kovalentne veze nestabilne u lužnatom. Uzroka tomu može biti nekoliko, a pretpostavlja se da se radi o nepovoljnim konformacijskim promjenama proteina Pir4 koji je dio ovog rekombinantnog proteina. Kao što je analiza proteinskih profila pokazala (**Slika 7.**), *K. phaffii* u svojoj stijenci sadrži proteine koji se u nju mogu ugraditi ovim tipom veze, a studija Khasa i sur. (2011) pokazuje korištenje Pir proteina *K. phaffii* za izlaganje heterolognih proteina na njenoj površini. Stoga nije vjerojatno da se rekombinantni protein nije mogao ugraditi zbog potencijalnog nedostatka određenih mehanizama koji bi omogućili ugradnju Pir proteina u stijenku ovog kvasca. S obzirom na uspješnu ugradnju ovog konstrukta kod kvasca *S. cerevisiae*, moguće je da je proces smatanja ili postsintetskih modifikacija u *K. phaffii* uzrok nemogućnosti ugradnje rekombinantnog proteina u stijenku ovog soja ili se pak Pir4 značajno razlikuje od ortologa prisutnih u *K. phaffii* usijed čega ne dolazi do njegove ugradnje u stijenku. Kovalentna imobilizacija preko GPI sidra uspješno je provedena. Jedan od postavljenih ciljeva ove studije bio je i usporediti aktivnost ekspirmirane XR u *K. phaffii* s aktivnošću XR eksprimirane u *S. cerevisiae* i objavljene u studiji Hossain i sur. (2019). Time bi se stekao uvid u količinu proteina (enzima) koji se može vezati u stijenku, relativno gledajući u odnosu na kvasac *S. cerevisiae*. Nažalost, tu analizu nije bilo moguće provesti jer enzim eksprimiran u *K. phaffii* nije bio aktivan. Uzroci mogu biti rezultat konformacijskih promjena, s obzirom da su tijekom analize, ograničavajući faktori odvijanja reakcije, kao što su nedovoljna koncentracija pojedinog suspstrata ili nepovoljni pH i temperaturni uvjeti, isključeni kao razlog nedostatka aktivnosti.

S obzirom da su ovakvi slučajevi neuspješnih imobilizacija ili gubitka funkcije željenog proteina prilikom njegovog izlaganja na površinu česti, potrebno je konstantno razvijati nove sustave. Kao mogući kandidati za razvoj neke verzije univerzalnog sustava za izlaganje proteina koji bi se mogao koristiti u velikom broju različitih kvasaca ističu se proteini Scw4 i Scw10. Kao što je vidljivo u prethodnim rezultatima, homolozi ovih proteina postoje u velikom broju vrsta kvasaca. Za razliku od Pir proteina, prisutni su u većoj količini u stijenci kvasca *S. cerevisiae*, a za razliku od GPI proteina, potreban je manji utrošak resursa stanice za njihovu sintezu čime se potencijalno može postići veći kapacitet proizvodnje ispravno smotanih proteina vezanih na stijenku. Međutim, kako bi se ovi proteini mogli koristiti za izlaganje

rekombinantnih proteina, potrebno je razjasniti njihov mehanizam kovalentnog vezanja na stijenku.

Analizom sekvence proteina Scw4 pronađena je regija (VR2) koja donekle nalikuje Pir ponavljajućoj sekvenci te još jedna regija s nešto manjom sličnošću (VR1). Kao prvi pristup pronalasku mjesta na Scw4 proteinu odgovornom za njegovu kovalentnu ugradnju u stijenku napravljena je delecijska analiza pri čemu je sekvenca Scw4 skraćivana s njegovog N-terminalnog kraja do početka regija za koje se pretpostavljalo da bi mogle biti vezne. Rezultati (**Slika 14B**) su međutim pokazali da ne postoji značajna količina kovalentno vezane frakcije niti jednog od konstukata Scw4 u stijenci te se stoga pristupilo ciljanim delecijama. Izuzev prethodno opisanih regija od interesa, zanimljiva je bila i sekvenca za koju je prethodno pokazano da je mjesto proteolitičkog procesiranja Scw4 japsinskim proteazama (Grbavac i sur., 2017), s obzirom da se lizin nakon kojeg dolazi do procesiranja nalazi okružen dvama glutaminskim ostacima. To je zanimljivo iz dva razloga: prvi uključuje činjenicu da su glutaminski ostaci odgovorni za kreiranje kovalentne veze kod Pir proteina, pa se pretpostavlja da i kod Scw4 iste aminokiseline sudjeluju u formiranju veze s obzirom na istu prirodu ovih veza, a drugi uključuje činjenicu da je u prethodno spomenutoj studiji pokazano da nakon procesiranja s japsinskim proteazama dolazi do značajnog smanjenja kovalentnog vezanja ovog proteina u stijenku. Ukoliko je glutaminski ostatak koji prethodi lizinu odgovoran za kovalentno vezanje Scw4, procesiranjem bi došlo do odcjepljenja vezanog dijela proteina te bi se nevezani, procesirani dio proteina otpustio u medij ili ostao vezan nekovalentnim interakcijama te bi to potencijalno objasnilo prethodno uočeni efekt. Iz svih navedenih razloga, uvedene su mutacije u regije VR1 i VR2 te su mutirani glutaminski ostaci na mjestu procesiranja japsinskim proteazama. Iako su manji efekti na sposobnost kovalentnog vezanja Scw4 uočeni uvođenjem mutacija u mjesto procesiranja japsinskim protezama te u regiju VR1, potpuni gubitak sposobnosti kovalentnog vezanja Scw4 uočen je tek mutacijom regije VR2, koja je i pokazala najveću sličnost s Pir ponavljajućom sekvencom (**Slika 17**). Mutacije u VR1 regiji rezultirale su smanjenim udjelom kovalentno vezane frakcije Scw4 u stijenkama kvasaca (sojevi BY4741Scw4-H i Y01974Scw4-H), a efekt je izraženiji u divljem tipu kvasca (BY4741) nego u soju s delecijom *kex2* (Y01974) te pri uzgoju pri pH 4 u odnosu na uzgoj pri pH 7. To ukazuje na vjerojatnu povezanost kumulativnog učinka proteolitičkog procesiranja (pojačano prisutno u BY4741 soju i pri pH 4) japsinskim proteazama te mutacija unesenih u sam protein što najvjerojatnije rezultira takvom promjenom konformacije proteina koja smanjuje mogućnost njegova kovalentnog vezanja. S obzirom da do kovalentnog vezanja pri

određenim uvjetima ipak dolazi, može se relativno sigurno pretpostaviti da VR1 regija nije regija preko koje dolazi do ostvarivanja kovalentne veze Scw4 sa stijenkom. Da bi takva regija mogla biti upravo VR2 regija, potvrdio je i eksperiment u kojem je cijela regija u potpunosti deletirana te je rezultat bio identičan kao i pri uvođenju mutacija u ovu regiju, odnosno nije došlo do detekcije kovalentno vezanog Scw4 (soj BY4741Scw4-C). Kao dodatnu potvrdu te provjeru koji od glutaminskih ostataka ostvaruje kovalentno vezanje sa stijenkom, provedena je pojedinačna mutacija svakog od tri glutaminska ostatka u ovoj regiji i rezultati pokazuju kako mutacijom $Q_{241}$ izostaje mogućnost detekcije Scw4 proteina u NaOH ekstraktu (**Slika 18**). Time je nedvojbeno pokazano kako regija od 233.-og do 246.-og aminokiselinskog ostatka u Scw4 sudjeluje u njegovom kovalentnom vezanju na stijenku, pri čemu je za vezu najznačajniji $Q_{241}$ aminokiselinski ostatak.

S obzirom da prethodno nije u potpunosti razjašnjeno proteolitičko procesiranje Scw10 proteina niti njegov utjecaj na vezanje ovog proteina, pristupljeno je analizi istog. Protein Scw10 te mutirani oblik proteina (Scw10K) koji ima mutacije u regiji za koju se pretpostavlja da ju prepoznaje Kex2 proteinaza eksprimirani su u sojevima divljeg tipa (BY4741, CRY1) te u sojevima koji imaju deletirane gene *KEX2* (Y01974) ili svih 5 gena koji kodiraju za japsinske proteinaze (DKY39). Rezultati analize pokazuju da se potpuno neprocesirana forma proteina veličine 102 kDa postiže samo ekspresijom nativnog proteina u soju kvasca s delecijom *kex2* (**Slika 19**). Time je potvrđeno da dolazi do procesiranja ovog proteina Kex2 proteazom, pri čemu najvjerojatnije nastaje forma proteina veličine 96 kDa. S obzirom da ova forma postoji i u *kex2* mutantu, za pretpostaviti je da na istom mjestu koje prepoznaje Kex2, procesiraju i neke druge proteinaze. S obzirom da je prisutnost takve forme nešto slabija pri uzgoju ovog soja pri pH 7, može se pretpostaviti da na tom mjestu cijepaju japsinske proteaze, s obzirom na njihovu slabiju aktivnost pri neutralnim pH vrijednostima. Također postoji i treća forma ovog proteina, veličine oko 84 kDa, koja nastaje procesiranjem nepoznatim proteazama. S obzirom da ova forma nedostaje kod ekspresije Scw10 u soju s deletiranim genima koji kodiraju za japsine, može se s relativno visokom sigurnošću pretpostaviti da su upravo japsini odgovorni za potpuno procesiranje Scw10. Međutim, zbunjuje činjenica da nizvodno od mjesta procesiranja proteinazom Kex2, ne postoji očito mjesto koje bi mogli prepoznavati japsini. Jedina bazična aminokiselina u sekvenci nakon koje bi procesiranjem mogla nastati forma veličine 84 kDa je histidinski ostatak na 37.-oj poziciji, no do sada nije potvrđeno da japsini mogu prepoznavati histidin kao mjesto procesiranja pa se ova teza mora dodatno potvrditi. Analizom rezultata dobivenih ekspresijom mutiranog Scw10K proteina, dobiveni su zanimljivi

podatci s obzirom da su detektirane dvije proteinske vrpce veličine 98 i 94 kDa, pri čemu manja vrpca nije vidljiva u soju s deletiranim genima za japsine. Veličine ovih vrpci ne odgovaraju veličinama proteinskih vrpci dobivenih ekspresijom nativnog Scw10 zbog čega je teško govoriti jesu li navedene vrpce rezultat procesiranja mutiranog proteina ili ne, te ukoliko jesu, gdje i koje protaze ga procesiraju. Ovakvi rezultati mogli bi biti posljedica u promjeni putovanja mutiranog proteina u odnosu na nativni, kroz sam gel prilikom elektroforeze, najvjerojatnije zbog promjena u strukturi i/ili glikozilaciji proteina. U daljnjim koracima ispitivanja potrebno bi bilo provesti mutacije pojedinačnih aminokiselina u ovoj regiji i promatrati njihov utjecaj na pojavu proteinskih vrpci u pojedinom soju.

