

---

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Bojan Žunar**

**MEĐUOVISNOST INTRAKROMOSOMSKE  
REKOMBINACIJE I DUPLIKACIJE KROMOSOMA  
U KVASCA *Saccharomyces cerevisiae***

**Zagreb, 2011.**

---

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo pod vodstvom doc. dr. sc. Ivana-Krešimira Sveteca i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2010./2011.

---

---

**POPIS KRATICA**

- 5-FOA** – 5-fluoroorotična kiselina (*engl.* 5-fluoroorotic acid)
- ARG4** – gen za enzim argininosukcinat liazu, dio biosintetskog puta arginina
- ARSI** – kvaščevo ishodište replikacije
- bla** – gen za enzim  $\beta$ -laktamazu, odgovoran za rezistenciju na antibiotik ampicilin
- CEN4** – kvaščeva centromera
- CIAP** – goveđa intestinalna alkalna fosfataza (*engl.* calf intestinal alkaline phosphatase)
- DIG** – digoksigenin (*engl.* digoxigenin)
- DNA** – deoksiribonukleinska kiselina (*engl.* deoxyribonucleic acid)
- DSB** – dvolančani lom (*engl.* double-strand break)
- dUTP** – deoksiuridin-trifosfat (*engl.* deoxyuridine-triphosphate)
- EDTA** – etilendiamintetraoctena kiselina (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid)
- f** – učestalost (*engl.* frequency)
- HIS3** – gen za enzim imidazolglicerol-fosfat dehidratazu, dio biosintetskog puta za histidin
- kb** – kilobaza
- LEU2** – gen za enzim  $\beta$ -izopropilmalat dehidrogenazu, dio biosintetskog puta za leucin
- Mb** – megabaza
- mRNA** – glasnička ribonukleinska kiselina (*engl.* messenger deoxyribonucleic acid)
- NLS** – signal za aktivni transport proteina u jezgru (*engl.* nuclear localization signal)
- nt** – nukleotid (*engl.* nucleotide)
- ori** – bakterijsko ishodište replikacije
- pb** – par baza
- PCR** – lančana reakcija polimerazom (*engl.* polymerase chain reaction)
- PEG** – polietilenglikol (*engl.* polyethylen glycol)
- pGALI** – promotor enzima galaktokinaze, dio kataboličkog puta za galaktozu
- SDS** – natrij-dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate)
- SSA** – model komplementarnog sparivanja jednolančanih krajeva (*engl.* single strand annealing)
- SSC** – natrijev klorid-natrijev citrat pufer (*engl.* sodium chloride-sodium citrate buffer)
- ssDNA** – jednolančana DNA (*engl.* single-strand DNA)
- STE** – natrijev klorid-Tris-EDTA (*engl.* sodium chloride-Tris-EDTA)
- TBE** – Tris-borna kiselina-EDTA (*engl.* Tris-borate-EDTA buffer)
- Tris** – 3-hidroksimetil-aminometan (*engl.* tris(hydroxymethyl)aminomethane)
- URA3** – gen za enzim orotidin-5'-fosfat dekarboksilazu, dio biosintetskog puta za uracil
-

---

**SADRŽAJ**

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....  | 4  |
| 3. MATERIJAL I METODE .....  | 5  |
| 3.1. Materijali .....  | 5  |
| 3.1.1. Mikroorganizmi.....   | 5  |
| 3.1.2. Plazmidi.....   | 6  |
| 3.1.3. Oligonukleotidi.....  | 9  |
| 3.1.4. Hranjive podloge i otopine .....  | 10 |
| 3.1.5. Kemikalije i enzimi .....   | 17 |
| 3.2. Metode.....   | 19 |
| 3.2.1. Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture.....                       | 19 |
| 3.2.2. Izolacija plazmida iz malog volumena bakterijske kulture.....                         | 19 |
| 3.2.3. Izolacija genomske DNA iz kvasca <i>S. cerevisiae</i> .....                           | 20 |
| 3.2.4. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom.....                                     | 20 |
| 3.2.5. Izolacija plazmida iz kvasca <i>S. cerevisiae</i> .....                               | 20 |
| 3.2.6. Izolacija DNA iz agaroznog gela .....   | 21 |
| 3.2.7. Cijepanje i modifikacija DNA restrikcijskim enzimima.....                             | 21 |
| 3.2.8. Transformacija bakterije <i>E. coli</i> elektroporacijom.....                         | 21 |
| 3.2.9. Transformacija kvasca <i>S. cerevisiae</i> elektroporacijom .....                     | 22 |
| 3.2.10. Elektroforeza u agaroznom gelu .....   | 22 |
| 3.2.11. Komplementarno sparivanje oligonukleotida .....                                      | 22 |
| 3.2.12. Metoda po Southernu .....  | 22 |
| 3.2.13. Indukcija promotora p <i>GAL1</i> .....  | 24 |
| 4. REZULTATI.....  | 26 |
| 4.1. Konstrukcija plazmida.....  | 26 |
| 4.1.1. Plazmid pLUrg-Sce .....   | 26 |
| 4.1.2. Plazmid pRHIS-SCE.....  | 27 |
| 4.2. Konstrukcija eksperimentalnog sustava u kvascu.....                                     | 32 |
| 4.2.1. Soj BY-aLSUa.....   | 32 |
| 4.2.2. Soj BY-aLSUa-Sce .....  | 34 |
| 4.3. Utjecaj popravka dvolančanog loma prema modelu SSA na stabilnost genoma kvasca.....     | 34 |
| 4.3.1. Kinetika popravka dvolančanog loma prema modelu SSA i duplikacije kromosoma.....      | 36 |
| 4.3.2. Rekombinacija „pop-out“ popraćena ugradnjom jednolančanog fragmenta <i>LEU2</i> ..... | 39 |
| 5. RASPRAVA .....  | 41 |
| 6. ZAKLJUČCI.....  | 44 |
| 7. ZAHVALE.....  | 45 |
| 8. POPIS LITERATURE .....  | 46 |
| 9. SAŽETAK .....   | 48 |
| 10. SUMMARY .....  | 49 |

---

---

## **1. UVOD**

---

---

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* izrazito je značajan zbog svoje primjene u industrijskim bioprocima, ali i u fundamentalnim znanstvenim istraživanjima gdje se koristi kao modelni organizam u proučavanju gotovo svih bioloških procesa koji se događaju u eukariotskim stanicama (Sherman, 2002). Između ostalog, ovaj jednostanični eukariot modelni je organizam za istraživanje molekularnih osnova genske terapije budući da se DNA unesena u stanicu u njegov genom gotovo uvijek ugrađuje homolognom rekombinacijom. Upravo ova činjenica omogućava uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija, odnosno precizno genetičko inženjerstvo i gensku terapiju.