Iz rezultata analize NaOH ekstrakata spomenutih sojeva (**Slika 19**) moguće je pak izvući zaključak kako proteolitičko procesiranje ne utječe značajno na sposobnost kovalentnog vezanja Scw10 u stijenku kao što je to slučaj s Scw4, s obzirom da su sve tri detektirane forme ovog proteina kao i mutirani protein Scw10K detektirani u NaOH ekstraktu. Ipak, forma koja se dominantno detektira u ovom ekstraktu je protein veličine 96 (Scw10), odnosno 98 (Scw10K) kDa, što može ukazivati da ovako procesirana forma, najvjerojatnije proteinazom Kex2, zauzima konformaciju koja omogućava kovalentno vezanje u stijenku te je najzastupljenija od triju, odnosno dviju detektiranih formi. Ostaje za provjeriti koja regija u proteinu Scw10 omogućuje njegovu kovalentnu ugradnju u stijenku, no zanimljivo je primjetiti kako Scw10 posjeduje glutaminski ostatak na 241.-oj pozici baš kao i Scw4, no ostatak sekvence koji se kod Scw4 pokazao odgovornim za vezanje gotovo u potpunosti se razlikuje s obzirom da nedostaju prethodna dva glutaminska ostatka, te ostaje za vidjeti je li samo spomenuti glutaminski ostatak dovoljan za formiranje kovalentne veze između proteina Scw10 i dijelova stijenke.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Geni uključeni u sintezu i regulaciju sinteze komponenti stijenke poput β-glukana i hitina ostali su evolucijski očuvani čak i kod kvasaca značajno evolucijski udaljenih od kvasca *S. cerevisiae*.

2. Proteini koji se nalaze nekovalentno vezani na stijenku i spadaju u skupine enzima koji sudjeluju u remodeliranje stijenke pokazuju veću evolucijsku očuvanost u odnosu na proteine kovalentno ugrađene u stijenku.

3. Sustave za izlaganje proteina na površini kvasca *S. cerevisiae* moguće je koristiti u istu svrhu i kod kvasca *K. phaffii*, iako sustav koji se zasniva na kovalentnom vezanju Pir4 proteina na stijenku nije uspješno kovalentno vezan na stijenku kvasca *K. phaffii*. Izlaganjem rekombinantnog enzima ksiloza-reduktaze iz *S. cerevisiae* u kvascu *K. phaffii* došlo je i do gubitka aktivnosti ovog enzima.

4. Proteini Scw4 i Scw10 kovalentno se vežu u staničnu stijenku pri čemu se Scw4 ta veza ostvaruje preko sekvence od 233. do 246. aminokiselinskog ostatka, a pri čemu je ključan glutaminski ostatak na 241.-oj poziciji.

5. Protein Scw10 procesira se Kex2 proteazom te najvjerojatnije japsinskim proteazama na mjestu nizvodnom od mjesta procesiranja proteazom Kex2. Procesiranje Scw10 ne utječe značajno na njegovu sposobnost kovalentnog vezanja na stijenku.

## 7. LITERATURNI IZVORI


Abe, H., Shimma, Y., Jigami, Y. (2003) In vitro oligosaccharide synthesis using intact yeast cells that display glycosyltransferases at the cell surface through cell wall–anchored protein Pir. *Glycobiology* **13**, 87–95.

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.

Absmanner, B., Schmeiser, V., Kämpf, M., Lehle, L. (2010) Biochemical characterization, membrane association and identification of amino acids essential for the function of Alg11 from Saccharomyces cerevisiae, an α1, 2-mannosyltransferase catalysing two sequential glycosylation steps in the formation of the lipi. *Biochem. J.* **426**, 205–217.

Aebi, M., Gassenhuber, J., Domdey, H., Heesen, S. te (1996) Cloning and characterization of the ALG3 gene of Saccharomyces cerevisiae. *Glycobiology* **6**, 439–444.

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H. (2014) Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5301–5317.

Aimanianda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., Latgé, J.-P. (2009) Cell wall β-(1, 6)-glucan of Saccharomyces cerevisiae structural characterization and in situ synthesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 13401–13412.

Andrés, I., Gallardo, O., Parascandola, P., Javier Pastor, F. I., Zueco, J. (2005) Use of the cell wall protein Pir4 as a fusion partner for the expression of Bacillus sp. BP-7 xylanase A in Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnol. Bioeng.* **89**, 690–697.

Andrés, I., Rodríguez-Díaz, J., Buesa, J., Zueco, J. (2006) Yeast expression of the VP8* fragment of the rotavirus spike protein and its use as immunogen in mice. *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 89–98.

Appeltauer, U., Achstetter, T. (1989) Hormone-induced expression of the CHSl gene from Saccharomyces cerevisiae. *Eur. J. Biochem.* **181**, 243–247.

Ashida, H., Hong, Y., Murakami, Y., Shishioh, N., Sugimoto, N., Kim, Y. U., Maeda, Y., Kinoshita, T. (2005) Mammalian PIG-X and yeast Pbn1p are the essential components of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1439–1448.

Bago, B., Chamberland, H., Goulet, A., Vierheilig, H., Lafontaine, J.-G., Piché, Y. (1996) Effect of Nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular-mycorrhizal fungi. *Protoplasma* **192**, 80–92.

Baker, E., Wang, B., Bellora, N., Peris, D., Hulfachor, A. B., Koshalek, J. A., Adams, M., Libkind, D., Hittinger, C. T. (2015) The genome sequence of Saccharomyces eubayanus and the domestication of lager-brewing yeasts. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 2818–2831.

Ballou, C. E. (1990) Isolation, characterization, and properties of Saccharomyces cerevisiae mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* **185**, 440–470.

Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin, M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M., Lodge, J. K. (2005) A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen Cryptococcus neoformans. *Eukaryot. Cell* **4**, 1902–1912.

Banno, I. (1967) Studies on the sexuality of Rhodotorula. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 167–196.

Barlowe, C., d'Enfert, C., Schekman, R. (1993) Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**, 873–879.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R. (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895–907.

Barnes, G., Hansen, W. J., Holcomb, C. L., Rine, J. (1984) Asparagine-linked glycosylation in Saccharomyces cerevisiae: genetic analysis of an early step. *Mol. Cell Biol.* **4**, 2381–2388.

Bartnicki-Garcia, S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **22,** 87–108.

Bartnicki-Garcia, S., Lindberg, B. (1972) Partial characterization of mucoran: the glucuronomannan component. *Carbohydr. Res.* **23**, 75–85.

Bell, A. A., Wheeler, M. H. (1986) Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**, 411–451.

Belloch, C., Querol, A., Garcia, M. D., Barrio, E. (2000) Phylogeny of the genus Kluyveromyces inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 405–416.

Benghezal, M., Benachour, A., Rusconi, S., Aebi, M., Conzelmann, A. (1996) Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *EMBO J.* **15**, 6575–6583.

Bernard, M., Latgé, J.-P. (2001) Aspergillus fumigatus cell wall: composition and biosynthesis. *Med. Mycol.* **39**, 9–17.

Beth-Din, A., Yarden, O. (2000) The Neurospora crassa chs3 gene encodes an essential class I chitin synthase. *Mycologia* **92**, 65–73.

Bickel, T., Lehle, L., Schwarz, M., Aebi, M., Jakob, C. A. (2005) Biosynthesis of Lipid-linked Oligosaccharides in Saccharomyces cerevisiae Alg13p AND Alg14p form a complex required for the formation of GlcNAc2-PP-Dolichol. *J. Biol. Chem.* **280**, 34500–34506.

Blobel, G., Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* **67**, 835–851.

Bloomfield, B. J., Alexander, M. (1967) Melanins and resistance of fungi to lysis. *J. Bacteriol.* **93**, 1276–1280.

Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A., Bussey, H. (1990) Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J. Cell Biol.* **110**, 1833–1843.

Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N. (2004) Lessons from the genome sequence of Neurospora crassa: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 1–108.

Bourbonnais, Y., Germain, D., Ash, J., Thomas, D. Y. (1994) Cleavage of prosomatostatins by the yeast Yap3 and Kex2 endoprotease. *Biochimie* **76**, 226–233.

Bowman, S. M., Free, S. J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* **28**, 799–808.

Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J. D. (1998) Designer deletion strains derived from Saccharomyces cerevisiae S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115–132.

Breinig, F., Diehl, B., Rau, S., Zimmer, C., Schwab, H., Schmitt, M. J. (2006) Cell surface expression of bacterial esterase A by Saccharomyces cerevisiae and its enhancement by constitutive activation of the cellular unfolded protein response. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7140–7147.

Brennwald, P., Liao, X., Holm, K., Porter, G., Wise, J. A. (1988) Identification of an essential Schizosaccharomyces pombe RNA homologous to the 7SL component of signal recognition particle. *Mol. Cell Biol.* **8**, 1580–1590.

Briggs, M. S., Gierasch, L. M. (1984) Exploring the conformational roles of signal sequences: synthesis and conformational analysis of. lambda. receptor protein wild-type and mutant signal peptides. *Biochemistry* **23**, 3111–3114.

Brown, J. A., Catley, B. J. (1992) Monitoring polysaccharide synthesis in Candida albicans. *Carbohydr. Res.* **227**, 195–202.

Brown, J. D., Hann, B. C., Medzihradszky, K. F., Niwa, M., Burlingame, A. L., Walter, P. (1994) Subunits of the Saccharomyces cerevisiae signal recognition particle required for its functional expression. *EMBO J.* **13**, 4390–4400.

Brown, J. L., Bussey, H. (1993) The yeast KRE9 gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. *Mol. Cell Biol.* **13**, 6346–6356.

Brown, R. G., Lindberg, B. (1967) Polysaccharides from Cell Walls of Aureobasidium. *Acta chem. scand.* **21**, 2379-2382.

Bull, A. T. (1970) Kinetics of cellulase inactivation by melanin. *Enzymologia 39*, 333-347.

Burda, P., Aebi, M. (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* **1426**, 239–257.

Burda, P., Jakob, C. A., Beinhauer, J., Hegemann, J. H., Aebi, M. (1999) Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**, 617–625.

Bussey, H. (1991) K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol. Microbiol.* **5**, 2339–2343.

Byrne, K. P., Wolfe, K. H. (2005) The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res.* **15**, 1456–1461.

Cabib, E., Farkas, V., Kosík, O., Blanco, N., Arroyo, J., McPhie, P. (2008) Assembly of the yeast cell wall: Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **283**, 29859–29872.

Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B., Silverman, S. J. (1989) Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *J. Cell Biol.* **108**, 1665–1672.

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

Carotti, C., Ragni, E., Palomares, O., Fontaine, T., Tedeschi, G., Rodríguez, R., Latge, J. P., Vai, M., Popolo, L. (2004) Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanosyltransferase activity and folding. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3635–3645.

Castillo, L., Martinez, A. I., Garcerá, A., Victoria Elorza, M., Valentín, E., Sentandreu, R. (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of Saccharomyces cerevisiae Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β-1, 3-glucan. *Yeast* **20**, 973–983.

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**, 584–91.

Chantret, I., Dancourt, J., Barbat, A., Moore, S. E. H. (2005). Two proteins homologous to the N-and C-terminal domains of the bacterial glycosyltransferase Murg are required for the second step of dolichyl-linked oligosaccharide synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **280**, 9236–9242.

Cherf, G. M., Cochran, J. R. (2015). Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering. *Methods Mol. Biol.* **1319**, 155–175.

Chin, C. F., Bennett, A. M., Ma, W. K., Hall, M. C., Yeong, F. M. (2012). Dependence of Chs2 ER export on dephosphorylation by cytoplasmic Cdc14 ensures that septum formation follows mitosis. *Mol. Biol. Cell* **23**, 45–58.

Choi, W.-J., Santos, B., Durán, A., Cabib, E. (1994). Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranslational level? *Mol. Cell Biol.* **14**, 7685–7694.

Choi, W.-J., Sburlati, A., Cabib, E. (1994). Chitin synthase 3 from yeast has zymogenic properties that depend on both the CAL1 and the CAL3 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 4727–4730

Christodoulidou, A., Bouriotis, V., Thireos, G. (1996). Two Sporulation-specific Chitin Deacetylase-encoding Genes Are Required for the Ascospore Wall Rigidity of Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **271**, 31420–31425

Chuang, J. S., Schekman, R. W. (1996). Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J. Cell. Biol.* **135**, 597–610

Cipollo, J. F., Trimble, R. B., Chi, J. H., Yan, Q., Dean, N. (2001a). The yeast ALG11 gene specifies addition of the terminal alpha 1,2-Man to the Man5GlcNAc2-PP-dolichol N-glycosylation intermediate formed on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **276**, 21828–21840.

Colman-Lerner, A., Chin, T. E., Brent, R. (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* **107**, 739–750.

Coronado, J. E., Mneimneh, S., Epstein, S. L., Qiu, W.-G., Lipke, P. N. (2007). Conserved processes and lineage-specific proteins in fungal cell wall evolution. *Eukaryot. Cell* **6**, 2269–2277.

Couto, J. R., Huffaker, T. C., Robbins, P. W. (1984). Cloning and expression in Escherichia coli of a yeast mannosyltransferase from the asparagine-linked glycosylation pathway. *J. Biol. Chem.* **259**, 378–382.

Daniel, H.-M., Meyer, W. (2003). Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 61–78.

Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., Gasser, B. (2013). The secretory pathway: Exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 872–914.

Delsuc, F., Brinkmann, H., Philippe, H. (2005). Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 361–375.

DeMarini, D. J., Adams, A. E. M., Fares, H., Virgilio, C. De, Valle, G., Chuang, J. S., Pringle, J. R. (1997). A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the Saccharomyces cerevisiae cell wall. *J. Cell. Biol.* **139**, 75–93.

Dietrich, F. S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pöhlmann, R., Luedi, P., Choi, S. (2004). The Ashbya gossypii genome as a tool for mapping the ancient Saccharomyces cerevisiae genome. *Science* **304**, 304–307.

Dietrich, F. S., Voegeli, S., Kuo, S., Philippsen, P. (2013). Genomes of Ashbya fungi isolated from insects reveal four mating-type loci, numerous translocations, lack of transposons, and distinct gene duplications. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **3**, 1225–1239.

Dijkgraaf, G. J. P., Brown, J. L., Bussey, H. (1996). The KNH1 gene of Saccharomyces cerevisiae is a functional homolog of KRE9. *Yeast* **12**, 683–692.

Dominguez, Á., Fermiñán, E., Sánchez, M., González, F. M., Pérez-Campo, F. M., García, S., Herrero, A. B., San Vicente, A., Cabello, J., Prado, M. (1998). Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *Int. Microbiol.* **1**, 131–142.

Drgonová, J., Drgon, T., Roh, D.-H., Cabib, E. (1999). The GTP-binding protein Rho1p is required for cell cycle progression and polarization of the yeast cell. *J. Cell Biol.* **146**, 373–387.

Drgonova, J., Tomás, D., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G.-C., Ford, R. A., Chan, C. S. M., Takai, Y., Cabib, E. (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* **272**, 277–279.

Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35–44.

Duran, A., Cabib, E. (1978). Solubilization and partial purification of yeast chitin synthetase. Confirmation of the zymogenic nature of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **253**, 4419–4425.

Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrsa, 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.

Eisenhaber, B., Bork, P., Eisenhaber, F. (1998). Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng.* **11**, 1155–1161.

Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M., Eisenhaber, F. (2004). A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for Aspergillus nidulans, Candida albicans Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. *J. Mol. Biol.* **337**, 243–253.

Eisenhaber, F., Eisenhaber, B., Kubina, W., Maurer-Stroh, S., Neuberger, G., Schneider, G., Wildpaner, M. (2003). Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: big-Π, NMT and PTS1. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3631–3634.

Eng, W.-K., Faucette, L., McLaughlin, M. M., Cafferkey, R., Koltin, Y., Morris, R. A., Young, P. R., Johnson, R. K., Livi, G. P. (1994). The yeast FKS1 gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin-dependent growth. *Gene* **151**, 61–71.

Fabre, A., Orlean, P., Taron, C. H. (2005). Saccharomyces cerevisiae Ybr004c and its human homologue are required for addition of the second mannose during glycosylphosphatidylinositol precursor assembly. *FEBS J.* **272**, 1160–1168.

Fernandez, F., Jannatipour, M., Hellman, U., Rokeach, L. A., Parodi, A. J. (1996). A new stress protein: synthesis of Schizosaccharomyces pombe UDP–Glc: glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability. *EMBO J.* **15**, 705–713.

Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E., Stajich, J. E., Butler, G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.* **6**, 99.

Fonseca-García, C., López, M. G., Aréchiga-Carvajal, E. T., Ruiz-Herrera, J. (2011). A novel polysaccharide secreted by pal/rim mutants of the phytopathogen fungus Ustilago maydis. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1646–1650..

Frank, C. G., Aebi, M. (2005). ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *Glycobiology* **15**, 1156–1163.

Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv.Genet.* **81**, 33-82.

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. *Mo.l Microbiol.* **69**, 982–993.

Gander, J. E. (1974). Fungal cell wall glycoproteins and peptido-polysaccharides. *Annu. Rev.. Microbiol.* **28**, 103–119.

Gao, X.-D., Tachikawa, H., Sato, T., Jigami, Y., Dean, N. (2005). Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 36254–36262.

Gemmill, T. R., Trimble, R. B. (1999) Overview of N-and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Sub.j* **1426**, 227–237.

Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355–360.

Girrbach, V., Strahl, S. (2003). Members of the evolutionarily conserved PMT family of proteinO-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem* **278**, 12554–12562.

Goldman, R. C., Sullivan, P. A., Zakula, D., Capobianco, J. O. (1995). Kinetics of β-1,3 Glucan Interaction at the Donor and Acceptor Sites of the Fungal Glucosyltransferase Encoded by the BGL2 Gene. *Eur. J. Biochem.* **227**, 372–378.

Gorbushina, A. A., Kotlova, E. R., Sherstneva, O. A. (2008). Cellular responses of microcolonial rock fungi to long-term desiccation and subsequent rehydration. *Stud. Mycol.* **61**, 91–97.

Gordon, J. L., Armisén, D., Proux-Wéra, E., ÓhÉigeartaigh, S. S., Byrne, K. P., Wolfe, K. H. (2011). Evolutionary erosion of yeast sex chromosomes by mating-type switching accidents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 20024–20029.

Goto, M. (2007). Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1415–1427.

Grbavac, A., Čanak, I., Stuparević, I., Teparić, R., Mrša, V. (2017). Proteolytic processing of the Saccharomyces cerevisiae cell wall protein Scw4 regulates its activity and influences its covalent binding to glucan. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* **1864**, 507–515.

Grimme, S. J., Gao, X.-D., Martin, P. S., Tu, K., Tcheperegine, S. E., Corrado, K., Farewell, A. E., Orlean, P., Bi, E. (2004). Deficiencies in the endoplasmic reticulum (ER)-membrane protein Gab1p perturb transfer of glycosylphosphatidylinositol to proteins and cause perinuclear ER-associated actin bar formation. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2758–2770.

Grimme, S. J., Westfall, B. A., Wiedman, J. M., Taron, C. H., Orlean, P. (2001). The essential Smp3 protein is required for addition of the side-branching fourth mannose during assembly of yeast glycosylphosphatidylinositols. *J. Biol. Chem.* **276**, 27731–27739.

de Groot, P. W. J., Hellingwerf, K. J., Klis, F. M. (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**, 781–796.

De Groot, P. W. J., Ram, A. F., Klis, F. M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 657–675.

de Groot, P. W. J., Ruiz, C., Vázquez de Aldana, C. R., Dueňas, E., Cid, V. J., Del Rey, F., Rodríquez-Peña, J. M., Pérez, P., Andel, A., Caubín, J. (2001). A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in Saccharomyces cerevisiae. *Comp. Funct. Genomics* **2**, 124–142.

de Groot, P. W. J., Yin, Q. Y., Weig, M., Sosinska, G. J., Klis, F. M., de Koster, C. G. (2007). Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Yeast* **24**, 267-278.

Grün, C. H., Hochstenbach, F., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Sietsma, J. H., Klis, F. M., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F. G. (2005). The structure of cell wall α-glucan from fission yeast. *Glycobiology* **15**, 245–257.

Ha, Y., Covert, S. F., Momany, M. (2006). FsFKS1, the 1, 3-β-glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus Fusarium solani. *Eukaryot. Cell* **5**, 1036–1042.

Hagen, I., Ecker, M., Lagorce, A., Francois, J. M., Sestak, S., Rachel, R., Grossmann, G., Hauser, N. C., Hoheisel, J. D., Tanner, W. (2004). Sed1p and Srl1p are required to compensate for cell wall instability in Saccharomyces cerevisiae mutants defective in multiple GPI-anchored mannoproteins. *Mol. Microbiol* **52**, 1413–1425.