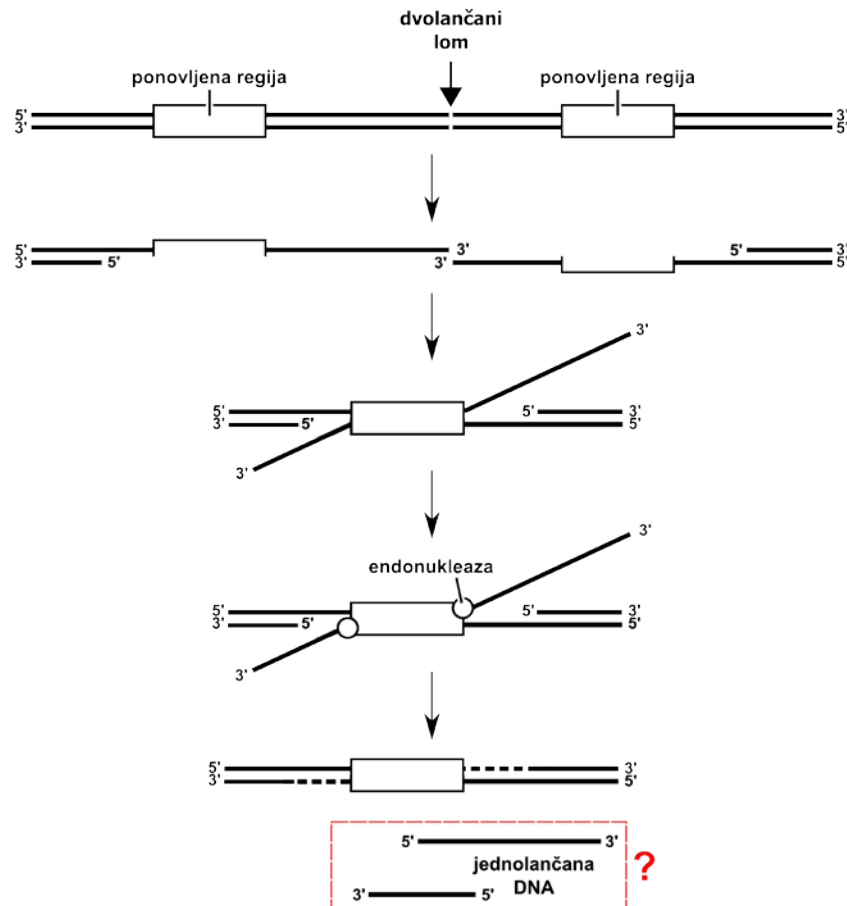
Homologna rekombinacija je preraspoređivanje (rekombiniranje) genetičkog materijala između homolognih (identičnih ili gotovo identičnih) regija DNA koje se nalaze na istoj ili na različitim molekulama DNA. Osim homologne rekombinacije postoji i ilegitalna (nehomologna) rekombinacija, kao što je jednostavno spajanje i kombiniranje nehomolognih fragmenata DNA (NHEJ, *engl.* nonhomologous end joining). Upravo zbog toga, ako fragment DNA unesen u stanicu podliježe ilegitalnoj rekombinaciji, on će se s približno jednakom vjerojatnošću ugraditi u bilo koje mjesto genoma domaćina. Nadalje, ilegitalna rekombinacija često je popraćena promjenom genetičke upute (Symington, 2002) zbog većih delecija (gubitak DNA) i pojave mutacija (promjena genetičke upute).

Dvolančani lom u molekuli DNA opasno je oštećenje genetičkog materijala jer prekida kontinuitet genetičke upute u oba komplementarna lanca (Mani i Chinnaiyan, 2010). On može uzrokovati i smrt stanice zbog gubitka dijela oštećenog kromosoma. U mitotičkim stanicama viših eukariota dvolančani lom uglavnom se popravljiva ilegitalnom rekombinacijom. U kvascu to nije slučaj budući da se u njemu dvolančani lom gotovo uvijek popravljiva homolognom, a jako rijetko ilegitalnom rekombinacijom (Schiestl i Petes, 1991; Bundock i Hooykaas, 1996).

U ovom radu istražuje se posebna vrsta homologne rekombinacije, a to je intrakromosomska rekombinacija između dviju istosmjerno ponovljenih sekvencija koja rezultira gubitkom jedne ponovljene sekvencije i cjelokupne regije između njih. Upravo stoga što uzrokuje gubitak DNA, ova vrsta rekombinacije naziva se rekombinacija „pop-out“ (u prijevodu: „iskočiti van“). Rezultati istraživanja dokazuju da su spontane rekombinacije „pop-out“ gotovo uvijek potaknute pojavom dvolančanog loma u području između dviju ponovljenih sekvencija (Paques i Haber, 1999). Popravak takvog dvolančanog loma odvija se prema modelu SSA (model komplementarnog sparivanja jednolančanih krajeva, *engl.* single strand annealing, Slika 1). Ovaj mehanizam najprije je zamijećen u kulturi animalnih stanica (Lin i sur., 1984), nakon čega je intenzivno proučavan i raščlanjen u kvascu *S. cerevisiae*. Prema ovom modelu krajevi DNA nastali pojavom dvolančanog loma procesiraju se 5'-3'-egzonukleaznom aktivnošću proteinskog kompleksa Rad50-Mre11-Xrs2

---

(Heyer i sur., 2010) i proteina Exo1 (Mimitou i Symington, 2008), čime nastaju dugački 3'-jednolančani krajevi. Ovi krajevi komplementarno se sparuju u području ponovljenih regija uz posredovanje proteina Rad52, a proteinski kompleks s endonukleaznom aktivnošću Rad1-Rad10 odcjepljuje višak nesparenih jednolančanih krajeva. Slijedi resinteza preostalih jednolančanih praznina u dvolančanoj DNA i ligacija preostalih jednolančanih lomova.



Slika 1. Popravlak dvolančanog loma prema modelu SSA. Objašnjenje se nalazi u tekstu.

Važno je primijetiti da popravak dvolančanog loma prema modelu SSA predviđa oslobađanje jednolančanih molekula DNA. Njihova sudbina u stanici do sada nije bila predmet istraživanja. Također je važno da se jednolančana DNA unesena u stanicu kvasca vrlo uspješno ugrađuje u kvašćev genom ilegitimnom rekombinacijom (Gjuračić i Zgaga, 1996) pa postoji mogućnost i da se jednolančana DNA koja nastaje tijekom SSA također ugrađuje u genom kvasca. Osim toga, prethodnim istraživanjima u našem laboratoriju ustanovljeno je da spontana rekombinacija „pop-out“ relativno često rezultira duplikacijom kromosoma na kojem se dogodio „pop-out“ (Žunar, 2009). Ovdje se istražuju upravo ova dva fenomena (ilegitimna ugradnja jednolančane DNA i duplikacija kromosoma).