Hamburger, D., Egerton, M., Riezman, H. (1995). Yeast Gaa1p is required for attachment of a completed GPI anchor onto proteins. *J. Cell Bio.l* **129**, 629–639.

Hansen, A. L., Kay, L. E. (2014). Measurement of histidine pKas values and tautomer populations in invisible protein states. *Proc. Natl. Acad. Sci* .**111**, E1705 -E1712.

Hashimoto, H., Yoda, K. (1997). Novel membrane protein complexes for protein glycosylation in the yeast Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 682–686.

He, F., Yaver, D., Beckerich, J.-M., Ogrydziak, D., Gaillardin, C. (1990). The yeast Yarrowia lipolytica has two, functional, signal recognition particle 7S RNA genes. *Curr. Genet.* **17**, 289–292.

von Heijne, G. (1986a). Net NC charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J. Mol. Biol.* **192**, 287–290.

von Heijne, G. (1986b). The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J.* **5**, 3021–3027.

Helenius, A., Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1019–1049.

Hellborg, L., Piškur, J. (2009). Complex nature of the genome in a wine spoilage yeast, Dekkera bruxellensis. *Eukaryot. Cell* **8**, 1739–1749.

Herrero, A. B., Magnelli, P., Mansour, M. K., Levitz, S. M., Bussey, H., Abeijon, C. (2004). KRE5 gene null mutant strains of Candida albicans are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties. *Eukaryot. Cell* **3**, 1423–1432.

Herscovics, A. (1999). Processing glycosidases of Saccharomyces cerevisiae. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* **1426**, 275–285.

Hossain, A. S., Teparić, R., Mrša, V. (2019). Comparison of two models of surface display of xylose reductase in the Saccharomyces cerevisiae cell wall. *Enzyme Microb. Technol.* **123**, 8–14.

Hurst, H. M., Wagner, G. H. (1969). Decomposition of 14C-labeled cell wall and cytoplasmic fractions from hyaline and melanic fungi. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **33**, 707–711.

Inaba, C., Maekawa, K., Morisaka, H., Kuroda, K., Ueda, M. (2009). Efficient synthesis of enantiomeric ethyl lactate by Candida antarctica lipase B (CALB)-displaying yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 859–864.

Inoue, S. B., Takewakt, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., Watanabe, T. (1995). Characterization and gene cloning of 1, 3-β-d-glucan synthase from Saccharomyces cerevisiae. *Eur. J. Biochem.* **231**, 845–854.

Ishihara, S., Hirata, A., Nogami, S., Beauvais, A., Latge, J.-P., Ohya, Y. (2007). Homologous subunits of 1, 3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in Saccharomyces cerevisiae. *Eukaryot. Cell* **6**, 143–156.

Jacobs, P. P., Ryckaert, S., Geysens, S., De Vusser, K., Callewaert, N., Contreras, R. (2008). Pichia surface display: display of proteins on the surface of glycoengineered Pichia pastoris strains. *Biotechnol. Lett.* **30**, 2173–2181.

Jeffroy, O., Brinkmann, H., Delsuc, F., Philippe, H. (2006). Phylogenomics: the beginning of incongruence? *TRENDS Genet.* **22**, 225–231.

Jiang, Z., Gao, B., Ren, R., Tao, X., Ma, Y., Wei, D. (2008). Efficient display of active lipase LipB52 with a Pichia pastoris cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on Saccharomyces cerevisiae cell surface. *Bmc Biotechnol.* **8**, 1–7

Jigami, Y., Odani, T. (1999). Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* **1426**, 335–345.

Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G., Thorner, J. (1983). Yeast α factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell* **32**, 839–852

Jungmann, J., Munro, S. (1998). Multi-protein complexes in the cis Golgi of Saccharomyces cerevisiae with α-1, 6-mannosyltransferase activity. *EMBO J.* **17**, 423–434

Jungmann, J., Rayner, J. C., Munro, S. (1999). The Saccharomyces cerevisiae protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 6579–6585.

Kajiwara, K., Watanabe, R., Pichler, H., Ihara, K., Murakami, S., Riezman, H., Funato, K. (2008). Yeast ARV1 is required for efficient delivery of an early GPI intermediate to the first mannosyltransferase during GPI assembly and controls lipid flow from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2069–2082.

Kalebina, T. S., Farkaš, V., Laurinavichiute, D. K., Gorlovoy, P. M., Fominov, G. V, Bartek, P., Kulaev, I. S. (2003). Deletion of BGL2 results in an increased chitin level in the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**, 179–184.

Kämpf, M., Absmanner, B., Schwarz, M., Lehle, L. (2009). Biochemical characterization and membrane topology of Alg2 from Saccharomyces cerevisiae as a bifunctional α1, 3-and 1, 6-mannosyltransferase involved in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 11900–11912.

Kang, M. S., Cabib, E. (1986). Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1-3)-beta-D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 5808–5812.

Kang, M. S., Elango, N., Mattia, E., Au-Young, J., Robbins, P. W., Cabib, E. (1984). Isolation of chitin synthetase from Saccharomyces cerevisiae. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. *J. Biol. Chem.* **259**, 14966–14972.

Kapteyn, J. C., Montijin, R. C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N., Klis, F. M. (1996). Retention of Saccharomyces cerevisiae cell wall proteins through a phosphodiester-linked β-1, 3-/β-l, 6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**, 337–345.

Karaoglu, D., Kelleher, D. J., Gilmore, R. (1997). The highly conserved Stt3 protein is a subunit of the yeast oligosaccharyltransferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. *J. Biol. Chem.* **272**, 32513–32520.

Kaya, M., Ito, J., Kotaka, A., Matsumura, K., Bando, H., Sahara, H., Ogino, C., Shibasaki, S., Kuroda, K., Ueda, M. (2008). Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of β-glucosidase from Aspergillus oryzae on yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 51–60.

Khasa, Y. P., Conrad, S., Sengul, M., Plautz, S., Meagher, M. M., Inan, M. (2011). Isolation of Pichia pastoris PIR genes and their utilization for cell surface display and recombinant protein secretion. *Yeast* **28**, 213–226.

Khatri, I., Tomar, R., Ganesan, K., Prasad, G. S., Subramanian, S. (2017). Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast Saccharomyces boulardii. *Sci. Rep.* **7**, 1–12.

Klebl, F., Tanner, W. (1989). Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* **171**, 6259 – 6264.

Klis, F. M. (1994). Cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**, 851–869.

Klis, F. M., Groot, P. De, Hellingwerf, K. (2001). Molecular organization of the cell wall of Candida albicans. *Med. Mycol.* **39**, 1–8

Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239–256.

Klutts, J. S., Yoneda, A., Reilly, M. C., Bose, I., Doering, T. L. (2006). Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes. *FEMS Yeast Res.* **6**, 499–512.

Kluyver, A., van Niel, C. (1927). Sporobolomyces: ein Basidiomyzet? *Ann. Mycol*, 389–394

Kluyver, A., van Niel, C. (1924). Uber Spiegelbilder erzeugenden Hefenarten und die neue Hefengattung Sporobolomyces. *Zentrlbl Bakteriol Parasitenk II*, 1–20.

Knauer, R., Lehle, L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* **1426**, 259–273.

Kollár, R., Reinhold, B. B., Petráková, E., Yeh, H. J. C., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., Cabib, E. (1997). Architecture of the Yeast Cell Wall. *J. Biol. Chem.* **272**, 17762–17775.

Kopecká, M., Kreger, D. R. (1986). Assembly of microfibrils in vivo and in vitro from (1» 3)-β-D-glucan synthesized by protoplasts of Saccharomyces cerevisiae. *Arch. Microbiol.* **143**, 387–395.

Kovács, M., Stuparevič, I., Mrša, V., Maráz, A. (2008). Characterization of Ccw7p cell wall proteins and the encoding genes of Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains: relevance for flor formation. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1115–1126.

Kowalski, L. R. Z., Kondo, K., Inouye, M. (1995). Cold-shock induction of a family of TIP1-related proteins associated with the membrane in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Microbiol.* **15**, 341–353.

Kozubowski, L., Panek, H., Rosenthal, A., Bloecher, A., DeMarini, D. J., Tatchell, K. (2003). A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence. *Mol. Biol. Cell* **14**, 26–39.

Kreger, D., Kopecká, M. (1976). On the nature and formation of the fibrillar nets produced by protoplasts of Saccharomyces cerevisiae in liquid media: an electronmicroscopic, X-ray diffraction and chemical study. *Microbiology* **92**, 207–220.

Kreil, G., Mollay, C., Kaschnitz, R., Haiml, L., Vilas, U. (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.

Kunze, G., Gaillardin, C., Czernicka, M., Durrens, P., Martin, T., Böer, E., Gabaldón, T., Cruz, J. A., Talla, E., Marck, C. (2014). The complete genome of Blastobotrys (Arxula) adeninivorans LS3-a yeast of biotechnological interest. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 1–15.

Kuo, M.-J., Alexander, M. (1967). Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J. Bacteriol.* **94**, 624–629.

Kuranda, M. J., Robbins, P. W. (1987). Cloning and heterologous expression of glycosidase genes from Saccharomyces cerevisiae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2585–2589.

Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, London.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. U: *The yeasts* ( Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T., ured.) Elsevier, London, str. 87–110.

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 331–371.

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res*. **3**, 417–432.

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., Basehoar-Powers, E. (2008). Phylogenetic relationships among species of Pichia, Issatchenkia and Williopsis determined from multigene sequence analysis, and the proposal of Barnettozyma gen. nov., Lindnera gen. nov. and Wickerhamomyces gen. nov. *FEMS Yeast Res*. **8**, 939–954.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.

Lam, K. K. Y., Davey, M., Sun, B., Roth, A. F., Davis, N. G., Conibear, E. (2006). Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J. Cell Biol*. **174**, 19–25.

Langenberg, A.-K., Bink, F. J., Wolff, L., Walter, S., von Wallbrunn, C., Grossmann, M., Heinisch, J. J., Schmitz, H.-P. (2017). Glycolytic functions are conserved in the genome of the wine yeast Hanseniaspora uvarum, and pyruvate kinase limits its capacity for alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*. **83**.

Larkin, A., Imperiali, B. (2011). The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation. *Biochemistry* **50**, 4411–4426.

Larriba, G., Basco, R. D., Andaluz, E., Luna-Arias, J. P. (1993). Yeast exoglucanases. Where redundancy implies necessity. *Arch. Med. Res.* **24**, 293–299.

Larriba, G., Morales, M., Ruiz-Herrera, J. (1981). Biosynthesis of β-glucan microfibrils by cell-free extracts from Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology* **124**, 375–383.

Lehle, L., Strahl, S., Tanner, W. (2006). Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chemie Int. Ed.* **45**, 6802–6818.

Lertwattanasakul, N., Kosaka, T., Hosoyama, A., Suzuki, Y., Rodrussamee, N., Matsutani, M., Murata, M., Fujimoto, N., Tsuchikane, K., Limtong, S. (2015). Genetic basis of the highly efficient yeast Kluyveromyces marxianus: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol. Biofuels* **8**, 47.

Lesage, G., Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 317–343

Lesage, G., Sdicu, A.-M., Ménard, P., Shapiro, J., Hussein, S., Bussey, H. (2004). Analysis of β-1, 3-glucan assembly in Saccharomyces cerevisiae using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics* **167**, 35–49

Li, W., Shi, H., Ding, H., Wang, L., Zhang, Y., Li, X., Wang, F. (2015). Cell surface display and characterization of Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris using Sed1p as an anchor protein. *Curr. Microbiol.* **71**, 150–155

Liachko, I., Youngblood, R. A., Keich, U., Dunham, M. J. (2013). High-resolution mapping, characterization, and optimization of autonomously replicating sequences in yeast. *Genome Res.* **23**, 698–704.

Lipke, P. N., Kurjan, J. (1992). Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **56**, 180–194.

Liu, J., Tang, X., Wang, H., Balasubramanian, M. (2000). Bgs2p, a 1, 3-β-glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in Schizosaccharomyces pombe. *FEBS Lett.* **478**, 105–108.

Liu, J., Wang, H., McCollum, D., Balasubramanian, M. K. (1999). Drc1p/Cps1p, a 1, 3-β-glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in Schizosaccharomyces pombe. *Genetics* **153**, 1193–1203.

Lozančić, M., Žunar, B., Hrestak, D., Lopandić, K., Teparić, R., Mrša, V. (2021, 9. veljače). Systematic Comparison of Cell Wall-Related Proteins of Different Yeasts. *J Fungi* **7**. https://doi.org/10.3390/jof7020128.

Lussier, M., Sdicu, A.-M., Bussereau, F., Jacquet, M., Bussey, H. (1997). The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p Mannosyltransferases Participate in the Elaboration of Yeast O-andN-linked Carbohydrate Chains. *J. Biol. Chem.* **272**, 15527–15531.

Lussier, M., Sdicu, A.-M., Bussey, H. (1999). The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of Saccharomyces cerevisiae. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Sub.j* **1426**, 323–334.

Lussier, M., Sdicu, A.-M., Camirand, A., Bussey, H. (1996). Functional characterization of the YUR1, KTR1, and KTR2 genes as members of the yeast KRE2/MNT1 mannosyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* **271**, 11001–11008.

Lussier, M., Sdicu, A.-M., Shahinian, S., Bussey, H. (1998). The Candida albicans KRE9 gene is required for cell wall β-1, 6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 9825–9830.

Luther, J. P., Lipke, H. (1980). Degradation of melanin by Aspergillus fumigatus. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 145–155.

Madden, K., Snyder, M. (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 687–744

Maeda, Y., Watanabe, R., Harris, C. L., Hong, Y., Ohishi, K., Kinoshita, K., Kinoshita, T. (2001). PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the lumenal side of the ER. *EMBO J.* **20**, 250–261

Magnan, C., Yu, J., Chang, I., Jahn, E., Kanomata, Y., Wu, J., Zeller, M., Oakes, M., Baldi, P., Sandmeyer, S. (2016). Sequence assembly of Yarrowia lipolytica strain W29/CLIB89 shows transposable element diversity. *PLoS One* **11**, e0162363.

Manners, D. J., Masson, A. J., Patterson, J. C. (1973). The structure of a β-(1→ 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* **135**, 19–30

Marguet, D., Guo, X. J., Lauquin, G. J.-M. (1988). Yeast gene SRP1 (serine-rich protein): Intragenic repeat structure and identification of a family of SRP1-related DNA sequences. *J. Mol. Biol.* **202**, 455–470.

Martín-García, R., Durán, A., Valdivieso, M.-H. (2003). In Schizosaccharomyces pombe chs2p has no chitin synthase activity but is related to septum formation. *FEBS Lett.* **549**, 176–180.

Matsumoto, T., Fukuda, H., Ueda, M., Tanaka, A., Kondo, A. (2002). Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4517–4522.

Matsuo, Y., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H., Kawamukai, M. (2004). Genetic analysis of chs1+ and chs2+ encoding chitin synthases from Schizosaccharomyces pombe. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1489–1499.

Mazur, P., Baginsky, W. (1996). In vitro activity of 1, 3-β-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.* **271**, 14604–14609.

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1, 3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5671–5681.

Meaden, P., Hill, K., Wagner, J., Slipetz, D., Sommer, S. S., Bussey, H. (1990). The yeast KRE5 gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1----6)-beta-D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol. Cell Biol.* **10**, 3013–3019.

Meitinger, F., Petrova, B., Lombardi, I. M., Bertazzi, D. T., Hub, B., Zentgraf, H., Pereira, G. (2010) Targeted localization of Inn1, Cyk3 and Chs2 by the mitotic-exit network regulates cytokinesis in budding yeast. *J. Cell Sci.* **123**, 1851–1861.

Mellado, E., Dubreucq, G., Mol, P., Sarfati, J., Paris, S., Diaquin, M., Holden, D. W., Rodriguez-Tudela, J. L., Latge, J. P. (2003) Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG−/chsE−) of Aspergillus fumigatus. *Fungal. Genet. Biol.* **38**, 98–109.

Miller, M. W., Phaff, H. J. (1958) A comparative study of the apiculate yeasts. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **10**, 113–141.

Mio, T., Yamada-Okabe, T., Yabe, T., Nakajima, T., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H. (1997) Isolation of the Candida albicans homologs of Saccharomyces cerevisiae KRE6 and SKN1: expression and physiological function. *J. Bacteriol.* **179**, 2363–2372.

Mol, P. C., Park, H.-M., Mullins, J. T., Cabib, E. (1994) A GTP-binding protein regulates the activity of (1--> 3)-beta-glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J. Bio.l Chem.* **269**, 31267–31274.

Montegna, E. A., Bhave, M., Liu, Y., Bhattacharyya, D., Glick, B. S. (2012, 8. veljače). Sec12 Binds to Sec16 at Transitional ER Sites. *PLoS One* **7**, e31156. doi: 10.1371/journal.pone.0031156.

Montoro, A. G., Ramirez, S. C., Quiroga, R., Taubas, J. V. (2011, 24. veljače). Specificity of transmembrane protein palmitoylation in yeast. *PLoS One* ***6***, e16969. doi: 10.1371/journal.pone.0016969.

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

Moukadiri, I., Armero, J., Abad, A., Sentandreu, R., Zueco, J. (1997) Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol*. **179**, 2154 – 2162.

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

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

Mrsa, V., Klebl, F., Tanner, W. (1993) Purification and characterization of the Saccharomyces cerevisiae BGL2 gene product, a cell wall endo-beta-1,3-glucanase. *J. Bacteriol*. **175**, 2102– 2106.

Mrša, V., Seidl, T., Gentzsch, M., Tanner, W. (1997) Specific Labelling of Cell Wall Proteins by Biotinylation. Identification of Four Covalently Linked O-mannosylated Proteins of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **13**, 1145–1154.

Munro, C. A., Whitton, R. K., Hughes, H. B., Rella, M., Selvaggini, S., Gow, N. A. R. (2003) CHS8—a fourth chitin synthase gene of Candida albicans contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth. *Fungal Genet. Biol.* **40**, 146–158.

Munro, C. A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J. M., Brown, A. J. P., Bulawa, C. E., Gow, N. A. R. (2001) Chs1 of Candida albicans is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol. Microbiol*. **39**, 1414–1426.

Murai, T., Ueda, M., Yamamura, M., Atomi, H., Shibasaki, Y., Kamasawa, N., Osumi, M., Amachi, T., Tanaka, A. (1997) Construction of a starch-utilizing yeast by cell surface engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1362–1366.

Nagahashi, S., Lussier, M., Bussey, H. (1998). Isolation of Candida glabrata homologs of the Saccharomyces cerevisiae KRE9 and KNH1Genes and their involvement in cell wall β-1, 6-glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **180**, 5020–5029.

Nakamura, Y., Matsumoto, T., Nomoto, F., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A. (2006) Enhancement of Activity of Lipase-Displaying Yeast Cells and Their Application to Optical Resolution of (R, S)-1-Benzyloxy-3-Chloro-2-Propyl Monosuccinate. *Biotechnol. Prog.* **22**, 998–1002.

Nakayama, K., Nakanishi-Shindo, Y., Tanaka, A., Haga-Toda, Y., Jigami, Y. (1997) Substrate specificity of α-1, 6-mannosyltransferase that initiates N-linked mannose outer chain elongation in Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* **412**, 547–550.

Narasimhan, M. L., Lee, H., Damsz, B., Singh, N. K., Ibeas, J. I., Matsumoto, T. K., Woloshuk, C. P., Bressan, R. A. (2003) Overexpression of a cell wall glycoprotein in Fusarium oxysporum increases virulence and resistance to a plant PR-5 protein. *Plant J.* **36**, 390–400.

Ng, D. T., Brown, J. D., Walter, P. (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* **134**, 269–278.

Nishihama, R., Schreiter, J. H., Onishi, M., Vallen, E. A., Hanna, J., Moravcevic, K., Lippincott, M. F., Han, H., Lemmon, M. A., Pringle, J. R. (2009) Role of Inn1 and its interactions with Hof1 and Cyk3 in promoting cleavage furrow and septum formation in S. cerevisiae. *J. Cell Biol.* **185**, 995–1012

de Nobel, H., van den Ende, H., Klis, F. M. (2000) Cell wall maintenance in fungi. *Trends Microbiol.* ***8***, 344–345

Nyland, G. (1949) Studies on some unusual Heterobasidiomycetes from Washington State. *Mycologia* **41**, 686–701.

O'Conallain, C., Doolin, M. T., Taggart, C., Thornton, F., Butler, G. (1999) Regulated nuclear localisation of the yeast transcription factor Ace2p controls expression of chitinase (CTS1) in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.* **262**, 275–282.

O'Reilly, M. K., Zhang, G., Imperiali, B. (2006) In vitro evidence for the dual function of Alg2 and Alg11: essential mannosyltransferases in N-linked glycoprotein biosynthesis. *Biochemistry* **45**, 9593–9603.

Oh, Y., Chang, K.-J., Orlean, P., Wloka, C., Deshaies, R., Bi, E. (2012) Mitotic exit kinase Dbf2 directly phosphorylates chitin synthase Chs2 to regulate cytokinesis in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2445–2456.

Ohishi, K., Inoue, N., Kinoshita, T. (2001) PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. *EMBO J.* **20**, 4088–4098.