Ovaj rad usredotočen je na važna znanstvena pitanja jer preispituje trenutno važeći mehanizam popravaka dvolančanog loma koji može biti uzrok gubitka genetičkog materijala u genomima svih eukariotskih organizama, uključujući i genom čovjeka. Osim toga, spomenuti procesi mogli bi imati važnu ulogu u evoluciji eukariotskih genoma (Semon i Wolfe, 2007)

---



---

## **2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

---

---

Poznato je da genomi složenih eukariotskih organizama, uključujući i genom čovjeka, sadrže veliki broj ponovljenih sljedova nukleotida (Richard i sur., 2008) pa stoga postoji relativno velika vjerojatnost njihove međusobne rekombinacije. Također je poznato da intrakromosomska homologna rekombinacija, između istosmjerno ponovljenih regija DNA, može rezultirati gubitkom genetičkog materijala. Ova vrsta homologne rekombinacije naziva se rekombinacija „pop-out“, a mnoga istraživanja (Paques i Haber, 1999) ukazuju da se ona odvija prema modelu SSA (poglavlje 1). Stoga je opći cilj ovog rada produbiti znanja o mehanizmima rekombinacije „pop-out“ i istražiti njen utjecaj na stabilnost genoma.

U prethodnom istraživanju na ovom području (Žunar, 2009) korišten je eksperimentalni sustav, odnosno soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u kojem je moguće selekcionirati stanice u kojima se dogodila spontana rekombinacija „pop-out“ (na osmom kromosomu). Tijekom tih istraživanja ustanovljeno je da je oko 1% spontanih rekombinacija „pop-out“ popraćeno duplikacijom osmog kromosoma, ali nije primijećena ilegitimna ugradnja jednolančane DNA u genom kvasca. Neuspješna selekcija ugradnje jednolančane DNA mogla bi biti posljedica niske učestalosti spontane rekombinacije „pop-out“. Osim toga nameće se pitanje je li eksperimentalni sustav samo selekcionirao duplikaciju kromosoma ili je duplikacija kromosoma stimulirana rekombinacijom „pop-out“.

Ovaj rad nastavak je navedenih istraživanja te su njegovi specifični ciljevi odrediti učestalost ugradnje jednolančane DNA koja nastaje tijekom rekombinacije „pop-out“ i ustanoviti stimulira li rekombinacija „pop-out“ duplikaciju kromosoma.

U svrhu ostvarenja postavljenih ciljeva, u ovom radu konstruiran je soj kvasca *S. cerevisiae* u kojemu se rekombinaciju „pop-out“ inducira uvođenjem dvolančanog loma pomoću endonukleaze I-SceI, a nastali se lom zatim popravljaju prvenstveno prema modelu SSA (Slika 15). Ovaj eksperimentalni sustav osigurava znatno veću učestalost rekombinacije „pop-out“, a zahvaljujući genetičkim biljezima omogućava i jednostavnu selekciju pojedinih genetičkih događaja nacjepljivanjem na odgovarajuće hranjive podloge.

Rezultati ovog rada unaprijedit će saznanja o rekombinaciji „pop-out“, ali i otvoriti nova pitanja o evoluciji i stabilnosti eukariotskog genoma. Razvijen eksperimentalni sustav pogodan je i za istraživanje uloge pojedinih proteina uključenih u popravak dvolančanog loma modelom SSA. Stoga se primjena ovog sustava očekuje i u budućim istraživanjima na ovom području.

---

---

### **3. MATERIЈAL I METODE**

---

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Mikroorganizmi

##### 3.1.1.1. Bakterija *Escherichia coli*

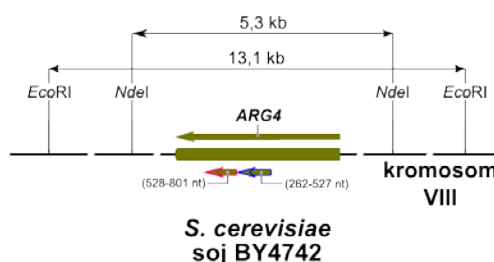
U svrhu umnažanja dvolančanih plazmida upotrijebljena je bakterija *E. coli* soj XL1 blue genotipa *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lacIqZAM15 Tn10* (Tetr)] (*Agilent Technologies*, Santa Clara).

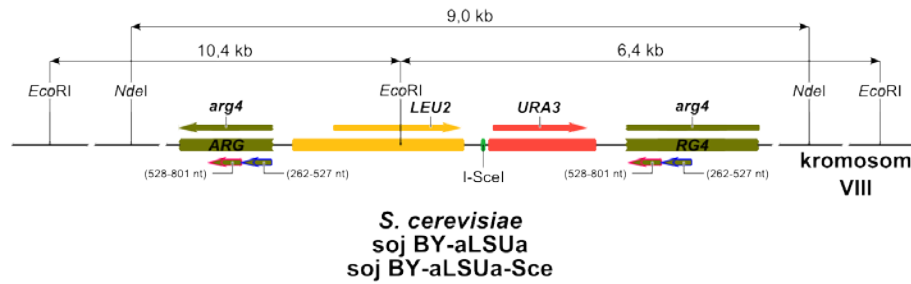
##### 3.1.1.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

U ovom radu korištena su tri soja kvasca *S. cerevisiae*: BY4742, BY-aLSUa i BY-aLSUa-Sce. Soj BY4742 (Slika 2), genotipa *MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0*, potječe od soja S288C čiji je genom u cijelosti sekvencioniran (Brachmann, 1998). Sojevi BY-aLSUa i BYaLSUa-Sce konstruirani su tijekom izrade ovog rada (poglavlje 4.2.) ciljanim genetičkim modifikacijama soja BY4742.

Sojevi BY-aLSUa i BY-aLSUa-Sce sadrže na osmom kromosomu po dvije inaktivne inačice gena *arg4*. Jednoj inačici nedostaje dio koji kodira za 5'-kraj mRNA proteina Arg4 (inačica ARG), dok drugoj nedostaje dio koji kodira za 3'-kraj (sekvencija RG4). Struktura opisanog lokusa, i njegova usporedba s lokusom soja BY4742, prikazana je na Slici 2. Iz slike je vidljivo da je desni dio sekvencije ARG identičan lijevom kraju sekvencije RG4. Između opisanih sekvencija nalazi se dio DNA koji kodira za funkcionalne kvaščeve gene *LEU2* i *URA3* između kojih je smješteno restriksijsko mjesto za endonukleazu I-SceI.

Soj BY-aLSUa-Sce sadrži i kružni replikativni kvaščev plazmid pRHIS-SCE koji kodira za endonukleazu I-SceI pod kontrolom promotora pGALI. Promotor je aktivan i omogućuje ekspresiju endonukleaze ukoliko stanica koristi galaktozu kao izvor ugljika. Endonukleaza uvodi dvolančani lom u restriksijskom mjestu za I-SceI. Ono je smješteno unutar lokusa čija struktura rezultira promjenom fenotipa nakon popravka dvolančanog loma (Slika 15).





Slika 2. Struktura lokusa *ARG4* u soju BY4742 i u sojevima BY-aLSUa i BY-aLSUa-Sce. Pravokutnici označavaju dijelove DNA koji potječu iz genoma kvasca. Strelice iznad njih označavaju pripadajuće otvorene okvire čitanja. Strelice istih boja ispod pravokutnika označavaju međusobno identične sekvencije. Naznačene su i očekivane veličine fragmenata koji nastaju nakon cijepanja restriktivnim endonukleazama *EcoRI* i *NdeI*.

### 3.1.2. Plazmidi

Svi plazmidi upotrijebljeni tijekom izrade ovog rada imaju ishodište replikacije (*ori*) koje omogućuje njihovo umnožavanje u bakteriji *E. coli*. Bakterije uspješno transformirane plazmidom rezistentne su na antibiotik ampicilin budući da plazmid sadrži gen koji kodira za  $\beta$ -laktamazu (*bla*). Kratki pregled plazmida i njihovih svojstva značajnih za ovaj rad prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Plazmidi korišteni tijekom konstrukcije novih plazmida i sojeva kvasca.

| plazmid      | literaturni navod                | svojstvo relevantno u ovom radu  | primjena                        |
|--------------|----------------------------------|--|---------------------------------|
| pTZ18R       | <i>GE Healthcare Biosciences</i> | sadrži gen <i>bla</i> (rezistencija na ampicilin) i <i>ori</i> (ishodište replikacije u <i>E. coli</i> )   | konstrukcija plazmida pRHIS-SCE |
| pLUH         | Štafa, 2009                      | prisutan kvašćev gen <i>HIS3</i>   | konstrukcija plazmida pRHIS-SCE |
| pYES-Sce-NLS | Gregorić, 2008                   | sadrži ishodište replikacije u kvascu <i>S. cerevisiae</i> i gen za sintezu endonukleaze I-SceI pod regulacijom promotora p <i>GAL1</i> , koji se može inducirati uzgojem stanica na galaktozi | konstrukcija plazmida pRHIS-SCE |
| pLUrg        | Svetec,                          | cijepanjem pomoću <i>SacI</i> nastaje  | konstrukcija plazmida           |

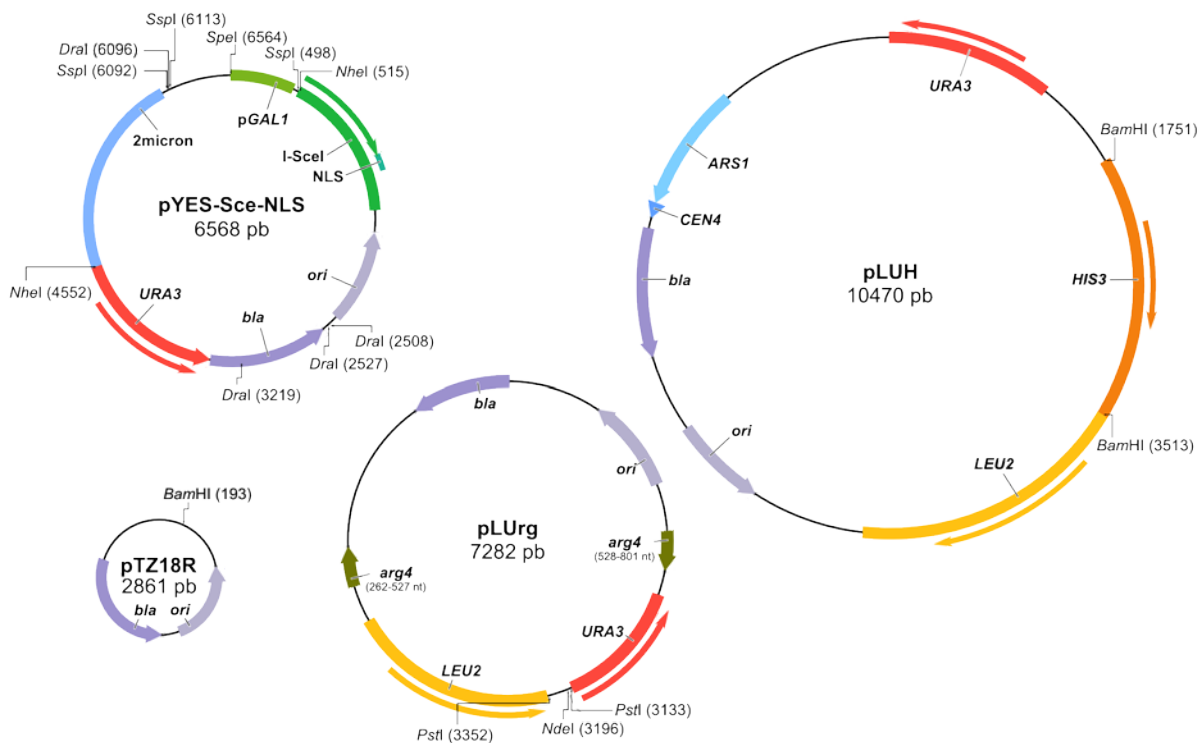
|           |                           |   |   |
|-----------|---------------------------|---|---|
|           | usmeno priopćenje         | transformirajuća DNA koja sadrži funkcionalne kvaščeve gene <i>LEU2</i> i <i>URA3</i> , a koristi se za modifikaciju lokusa <i>ARG4</i>   | pLUrg-Sce                                 |
| pLUrg-Sce | ovaj rad                  | kao i za plazmid pLUrg, cijepanjem pomoću <i>SacI</i> nastaje transformirajuća DNA koja sadrži funkcionalne kvaščeve gene <i>LEU2</i> i <i>URA3</i> , ali i restrikcijsko mjesto za endonukleazu I-SceI | konstrukcija soja BY-aLSUa-Sce            |
| pRHIS-SCE | ovaj rad                  | omogućava ekspresiju endonukleaze I-SceI pod kontrolom promotora <i>pGAL1</i>   | konstrukcija soja BY-aLSUa-Sce            |
| pCW12     | Svetec, usmeno priopćenje | sadrži funkcionalni kvaščev gen <i>ARG4</i>   | sinteza probe koja sadrži gen <i>ARG4</i> |
| pY3L      | Svetec, usmeno priopćenje | sadrži funkcionalni kvaščev gen <i>LEU2</i>   | sinteza probe koja sadrži gen <i>LEU2</i> |

Plazmid pTZ18R (Slika 3) komercijalni je plazmid (*GE Healthcare Biosciences*, New Jersey). Poslužio je kao osnovni plazmid u koji su metodama genetičkog inženjerstva tijekom konstrukcije plazmida pRHIS-SCE (Slika 4) ugrađeni željeni geni.

Plazmid pLUH (Štafa, 2009) sadrži kvaščeve gene *LEU2*, *URA3* i *HIS3*, kvaščevu centromeru (*CEN4*), kao i ishodište replikacije koje mu omogućava samostalnu replikaciju u stanicama kvasca (*ARS1*) (Slika 3).

Plazmid pYES-Sce-NLS prikazan na Slici 3 (Gregorić, 2008) sadrži gen koji kodira za endonukleazu I-SceI pod kontrolom galaktoznog promotora *pGAL1*. Na 3'-kraju otvorenog okvira čitanja endonukleaze dodane su tri kopije sekvencije NLS koje omogućuju aktivni transport ovog proteina u jezgru.