Ohishi, K., Inoue, N., Maeda, Y., Takeda, J., Riezman, H., Kinoshita, T. (2000) Gaa1p and gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1523–1533.

Orlean, P. (2012) Architecture and biosynthesis of the Saccharomyces cerevisiae cell wall. *Genetics* **192**, 775–818.

Orlean, P. (1987) Two chitin synthases in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* ***262***, 5732–5739.

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

Osborne, A. R., Rapoport, T. A., van den Berg, B. (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **21**, 529–550.

Oshima, Y., Takano, I. (1971) Mating types in Saccharomyces: their convertibility and homothallism. *Genetics* **67**, 327.

Ota, M., Sakuragi, H., Morisaka, H., Kuroda, K., Miyake, H., Tamaru, Y., Ueda, M. (2013) Display of Clostridium cellulovorans xylose isomerase on the cell surface of Saccharomyces cerevisiae and its direct application to xylose fermentation. *Biotechnol. Prog.* **29**, 346–351.

Pammer, M., Briza, P., Ellinger, A., Schuster, T., Stucka, R., Feldmann, H., Breitenbach, M. (1992) DIT101 (CSD2, CAL1), a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. *Yeast* **8**, 1089–1099.

Pan, H., Wang, N., Tachikawa, H., Nakanishi, H., Gao, X. (2017) β-1, 6-glucan synthesis-associated genes are required for proper spore wall formation in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **34**, 431–446.

Pardo, M., Monteoliva, L., Vázquez, P., Martínez, R., Molero, G., Nombela, C., Gil, C. (2004) PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiology* **150**, 4157—4170.

Parent, S. A., Nielsen, J. B., Morin, N., Chrebet, G., Ramadan, N., Dahl, A. M., Hsu, M.-J., Bostian, K. A., Foor, F. (1993) Calcineurin-dependent growth of an FK506-and CsA-hypersensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology* ***139***, 2973–2984.

Park, M. (2020, 13. svibanj). Surface Display Technology for Biosensor Applications: A Review. *Sensors* **20,** 2775. https://doi.org/10.3390/s20102775.

Pereyra, M. T., Prieto, A., Bernabé, M., Leal, J. A. (2003) Studies of new polysaccharides from Lasallia pustulata (L.) Hoffm. *Lichenol* **35**, 177–185.

Phillips, M. J., Delsuc, F., Penny, D. (2004) Genome-scale phylogeny and the detection of systematic biases. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1455–1458.

Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., Vai, M. (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* **179**, 463–469.

Potgieter, H. J., Alexander, M. (1966) Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis. *J. Bacteriol.* **91**, 1526–1532.

Pulschen, A. A., Rodrigues, F., Duarte, R. T. D., Araujo, G. G., Santiago, I. F., Paulino-Lima, I. G., Rosa, C. A., Kato, M. J., Pellizari, V. H., Galante, D. (2015) UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. *Microbiologyopen* **4**, 574–588.

Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E., Ohya, Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1, 3-β-glucan synthase. *Science* **272**, 279–281.

Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latge, J. P., Popolo, L. (2007) The Gas family of proteins of Saccharomyces cerevisiae: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* **24**, 297–308.

Ram, A. F. J., Brekelmans, S. S. C., Oehlen, L., Klis, F. M. (1995) Identification of two cell cycle regulated genes affecting the β1, 3-glucan content of cell walls in Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett*. **358**, 165–170.

Ram, A. F. J., Wolters, A., Hoopen, R. Ten, Klis, F. M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in Saccharomyces cerevisiae by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**, 1019–1030.

Rayner, J. C., Munro, S. (1998). Identification of the MNN2 and MNN5Mannosyltransferases Required for Forming and Extending the Mannose Branches of the Outer Chain Mannans of Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **273**, 26836–26843.

Reiss, G., te Heesen, S., Gilmore, R., Zufferey, R., Aebi, M. (1997) A specific screen for oligosaccharyltransferase mutations identifies the 9 kDa OST5 protein required for optimal activity in vivo and in vitro. *EMBO J.* **16**, 1164–1172.

Reiss, G., Heesen, S. te, Zimmerman, J., Robbins, P., Aebi, M. (1996) Isolation of the ALG6 locus of Saccharomyces cerevisiae required for glucosylation in the N-linked glycosylation pathway. *Glycobiology* **6**, 493–498.

Rhind, N., Chen, Z., Yassour, M., Thompson, D. A., Haas, B. J., Habib, N., Wapinski, I., Roy, S., Lin, M. F., Heiman, D. I. (2011). Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science* **332**, 930–936.

Richard, M. L., Plaine, A. (2007) Comprehensive Analysis of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in <em>Candida albicans</em> *Eukaryot. Cell* **6**, 119 – 133.

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.

Riley, R., Haridas, S., Wolfe, K. H., Lopes, M. R., Hittinger, C. T., Göker, M., Salamov, A. A., Wisecaver, J. H., Long, T. M., Calvey, C. H. (2016). Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 9882–9887.

Riquelme, M. (2013) Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu. Rev. Microbiol*. **67**, 587–609.

Robbertse, B., Reeves, J. B., Schoch, C. L., Spatafora, J. W. (2006) A phylogenomic analysis of the Ascomycota. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 715–725.

Rodrigues, G., Pais, C. (2000) The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast Yarrowia lipolytica. *Food Technol. Biotechnol.* **38**, 27–32.

Roemer, T., Bussey, H. (1991) Yeast beta-glucan synthesis: KRE6 encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis in vivo and for glucan synthase activity in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* ***88***, 11295–11299.

Roemer, T., Bussey, H. (1995) Yeast Kre1p is a cell surface O-glycoprotein. *Mol Gen Genet MGG* **249**, 209–216.

Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M. A., Bussey, H. (1994) Characterization of the yeast (1-> 6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell Biol.* **127**, 567–579.

Roitsch, T., Lehle, L. (1989) Structural requirements for protein N-glycosylation: influence of acceptor peptides on cotranslational glycosylation of yeast invertase and site-directed mutagenesis around a sequon sequence. *Eur. J. Biochem.* **181**, 525–529.

Romero, P. A., Dijkgraaf, G. J. P., Shahinian, S., Herscovics, A., Bussey, H. (1997) The yeast CWH41 gene encodes glucosidase I. *Glycobiology* **7**, 997–1004.

Romero, P. A., Lussier, M., Veronneau, S., Sdicu, A.-M., Herscovics, A., Bussey, H. (1999) Mnt2p and Mnt3p of Saccharomyces cerevisiae are members of the Mnn1p family of α-1, 3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of *O*-linked oligosaccharides. *Glycobiology* **9**, 1045–1051.

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.

Ruiz-Herrera, J. (1991) *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. CRC press, Boca Raton.

Ruiz-Herrera, J., Ortiz-Castellanos, L. (2010) Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* **10**, 225–243.

Ruiz-Herrera, J., Ortiz-Castellanos, L. (2019, 21. ožujak). Cell wall glucans of fungi. A review. *Cell Surf.* **5**, 100022. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2019.100022.

Ruiz-Herrera, J., Victoria Elorza, M., Valentín, E., Sentandreu, R. (2006) Molecular organization of the cell wall of Candida albicans and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* **6**, 14–29.

Russo, P., Simonen, M., Uimari, A., Teesalu, T., Makarow, M. (1993) Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast HSP150 gene encoding a secretory glycoprotein. *Mol. Gen. Genet. MGG* **239**, 273–280.

Sacerdot, C., Casaregola, S., Lafontaine, I., Tekaia, F., Dujon, B., Ozier-Kalogeropoulos, O. (2008) Promiscuous DNA in the nuclear genomes of hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.* ***8***, 846–857.

Saitô, H., Tabeta, R., Yoshioka, Y., Hara, C., Kiho, T., Ukai, S. (1987) A high-resolution solid-state 13C NMR study of the secondary structure of branched (1→ 3)-β-D-glucans from fungi: Evidence of two kinds of conformers, curdlan-type single-helix and laminaran-type triple-helix forms, as manifested from the conformation-dep. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 4267–4272.

Salo, H., Sievi, E., Suntio, T., Mecklin, M., Mattila, P., Renkonen, R., Makarow, M. (2005) Co-expression of two mammalian glycosyltransferases in the yeast cell wall allows synthesis of sLex. *FEMS Yeast Res.* **5**, 341–350.

De Sampaïo, G., Bourdineaud, J., Lauquin, G. J. (1999) A constitutive role for GPI anchors in Saccharomyces cerevisiae: cell wall targeting. *Mol. Microbiol.* **34**, 247–256.

Sanchatjate, S., Schekman, R. (2006) Chs5/6 complex: a multiprotein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the trans-Golgi network to the cell surface. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4157–4166.

Sanchez-Diaz, A., Marchesi, V., Murray, S., Jones, R., Pereira, G., Edmondson, R., Allen, T., Labib, K. (2008) Inn1 couples contraction of the actomyosin ring to membrane ingression during cytokinesis in budding yeast. *Nat. Cell Biol.* **10**, 395–406.

Santos, B., Duran, A., Valdivieso, M. H. (1997) CHS5, a gene involved in chitin synthesis and mating in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2485–2496.

Santos, B., Snyder, M. (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol 136*, 95–110.

Sanz, M., Castrejon, F., Duran, A., Roncero, C. (2004) Saccharomyces cerevisiae Bni4p directs the formation of the chitin ring and also participates in the correct assembly of the septum structure. *Microbiology* **150**, 3229–3241.

Sarthy, A. V., McGonigal, T., Coen, M., Frost, D. J., Meulbroek, J. A., Goldman, R. C. (1997) Phenotype in Candida albicans of a disruption of the BGL2 gene encoding a -1,3- glucosyltransferase. *Microbiology* **143**, 367–376.

Sato, K., Noda, Y., Yoda, K. (2007) Pga1 is an essential component of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase II of Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3472–3485

Sato, N., Matsumoto, T., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H., Kondo, A. (2002) Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 469–474.

Sburlati, A., Cabib, E. (1986) Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **261**, 15147–15152.

Scannell, D. R., Wolfe, K. H. (2008) A burst of protein sequence evolution and a prolonged period of asymmetric evolution follow gene duplication in yeast. *Genome Res.* **18**, 137–147.

Schekman, R., Brawley, V. (1979) Localized deposition of chitin on the yeast cell surface in response to mating pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 645–649.

Schreuder, M. P., Brekelmans, S., Van Den Ende, H., Klis, F. M. (1993) Targeting of a heterologous protein to the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **9**, 399–409.

Sertil, O., Cohen, B. D., Davies, K. J. A., Lowry, C. V (1997) The DAN1 gene of S. cerevisiae is regulated in parallel with the hypoxic genes, but by a different mechanism. *Gene* **192**, 199–205.