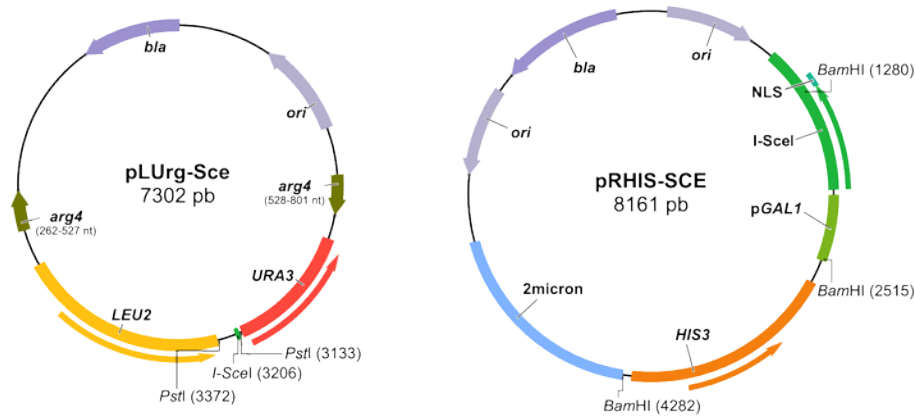
Plazmid pLUrg (Svetec, usmeno priopćenje) prikazan na Slici 3 sadrži dva središnja dijela gena *ARG4* između kojih se nalazi fragment DNA koji sadrži funkcionalne kvaščeve gene *LEU2* i *URA3* te restrikcijsko mjesto za endonukleazu I-SceI.



Slika 3. Plazmidi pYES-Sce-NLS, pTZ18R, pLUH i pLUrg. Prikazana su restrikcijska mjesta značajna za ovaj rad.

U svrhu konstrukcije eksperimentalnog sustava opisanog u ovom radu konstruirana su dva plazmida, pLUrg-Sce i pRHIS-SCE. Plazmid pLUrg-Sce derivat je plazmida pLUrg i sadrži dva središnja dijela gena *ARG4* između kojih su redom umetnuti: funkcionalni gen *LEU2*, restrikcijsko mjesto za endonukleazu I-SceI i funkcionalni gen *URA3*. Fragment ovog plazmida korišten je u transformaciji kvasca nakon koje u genomu nastaju dvije inaktivne kopije gena *ARG4* (Slika 2).

Plazmid pRHIS-SCE sadrži slijed nukleotida koji kodira za otvoreni okvir čitanja endonukleaze I-SceI pod kontrolom promotora *pGAL1*. Na kraju otvorenog okvira čitanja za I-SceI nalazi se signal za aktivni transport proteina u jezgru (NLS, *engl.* nuclear localization signal). Nakon transformacije stanica kvasca ovim plazmidom omogućena je ekspresija I-SceI u stanici ukoliko kvasac koristi galaktozu kao izvor ugljika. Plazmid sadrži i ishodište replikacije kvašćeva plazmida 2micron. Plazmid također kodira za funkcionalni kvašćev gen *HIS3* koji omogućuje selekciju transformanata i održavanje plazmida u stanici kvasca.



Slika 4. Plazmidi pLUrg-Sce i pRHIS-SCE. Prikazana su restrikcijska mjesta značajna za ovaj rad.

### 3.1.2.1. Plazmidi korišteni za sintezu probe za hibridizaciju po Southernu

Kao kalup za sintezu neradioaktivno obilježenih proba ARG4 i LEU2 korišteni su plazmidi pCW12 i pY3L čije sekvencije sadrže funkcionalne kvaščeve gene *ARG4* i *LEU2*.

### 3.1.3. Oligonukleotidi

Svi oligonukleotidi upotrijebljeni tijekom izrade ovog rada, njihova sekvencija i cilj uporabe navedeni su u Tablici 2. Oligonukleotidi SceA i SceB imaju fosforilirane 5'-krajeve. Njihovim komplementarnim sparivanjem nastaje fragment DNA koji sadrži restrikcijsko mjesto za endonukleazu I-SceI.

Tablica 2. Korišteni oligonukleotidi i pripadajuće sekvencije.

| Oligonukleotid | Sekvencija (5'-3')                  | Upotreba  |
|----------------|-------------------------------------|---|
| ARG4 F         | 5' taacgtcgccatctgctaa 3'           | sinteza probe ARG4                                      |
| ARG4 R         | 5' catgtcagacggcactcaa 3'           | sinteza probe ARG4                                      |
| YUPL5          | 5' atataccatggcattatttttctcaacat 3' | sinteza probe LEU2                                      |
| YDOL3          | 5' atatatccggagtgtttttattgtgtat 3'  | sinteza probe LEU2                                      |
| SceA           | 5' [Phos]tagggataacagggtaat 3'      | formiranje restrikcijskog mjesta za endonukleazu I-SceI |



|      |                                |   |
|------|--------------------------------|---|
| SceB | 5' [Phos]attaccctgttatcccta 3' | formiranje restrikcijskog mjesta za endonukleazu I-SceI |
|------|--------------------------------|---|

### 3.1.4. Hranjive podloge i otopine

Sve podloge i otopine steriliziraju se u autoklavu 20 min/121°C i čuvaju na sobnoj temperaturi (osim ukoliko nije napomenuto drugačije) ili se pripremaju iz sterilnih otopina i sterilne deionizirane vode. Krute podloge istog su sastava kao i tekuće, ali sadrže 25 g/L agara koji se dodaje prije sterilizacije.

#### 3.1.4.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

LB (kompletna podloga):

|                     |          |
|---------------------|----------|
| bacto-tripton       | 10,0 g/L |
| bacto-yeast extract | 5,0 g/L  |
| NaCl                | 10,0 g/L |

Podloga s ampicilinom:

Ampicilin se dodaje u sterilnu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracija 20 mg/mL) do konačne koncentracije od 50 µg/mL za krutu podlogu (koja je ohlađena na 58°C), odnosno do konačne koncentracije od 100 µg/mL za tekuću podlogu.

SOC:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| bacto-tripton                        | 2,0 g     |
| kvašičev ekstrakt                    | 500 mg    |
| NaCl                                 | 60 mg     |
| KCl                                  | 20 mg     |
| MgCl <sub>2</sub>                    | 200 mg    |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 250 mg    |
| glukoza                              | 360 mg    |
| destilirana voda                     | do 100 mL |

---

### 3.1.4.2. Podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

YPD (kompletna podloga):

|                  |          |
|------------------|----------|
| bacto-pepton     | 20,0 g/L |
| kvašćev ekstrakt | 10,0 g/L |
| glukoza          | 20,0 g/L |

Minimalne krute selektivne podloge – bez arginina, uracila, leucina i histidina:

|  |           |
|--|-----------|
| yeast nitrogen base (bez aminokiselina i amonijevog sulfata) | 1,7 g/L   |
| amonijev sulfat  | 5,0 g/L   |
| glukoza  | 20,0 g/L  |
| sorbitol   | 182,0 g/L |
| agar   | 25,0 g/L  |
| smjesa aminokiselina i adenina ("drop-out powder")           | 1,3 g/L   |

Sastav smjese aminokiselina i adenina:

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| adenin                  | 2,5 g  |
| L-asparaginska kiselina | 6,0 g  |
| L-glutaminska kiselina  | 6,0 g  |
| L-lizin                 | 1,8 g  |
| L-metionin              | 1,2 g  |
| L-fenilalanin           | 3,0 g  |
| L-serin                 | 22,5 g |
| L-treonin               | 12,0 g |
| L-triptofan             | 2,4 g  |
| L-tirozin               | 1,8 g  |
| L-valin                 | 9,0 g  |

U izradi ovog rada korištene su podloge bez histidina, bez uracila i leucina, bez uracila, leucina i histidina te bez arginina, leucina i uracila. Hranjiva podloga komplementira se dodatkom koncentrirane otopine odgovarajućih aminokiselina i/ili dušičnih baza pri čemu se u jednu litru hranjive podloge dodaje 8,3 mL otopine pojedine aminokiseline. Sterilna koncentrirana otopina odgovarajuće aminokiseline priprema se u koncentraciji: arginin 2,4 g/L, uracil 2,4 g/L, leucin 7,2 g/L, histidin 2,4 g/L.

---

#### Podloga s 5-fluoroorotičnom kiselinom bez arginina i leucina

Podloga se priprema kao i druge krute selektivne podloge. Međutim, zbog toga što je 5-FOA termolabilna, ona se ne smije autoklavirati niti dodavati u hranjivu podlogu topliju od 55°C. Konačna koncentracija 5-FOA u podlozi je 1,0 mg/mL.

#### Podloga za pripremu indukcije promotora *pGALI*:

Sastav i priprema podloge identični su kao i za tekuću selektivnu podlogu, ali se umjesto glukoze kao izvora ugljika dodaje laktat. Njegova konačna koncentracija u podlozi iznosi 2% w/v. Korištenjem ove podloge izbjegava se ulazak stanica u lag fazu nakon što ih se premjesti u podlogu za indukciju.

#### Podloga za indukciju promotora *pGALI*:

Podloga je identična podlozi za pripremu indukcije promotora *pGALI*, ali se u nju dodaje i sterilna otopina galaktoze, tako da njezina konačna koncentracija u mediju iznosi 2% w/v.

#### 3.1.4.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

##### Amonijev acetat (8 M):

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4°C.

##### Ampicilin (20 mg/mL):

Sterilizira se filtracijom i čuva na 4°C.

##### EDTA (0,5 M; pH 8,0):

186,1 g EDTA·2H<sub>2</sub>O otopi se u 80 mL destilirane vode, pH se podesi dodatkom NaOH (približno 2 g peleta) i dopuni destiliranom vodom do 100 mL.

##### Glukoza (40 g/L):

Otopina se sterilizira na 0,5 bara nadtlaka.

---

---

**GTE-pufer:**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| glukoza           | 50 mM |
| EDTA              | 10 mM |
| Tris-HCl (pH 8,0) | 25 mM |

Priprema se iz sterilnih otopina neposredno prije upotrebe.

**Kalijev acetat (3 M):**

Korištena otopina je 3 M u odnosu na kalij i 5 M u odnosu na acetat, a pripravlja se tako da se u 60 mL 5 M otopine kalijeva acetata doda 11,5 mL ledene octene kiseline i 28,5 mL vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4°C.

**Natrijev acetat (3 M):**

24,6 g bezvodnog natrijeva acetata otopi se u destiliranoj vodi, pH se podese dodatkom ledene octene kiseline na vrijednost 5,2. Otopina se dopuni destiliranom vodom do 100 mL, sterilizira i čuva na 4°C.

**NaOH/SDS:**

|      |           |
|------|-----------|
| NaOH | 0,2 mol/L |
| SDS  | 10,0 g/L  |

Otopina se ne sterilizira. Priprema se neposredno prije upotrebe.

**RN-aza:**

Ribonukleaza A otopi se u 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) i 15 mM natrijevu kloridu do konačne koncentracije 10 mg/mL i zagrije 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon hlađenja do sobne temperature čuva se na -20°C.

**TE-pufer (pH 8,0 ili 7,4):**

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| Tris-HCl (pH 8,0 ili 7,4) | 10 mM |
| EDTA (pH 8,0)             | 1 mM  |

Priprema se iz sterilnih otopina.

---

---

**Tris-HCl (1 M):**

12,1 g Tris-a otopi se u 80 mL destilirane vode. Vrijednost pH podesi se dodatkom koncentrirane HCl, nakon čega se volumen otopine dopuni do 100 mL. Približne količine kiseline za pojedine pH vrijednosti su:

pH 7,4 – 7,0 mL

pH 7,6 – 6,0 mL

pH 8,0 – 4,2 mL

**SCE:**

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| sorbitol                   | 1,00 M |
| natrijev citrat            | 0,10 M |
| EDTA                       | 0,06 M |
| Otopina se ne sterilizira. |        |

**STE:**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| SDS                        | 5,0 g/L |
| Tris-HCl (pH 8,0)          | 0,1 M   |
| EDTA (pH 8,5)              | 0,05 M  |
| Otopina se ne sterilizira. |         |

**Zimoliaza 20-T:**

15 mg enzima zimolijaze (*Zymolyase 20-T*) iz bakterije *Arthrobacter luteus* otopi se u 3 mL sterilnog glicerola koncentracije 400 g/L i čuva na -20°C.

**3.1.4.5. Otopina za komplementarno sparivanje oligonukleotida**

|  |        |
|--|--------|
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (10 mM) | 0,21 g |
| NaCl (50 mM)                                 | 0,29 g |
| Tris (20 mM)                                 | 0,24 g |

Magnezijev klorid heksahidrat i natrijev klorid otope se u 50 mL destilirane vode. Tris se također otopi u 50 mL destilirane vode. Nakon sterilizacije 20 min/120°C otopine se ohlade i pomiješaju.

---

---

### 3.1.4.6. Otopine za gel-elektroforezu

#### TBE-pufer (10x):

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Tris                 | 108 g      |
| borna kiselina       | 55 g       |
| EDTA (0,5 M; pH 8,0) | 40 mL      |
| destilirana voda     | do 1000 mL |

Pufer za gel-elektroforezu priprema se u koncentriranom obliku i naknadno se razrjeđuje destiliranom vodom do željene koncentracije. Sterilizacija nije potrebna.

#### Agarozni gel:

Agarozni gel priprema se otapanjem agaroze u TBE-puferu (1x), koji je pripremljen razrjeđivanjem TBE-pufera (10x). Koncentracija agaroze u gelu može biti 7 – 20 g/L, ovisno o potrebi.

#### Boja za nanošenje uzorka:

|                  |           |
|------------------|-----------|
| brom-fenol-plavo | 2,5 g/L   |
| ksilen-cijanolo  | 2,5 g/L   |
| ficoll 400       | 250,0 g/L |

Otopina se ne sterilizira i čuva pri 4°C.