Shahinian, S., Bussey, H. (2000) β-1, 6-Glucan synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Microbiol.* **35**, 477–489.

Shahinian, S., Dijkgraaf, G. J. P., Sdicu, A.-M., Thomas, D. Y., Jakob, C. A., Aebi, M., Bussey, H. (1998) Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall β-1, 6-glucan of Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **149**, 843–856.

Sharma, C. B., Lehle, L., Tanner, W. (1982) Solubilization and characterization of the initial enzymes of the dolichol pathway from yeast. *Eur. J. Biochem.* **126**, 319–325

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

Shen, X.-X., Opulente, D. A., Kominek, J., Zhou, X., Steenwyk, J. L., Buh, K. V, Haase, M. A. B., Wisecaver, J. H., Wang, M., Doering, D. T. (2018) Tempo and mode of genome evolution in the budding yeast subphylum. *Cell* **175**, 1533–1545.

Shimoi, H., Kitagaki, H., Ohmori, H., Iimura, Y., Ito, K. (1998) Sed1p is a major cell wall protein of Saccharomyces cerevisiae in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J. Bacteriol*. **180**, 3381–3387.

Siegel, V., Walter, P. (1988) Functional dissection of the signal recognition particle. *Trends Biochem. Sci*. **13**, 314–316.

Skory, C. D., Freer, S. N. (1995) Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular beta-glucosidase in the yeast Candida wickerhamii. *Appl. Environ. Microbiol*. **61**, 518 – 525.

Sobering, A. K., Watanabe, R., Romeo, M. J., Yan, B. C., Specht, C. A., Orlean, P., Riezman, H., Levin, D. E. (2004) Yeast Ras regulates the complex that catalyzes the first step in GPI-anchor biosynthesis at the ER. *Cell* **117**, 637–648.

Specht, C. A., Liu, Y., Robbins, P. W., Bulawa, C. E., Iartchouk, N., Winter, K. R., Riggle, P. J., Rhodes, J. C., Dodge, C. L., Culp, D. W. (1996) The chsD and chsE Genes of Aspergillus nidulans and Their Roles in Chitin Synthesis. *Fungal. Genet. Biol*. **20**, 153–167.

Stagg, S. M., Gürkan, C., Fowler, D. M., LaPointe, P., Foss, T. R., Potter, C. S., Carragher, B., Balch, W. E. (2006) Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* **439**, 234–238.

Stagljar, I., te Heesen, S., Aebi, M. (1994) New phenotype of mutations deficient in glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide: cloning of the ALG8 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 5977 – 5981.

Stark, M. J. R., Mileham, A. J., Romanos, M. A., Boyd, A. (1984) Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA plasmid associated with the killer character of the yeast Khuyveromyces lactis. *Nucleic Acids Res.* **12**, 6011–6030.

Sternes, P. R., Lee, D., Kutyna, D. R., Borneman, A. R. (2016, 17. studeni) Genome sequences of three species of Hanseniaspora isolated from spontaneous wine fermentations. *Genome Announc.* **4,** e01287-16. doi: 10.1128/genomeA.01287-16.

Stokke, B. T., Elgsaeter, A., Hara, C., Kitamura, S., Takeo, K. (1993) Physicochemical properties of (1→ 6)-branched (1→ 3)-β-d-glucans. 1. Physical dimensions estimated from hydrodynamic and electron microscopic data. *Biopolym. Orig. Res. Biomol.* **33**, 561–573.

Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M., Tanner, W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* **1426**, 297–307.

Strahl-Bolsinger, S., Scheinost, A. (1999). Transmembrane topology of pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **274**, 9068–9075.

Strauss, A. W., Zimmerman, M., Boime, I., Ashe, B., Mumford, R. A., Alberts, A. W. (1979) Characterization of an endopeptidase involved in pre-protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4225–4229.

Su, G.-D., Huang, D.-F., Han, S.-Y., Zheng, S.-P., Lin, Y. (2010) Display of Candida antarctica lipase B on Pichia pastoris and its application to flavor ester synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1493–1501.

Suomalainen, H., Nurminen, T. (1970) The lipid composition of cell wall and plasma membrane of baker's yeast. *Chem. Phys. Lipids* **4**, 247–256.

Synytsya, A., Novák, M. (2013) Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydr. Polym.* **92**, 792–809.

Tafer, H., Lopandic, K., Blasi, B., Poyntner, C., Sterflinger, K. (2015, 9. travanj) Draft genome sequence of Exophiala mesophila, a black yeast with high bioremediation potential. *Genome Announc.* **3**, e00203-15. doi: 10.1128/genomeA.00203-15.

Tanaka, S., Maeda, Y., Tashima, Y., Kinoshita, T. (2004) Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. *J. Biol. Chem.* **279**, 14256–14263.

Tanaka, T., Matsumoto, S., Yamada, M., Yamada, R., Matsuda, F., Kondo, A. (2013) Display of active beta-glucosidase on the surface of Schizosaccharomyces pombe cells using novel anchor proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 4343–4352.

Tanaka, T., Yamada, R., Ogino, C., Kondo, A. (2012) Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 577–591.

Tanino, T., Ohno, T., Aoki, T., Fukuda, H., Kondo, A. (2007) Development of yeast cells displaying Candida antarctica lipase B and their application to ester synthesis reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 1319–1325.

Teh, E. M., Chai, C. C., Yeong, F. M. (2009) Retention of Chs2p in the ER requires N-terminal CDK1-phosphorylation sites. *Cell cycle* **8**, 2965–2976.

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

Thompson, J. R., Douglas, C. M., Li, W., Jue, C. K., Pramanik, B., Yuan, X., Rude, T. H., Toffaletti, D. L., Perfect, J. R., Kurtz, M. (1999) A Glucan Synthase FKS1 Homolog inCryptococcus neoformans Is Single Copy and Encodes an Essential Function. *J. Bacteriol.* **181**, 444–453.

Tokuhiro, K., Ishida, N., Kondo, A., Takahashi, H. (2008) Lactic fermentation of cellobiose by a yeast strain displaying β-glucosidase on the cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 481-488.

Tommasino, M., Ricci, S., Galeotti, C. L. (1988). Genome organization of the killer plasmid pGK12 from Kluyveromyces lactis. *Nucleic Acids Res.***16**, 5863–5878.

Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E., Spang, A. (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J.* **25**, 943–954.

Trilla, J. A., Cos, T., Duran, A., Roncero, C. (1997) Characterization of CHS4 (CAL2), a gene of Saccharomyces cerevisiae involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and CSD4. *Yeast* **13**, 795–807.

Trilla, J. A., Durán, A., Roncero, C. (1999) Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *J. Cell Biol.* **145**, 1153–1163.

Trombetta, E. S., Simons, J. F., Helenius, A. (1996) Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J. Biol. Chem.* **271**, 27509–27516.

Tsukahara, K., Hata, K., Nakamoto, K., Sagane, K., Watanabe, N., Kuromitsu, J., Kai, J., Tsuchiya, M., Ohba, F., Jigami, Y. (2003) Medicinal genetics approach towards identifying the molecular target of a novel inhibitor of fungal cell wall assembly. *Mol. Microbiol.* **48**, 1029–1042.

Turland, N. J., Wiersema, J. H., Barrie, F. R., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, D.-Z., Marhold, K. (2018) *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017.* Koeltz Botanical Books, Glahuten.

Uchida, Y., Shimmi, O., Sudoh, M., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H. (1996) Characterization of chitin synthase 2 of Saccharomyces cerevisiae II: both full size and processed enzymes are active for chitin synthesis. *J. Biochem.* **119**, 659–666.

Udenfriend, S., Kodukula, K. (1995) How glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 563–591.

Umekawa, M., Ujihara, M., Nakai, D., Takematsu, H., Wakayama, M. (2017) Ecm33 is a novel factor involved in efficient glucose uptake for nutrition-responsive TORC1 signaling in yeast. *FEBS Lett.* **591**, 3721–3729.

van der Vaart, J. M., Caro, L. H., Chapman, J. W., Klis, F. M., Verrips, C. T. (1995). Identification of three mannoproteins in the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* **177**, 3104–3110.

Valdivieso, M.-H., Ferrario, L., Vai, M., Duran, A., Popolo, L. (2000) Chitin Synthesis in a gas1 Mutant ofSaccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol*. **182**, 4752–4757.

Vidugiriene, J., Menon, A. K. (1993) Early lipid intermediates in glycosyl-phosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J. Cell Biol*. **121**, 987–996.

Wang, C.-W., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R. (2006) Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J. Cell Biol*. **174**, 973–983.

Wang, M. C., Bartnicki-Garcia, S. (1970) Structure and composition of walls of the yeast form of Verticillium albo-atrum. *Microbiology* **64**, 41–54.

Wang, Q., Li, L., Chen, M., Qi, Q., Wang, P. G. (2007) Construction of a novel system for cell surface display of heterologous proteins on Pichia pastoris. *Biotechnol. Lett*. **29**, 1561–1566.

Wang, X.-H., Nakayama, K., Shimma, Y., Tanaka, A., Jigami, Y. (1997) MNN6, a member of the KRE2/MNT1 family, is the gene for mannosylphosphate transfer in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **272**, 18117–18124.

Wang, Y., Coleman-Derr, D., Chen, G., Gu, Y. Q. (2015) OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Res*. **43**, 78–84.

Washida, M., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A. (2001) Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **56**, 681–686.

Watari, J., Takata, Y., Ogawa, M., Sahara, H., Koshino, S., Onnela, M., Airaksinen, U., Jaatinen, R., Penttilä, M., Keränen, S. (1994) Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene FLO1. *Yeast* **10**, 211–225.

Weiß, M., Göker, M. (2011) Molecular phylogenetic reconstruction. U: *The Yeasts* (Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T., ured.), Elsevier, London, str. 159–174.

Wickerham, L. J. (1951) *Taxonomy of yeasts*. US Dept. of Agriculture, Washington DC, Technical Bulletin No.1029, 1-56.

Wilkinson, B. M., Purswani, J., Stirling, C. J. (2006) Yeast GTB1 encodes a subunit of glucosidase II required for glycoprotein processing in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **281**, 6325–6333.

Williams, D. L., McNamee, R. B., Jones, E. L., Pretus, H. A., Ensley, H. E., Browder, I. W., Di Luzio, N. R. (1991) A method for the solubilization of a (1→ 3)-β-D-glucan isolated from Saccharomyces cerevisiae. *Carbohydr. Res.* **219**, 203–213.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S. i sur. (2002) The genome sequence of Schizosaccharomyces pombe. *Nature* **415**, 871–880.