#### Etidijev bromid:

Osnovna otopina priprema se u koncentraciji od 10 mg/mL, ne sterilizira se i čuva na 4°C u tamnoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine u 1 L destilirane vode i također čuva u tamnoj boci.

### 3.1.4.7. Otopine za hibridizaciju DNA metodom po Southernu

Navedene otopine ne moraju biti sterilne.

#### Amonijev acetat (1 M):

Priprema se razrjeđivanjem amonijeva acetata (8 M)

---

---

HCl (0,25 M)

NaOH (0,4 M)

NaOH/amonijev acetat:

NaOH (0,5 M)

amonijev acetat (1,0 M)

Otopina 1:

|                  |       |
|------------------|-------|
| SSC (20x)        | 10 mL |
| SDS (10%)        | 1 mL  |
| destilirana voda | 89 mL |

Otopina 2:

|                  |         |
|------------------|---------|
| SSC (20x)        | 0,5 mL  |
| SDS (100 g/L)    | 1,0 mL  |
| destilirana voda | 98,5 mL |

Otopina za prehibridizaciju:

Za 80 mL otopine:

|  |         |
|--|---------|
| SSC (20x)  | 20,0 mL |
| smjesa za sprječavanje nespecifičnih interakcija<br>(„blocking reagent“) | 0,8 g   |
| Na-sol N-laurilosarkozina (100 g/L)                                      | 0,8 mL  |
| SDS (100 g/L)  | 160 µL  |

Otopina za hibridizaciju:

Ima isti sastav kao i otopina za prehibridizaciju, ali sadrži i 20 – 50 ng obilježene DNA (DNA-probu).

Pufer 1:

Tris-HCl (0,10 M; pH 7,5)

NaCl (0,15 M)

---

**Pufer 2:**

Priprema se otapanjem smjese za sprječavanje nespecifičnih reakcija („blocking reagent“) u puferu 1 do koncentracije od 10 g/L.

**Pufer 3:**

Tris (1 M; pH 9,7) 50 mL

natrijev klorid (5 M) 10 mL

magnezijev klorid (1 M) 25 mL

pH se podesi na vrijednost 9,5 dodatkom otopine HCl. Volumen otopine podesi se na 500 mL dopunjavanjem destiliranom vodom.

**SSC (20x):**

natrijev klorid (3,0 M)

natrijev citrat (0,3 M)

**3.1.5. Kemikalije i enzimi**

|   |   |
|---|---|
| Agaroz:   | <i>Appligene, Strassbourg.</i>  |
| Apsolutni etanol:   | <i>Novokem, Zagreb.</i>   |
| DNA bakteriofaga lambda:  | <i>New England Biolabs, Beverly.</i>  |
| EDTA:   | <i>Kemika, Zagreb.</i>  |
| Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA:   | <i>New England Biolabs, Beverly,<br/>Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim,<br/>Amersham Biosciences, San Francisco.</i> |
| Etidijev bromid:  | <i>Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.</i>  |
| Izopropanol:  | <i>Alkaloid, Skopje.</i>  |
| Sastojci hranjivih podloga:   | <i>Difco, Detroit<br/>Merck, Darmstadt.<br/>Sigma Chemical Co., St. Louis.</i>  |
| Komplet kemikalija za izolaciju DNA iz gela:                                      | <i>QIAGEN, Hilden.</i>  |
| Komplet kemikalija za izolaciju plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture: | <i>QIAGEN, Hilden.</i>  |



|   |   |
|---|---|
| Komplet kemikalija za izolaciju plazmida iz malog volumena bakterijske kulture: | <i>GE Healthcare Biosciences, New Jersey.</i>                                   |
| Komplet kemikalija za hibridizaciju DNA metodom po Southernu:                   | <i>Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.</i>                                      |
| PEG:  | <i>Appligene, Strasbourg.</i>   |
| Ribonukleaza A:   | <i>Sigma Chemical Co., St. Louis.</i>   |
| Tris: Tris Ultra Pure   | <i>Sigma Chemical Co., St. Louis.</i>   |
| Zimoliaza (Zymolyaze 100-T i 20-T):   | <i>Seikugaku Kogyo Co., Tokyo.</i>  |
| Kemikalije za pripremu ostalih otopina:   | <i>Sigma Chemical Co., St. Louis,<br/>Kemika, Zagreb,<br/>Alkaloid, Skopje.</i> |

---

---

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture

Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture provedena je prema uputama proizvođača (*QIAGEN*, Hilden) kompleta kemikalija MaxiPrep, uz manje modifikacije. Ukratko, prekončna bakterijska kultura volumena 500 mL centrifugira se 10 min/5000 min<sup>-1</sup>. Dobiveni talog resuspendira se u 10 mL GTE pufera kojem je dodana RNA-aza u koncentraciji 5 µg/mL. Otopini se doda 10 mL svježe pripremljene otopine NaOH/SDS. Suspenzija se promiješa preokretanjem kivete i inkubira na sobnoj temperaturi 5 min. Slijedi dodavanje 10 mL otopine KAc (3,0 M, pH 5,5), miješanje preokretanjem kivete i inkubacija 20 min na -20°C. Otopina se centrifugira 30 min/10000 min<sup>-1</sup>/4°C. Prikupljeni supernatant se ponovno centrifugira 15 min/10000 min<sup>-1</sup>/4°C. Kolona QIAGEN-tip 100 aktivira se ispiranjem s 10 mL otopine Buffer QBT nakon čega se kroz kolonu propusti prethodno prikupljen supernatant. Kolona se ispere četiri puta sa po 10 mL otopine Buffer QC nakon čega se DNA eluira s 15 mL otopine Buffer QF. DNA se iz otopine taloži dodatkom 3,5 mL izopropanola, nakon čega se dobivena smjesa promiješa i centrifugira 30 min/10000 min<sup>-1</sup>/4°C. Supernatant se odbaci, a dobiveni pelet osuši na zraku, nakon čega se otopi u 500 µL TE pufera. Otopina DNA inkubira se 15 min/70°C i pohrani na 4°C.

### 3.2.2. Izolacija plazmida iz malog volumena bakterijske kulture

Izolacija plazmida iz malog volumena bakterijske kulture provedena je prema uputama proizvođača (*GE Healthcare Biosciences*, New Jersey) kompleta kemikalija GFX Micro Plasmid PrepKit, uz manje modifikacije. Ukratko, 3 mL prekončne bakterijske kulture centrifugira se 3 min/3000 min<sup>-1</sup>. Dobiveni talog resuspendira se u 300 µL GTE pufera kojem je dodana RNA-aza u koncentraciji 5 µg/mL. Slijedi dodavanje 300 µL svježe pripremljene otopine NaOH/SDS. Suspenzija se promiješa okretanjem, nakon čega joj se dodaje 600 µL otopine NaAc (3,0 M). Nakon miješanja okretanjem, otopina se centrifugira 10 min/10000 min<sup>-1</sup>. Supernatant se prebaci na kolonu za izolaciju gdje se inkubira 1 min i centrifugira 3 min/3000 min<sup>-1</sup>. U kolonu se doda 400 µL otopine „wash buffer“. Slijedi centrifugiranje 5 min/5000 min<sup>-1</sup>. Eluat se odbaci, a kolona ponovno centrifugira 5 min/8000 min<sup>-1</sup>. DNA se s kolone ispire dodavanjem 50 – 100 µL TE pufera (pH 8) centrifugiranjem 5 min/7000 min<sup>-1</sup>. Dobivena otopina DNA pohranjuje se na 4°C.