Xiao, H., Shao, Z., Jiang, Y., Dole, S., Zhao, H. (2014, 27. kolovoz) Exploiting Issatchenkia orientalis SD108 for succinic acid production. *Microb. Cell Fact.* **13**, 121, 11. doi: 10.1186/s12934-014-0121-4.

Yamada, Y., Banno, I. (1984) Fellomyces, a new anamorphic yeast genus for the Q10-equipped organisms whose conidium is freed by an end-break in the sterigma. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**, 523–525.

Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2010) Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 381–388.

Yaver, D. S., Matoba, S., Ogrydziak, D. M. (1992) A mutation in the signal recognition particle 7S RNA of the yeast Yarrowia lipolytica preferentially affects synthesis of the alkaline extracellular protease: in vivo evidence for translational arrest. *J. Cell Biol.* **116**, 605–616.

Yin, Q. Y., Groot, P. W. J. de, Dekker, H. L., Jong, L. de, Klis, F. M., Koster, C. G. de (2005) Comprehensive Proteomic Analysis of Saccharomyces cerevisiae Cell Walls. *J. Biol. Chem.* **280**, 20894–20901.

Zhang, G., Kashimshetty, R., Ng, K. E., Tan, H. B., Yeong, F. M. (2006) Exit from mitosis triggers Chs2p transport from the endoplasmic reticulum to mother–daughter neck via the secretory pathway in budding yeast. *J. Cell Biol.* **174**, 207–220.

Zhang, W., Han, S., Wei, D., Lin, Y., Wang, X. (2008) Functional display of Rhizomucor miehei lipase on surface of Saccharomyces cerevisiae with higher activity and its practical properties. *J. Chem. Technol. Biotechnol. Int. Res. Process. Environ. Clean Technol.* **83**, 329–335.

Zhao, C., Jung, U. S., Garrett-Engele, P., Roe, T., Cyert, M. S., Levin, D. E. (1998) Temperature-Induced Expression of Yeast FKS2 Is under the Dual Control of Protein Kinase C and Calcineurin. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1013–1022.

Ziman, M., Chuang, J. S., Schekman, R. W. (1996) Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the Saccharomyces cerevisiae endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **7**, 1909–1919.

Ziman, M., Chuang, J. S., Tsung, M., Hamamoto, S., Schekman, R. (1998) Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1565–1576.

Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M., Helms, V. (2011) Protein translocation across the ER membrane. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1808**, 912–924.

Zivanovic, Y., Wincker, P., Vacherie, B., Bolotin-Fukuhara, M., Fukuhara, H. (2005) Complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA from Kluyveromyces lactis. *FEMS Yeast Res.* **5**, 315–322.

## 8. ŽIVOTOPIS

Mateja Lozančić rođena je 25. listopada 1989. u Zagrebu. Godine 2008. upisuje preddiplomski studij Biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2008. godine. Studij završava 2011. uz obranu završnog rada izrađenog u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivana Krešimira Sveteca. Iste godine upisuje diplomski studij Molekularne biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, a 2012. upisuje združeni studij Bioindustrijskih tehnika Sveučilišta u Zagrebu te Sveučilišta u Orleansu, u Francuskoj. Obranom diplomskog rada izrađenog pod mentorstvom dr. sc. Bernharda Ryffela u Laboratoriju za molekularnu i eksperimentalnu imunologiju i neurogenetiku pri CNRS institutu u Orleansu stječe titulu magistre inženjerke molekularne biotehnologije.

Po završetku studija, zapošljava se kao stručni suradnik pri Službi bioloških i kontaktnih vještačenja Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“. U sklopu zaposlenja prolazi kroz obuku za biološkog vještaka te pristupa i polaže državni stručni ispit.

Godine 2016. zapošljava se kao asistent u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Molekularni mehanizmi ugradnje homolognih i heterolognih proteina u staničnoj stijenci kvasca i njihova primjena u biotehnologiji“ pod vodstvom prof. dr. sc. Vladimira Mrše. Akademske godine 2016./2017. upisuje Poslijediplomski studij biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam. Sudjeluje u izvođenju nastave na predmetima preddiplomskih i diplomskih studija i pomaže pri izradi završnih i diplomskih radova.

Za vrijeme poslijediplomskog studija objavljuje tri znanstvena rada kategorije a1 (2 Q1 te 1 Q2) i sudjeluje na 5 međunarodnih znanstvenih skupova. U sklopu usavršavanja boravi tjedan dana na Universität fr Bodenkultur Wien (BOKU), u Beču, u Austriji. Također sudjeluje na praktičnim radionicama iz proteomike u organizaciji PROTEOMASS Scientific Society u Lisabonu te organizaciji BICRO BioCentra u Zagrebu.

Znanstveni radovi a1 kategorije:

1. Lozančić, M., Žunar, B., Hrestak, D., Lopandić, K., Teparić, R., Mrša, V. (2021) Systematic Comparison of Cell Wall-Related Proteins of Different Yeasts, J. Fungi, 7, 128, 19. doi: 10.3390/jof7020128. IF=4.621 (Q1)

2. Teparić, R., Lozančić, M., Mrša, V. (2020) Evolutionary Overview of Molecular Interactions and Enzymatic Activities in the Yeast Cell Walls, Int. J. Mol. Sci. 21, 8996, 16. doi: 10.3390/ijms21238996. IF=4.556 (Q1)

3. Lozančić, M., Sk. Hossain, A., Mrša, V., Teparić, R. (2019) Surface Display – An Alternative to Classic Enzyme Immobilization, Catalysts, 9, 728, 20. doi: 10.3390/catal9090728. IF= 3.520 (Q2)

4. Crnjac, J., Ozretić, P., Merkaš, S., Ratko, M., Lozančić, M., Korolija, M., Popović, M., Mršić, G. (2017) Investigator Argus X-12 study on the population of northern Croatia. Genet. Mol. Biol., 40 1; 80-83 doi:10.1590/1678-4685-gmb-2015-0261. IF=1.876 (Q4)

5. Crnjac, J., Ozretić, P., Merkaš, S., Ratko, M., Lozančić, M., Rožić, S., Špoljarić, D., Korolija, M., Popović, M., Mršić, G. (2016) Analysis of 12 X-chromosomal markers in the population of central Croatia. Leg. Med., 21, 77-84. doi:10.1016/j.legalmed.2016.07.001. IF=1.195 (Q3)

6. Špoljarić, B., Popović, M., Crnjac, J., Žderić Savatović, Z., Ratko, M., Lozančić, M., Jurak, M., Špoljarić, I., Špljarić, D., Mršić, G. (2016) Gleaning a human DNA profile from trace swabs collected from animal hairs. Acta Vet. Beograd, 66 2; 187-202. doi:10.1515/acve-2016-0016. IF=0.693 (Q3)

Znanstveni članci u zbornicima skupova:

1. Jurak, M., Špoljarić, D., Mihelić, D., Mršić, G., Vlahović, K., Ratko, M., Lozančić, M., Pajurin, L., Kujundžić, M., Merkaš, S. i sur. DNK analiza tragova izuzetih s ljuske kokošjeg jajeta. Zbornik radova 6. Hrvatski Veterinarski Kongres Opatija, Zagreb, 2016. str. 519-527.

2. Žderić Savatović, Z., Herceg, T., Mršić, G., Lozančić, M., Ratko, M., Mihelić, D., Šegović, P., Shek Vugrovečki, A., Kardum P., Marijana M., Vlahović, K. i sur. Procjena hematoloških parametara tovnih pilića hranjenih uz dodatak kukuruznog tropa. Zbornik radova Veterinarski dani 2015. Zagreb: Hrvatska veterinarska komora. Veterinarski fakultet u Zagrebu, 2015. str. 169-174.

3. Jurak, M., Mršić, G., Crnjac, J., Popović, I., Žderić Savatović, Z., Lozančić, M., Rabić, D., Ratko, M., Popović, M., Vlahović, K., i sur. Određivanje humanog DNA profila na osnovi izuzetog traga s dlake psa. Zbornik radova Veterinarski dani 2015. Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet, 2015. str. 157-168.

Međunarodni kongresi i skupovi:

1. Grbavac, A., Lozančić, M., Teparić, R., Mrša, V. Comparison of proteolytic processing of Saccharomyces cerevisiae cell wall proteins Scw4 and Scw10, and their evolutionary conservation among different yeast species. FEMS 8th Congress of European Microbiologists, Abstract Book. Glasgow, Škotska, 2019. str. 970. (poster)

2. Lozančić, M., Grbavac, A., Teparić, R., Mrša, V. Scw4 and Scw10 as new potential platforms for yeast cell surface expression systems. Power of Microbes in Industry and Environment 2019, Book of Abstracts. Sveti Martin na Muri, Hrvatska, 2019. str. 44 (usmeno priopćenje)

3. Lozančić, M., Grbavac, A., Teparić, R., Mrša, V. Development of novel surface display expression systems in Pichia pastoris. Book of Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology "Crossroads in Life Sciences", HDBMB2019. Lovran, Hrvatska, 2019. str. 97 (poster)

4. Teparić, R., Sk. Hossain, A., Lozančić, M., Mrša, V. Characterization of surface displayed recombinant xylose reductase in Saccharomyces cerevisiae. The 34th FEBS Congress Biochemistry Forever. Prag: Czech Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2018. str. 84 (poster)

5. Teparić, R., Sk. Hossain, A., Lozančić, M., Mrša, V. Surface Display of Recombinant Proteins by C-terminal or N-terminal Immobilization in Saccharomyces cerevisiae. European

Summit of Industrial Biotechnology, Graz, Austria, 2017. Graz: Acib GmbH, 2017. str. 176 (poster)

6. Špoljarić, D., Ratko, M., Lozančić, M., Rožić, S., Sukser, V., Crnjac, J., Merkaš, S., Papić, S., Jurak, M., Mršić, G., Popović, M. Animal hair as a source of human DNA. 9th ISABS, Book of abstracts, Bol, Hrvatska, 2015. (poster)

Poglavlja u knjigama:

1. Mršić, G., Lozančić, M., Ratko, M., Popović, M. (2018) Forenzika bioloških tragova pri kaznenim djelima protiv spolne slobode s težištem na silovanju. U: *Forenzička ginekologija i perinatologija* (Habek, D., Marton, I., Prka, M., Tikvica Luetić, A., ured.). Medicinska naklada, Hrvatsko katoličko sveučilište, Zagreb, str. 819-883.

2. Mršić, G., Lozančić, M., Ratko, M., Popović, M. (2015) Forenzična DNA fenotipizacija – novi trend u forenzici. U: *Biokemijske metode u biomedicinskim istraživanjima* (Lovrić, J., Rogić, D., ured.) Medicinska naklada, Zagreb, str. 91-99.