---

---

### 3.2.3. Izolacija genomske DNA iz kvasca *S. cerevisiae*

Za izolaciju kvaščeve DNA korištena je metoda koju su opisali Winston i sur. (1983). Stanice se uzgoje do stacionarne faze u 4 mL tekuće podloge te se centrifugiraju 5 min/3000 min<sup>-1</sup>, isperu u vodi, a zatim i u otopini SCE. Nakon toga resuspendiraju se u 180 µL otopine SCE. Doda se 20 µL enzima zimolijaze, nakon čega se suspenzija inkubira 45 min/37°C. Zatim se doda 800 µL otopine STE, suspenzija se promiješa okretanjem, inkubira na 20 min/70°C, ohladi na 4°C, a potom se u nju doda 200 µL KAc (5,0 M, pH 4,8). Slijedi centrifugiranje 30 min/11000 min<sup>-1</sup>/4°C. Supernatantu volumena 970 µL doda se 630 µL izopropanola, otopina se promiješa i centrifugira 20 min/11000 min<sup>-1</sup>/4°C. Dobiveni talog se osuši i otopi u 300 µL TE pufera, uz dodatak 1 µL RNA-aze. Zatim se provede postupak taloženja DNA amonijevim acetatom i etanolom.

### 3.2.4. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom

Određenom volumenu otopine DNA doda se 1/3 volumena amonijeva acetata (8,0 M) i 8/3 volumena apsolutnog etanola. Provede se inkubacija 15 min/-20°C i centrifugiranje 20 min/11000 min<sup>-1</sup>/4°C. Osušeni talog se otopi u 50 µL sterilne deionizirane vode ili TE pufera, nakon čega se provede denaturacija DNA inkubacijom otopine DNA na 20 min/70°C.

### 3.2.5. Izolacija plazmida iz kvasca *S. cerevisiae*

Za izolaciju plazmida iz stanica kvasca korišten je komplet kemikalija GFX Micro Plasmid PrepKit, proizvođača *GE Healthcare Biosciences*, New Jersey. Stanice kvasca uzgoje se do stacionarne faze u 4 mL tekuće podloge, centrifugiraju 5 min/3000 min<sup>-1</sup>, isperu u vodi, a zatim i u otopini SCE. Slijedi resuspendiranje stanica u 180 µL otopine SCE. Doda se 20 µL enzima zimolijaze, nakon čega se suspenzija inkubira 45 min/37°C. Potom se doda još 20 µL zimolijaze te se suspenzija ponovno inkubira 45 min/37°C. Zatim se doda 800 µL otopine STE, suspenzija se promiješa okretanjem, inkubira 20 min/70°C i ohladi na 4°C. Suspenzija se ponovno promiješa okretanjem nakon čega joj se dodaje 600 µL otopine NaAc (3,0 M). Nakon miješanja otopina se centrifugira 10 min/10000 min<sup>-1</sup>. Supernatant se prebaci na kolonu za izolaciju i inkubira 1 min, nakon čega se centrifugira 3 min/3000 min<sup>-1</sup>. U kolonu se doda 400 µL otopine „wash buffer“. Slijedi centrifugiranje 5 min/5000 min<sup>-1</sup>. Eluat se odbaci, a sama kolona ponovno centrifugira 5 min/8000 min<sup>-1</sup>. DNA se s kolone ispiru dodavanjem 50 – 100 µL TE pufera (pH 8) centrifugiranjem 5 min/7000 min<sup>-1</sup>. Dobivena otopina DNA pohranjuje se na 4°C.

---

---

### 3.2.6. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela provedena je prema uputama proizvođača (*QIAGEN*, Hilden) kompleta kemikalija QIAquick Gel Extraction Kit. Ukratko, komad agaroznog gela koji sadrži željeni fragment DNA izreže se iz gela, izvaže i otopi u 3 volumena otopine Buffer QG. Smjesa se inkubira 10 min/50°C u svrhu potpunog otapanja agaroznog gela, nakon čega se u nju doda 1 volumen izopropanola. Otopina se nanese na kolonu za izolaciju DNA. Provede se centrifugiranje 1 min/8000 min<sup>-1</sup>. Slijedi ispiranje kolone dodatkom 750 µL otopine Buffer PE uz centrifugiranje 1 min/8000 min<sup>-1</sup>. Filtrat se odbaci, a kolona još jednom centrifugira 5 min/8000 min<sup>-1</sup>. DNA se s kolone ispere dodatkom 50 µL TE pufera ili otopine EB Buffer i pohrani na 4°C.

### 3.2.7. Cijepanje i modifikacija DNA restrikcijskim enzimima

Restrikcijski i modifikacijski enzimi korišteni su prema uputama proizvođača (*New England Biolabs*, Beverly, *Boehringer Mannheim GmbH*, Mannheim i *GE Healthcare Biosciences*, New Jersey).

### 3.2.8. Transformacija bakterije *E. coli* elektroporacijom

Tekuća kultura bakterije *E. coli* volumena 500 mL uzgaja se na 300 min<sup>-1</sup>/ 37°C do trenutka kada OD<sub>600</sub> suspenzije dosegne vrijednost 0,5 – 0,7. Kultura se hladi na ledu 20 min. Od ovog koraka nadalje sve manipulacije stanicama provode se na temperaturi blizu 0°C. Također, sve laboratorijsko posuđe korišteno u manipulacijama prethodno se ohladi u ledu. Stanice se centrifugiraju 15 min/4000 min<sup>-1</sup>/4°C, nakon čega se talog ispire u hladnom 10%-tnom glicerolu, najprije u volumenu od 500 mL, zatim u volumenu od 250 mL i naposljetku u volumenu od 20 mL. Pelet stanica se resuspendira u 1 – 2 mL hladnog 10%-tnog glicerola. Suspenzija se razdijeli u alikvote volumena 40 µL koji se pohrane na -70°C.

Neposredno prije elektroporacije alikvot se zagrije u ledu na temperaturu od 0°C, nakon čega se u njega dodaje 1 – 2 µL DNA. Nakon homogenizacije i inkubacije na ledu u trajanju od 1 min, smjesa se prenese u na ledu ohlađenu kivetu za elektroporaciju. Kiveta se umetne u elektroporator. Kroz nju se provede odgovarajući visokovoltazni puls nakon kojeg se stanice brzo resuspendiraju u 1 mL medija SOC. Dobivena suspenzija inkubira se 1 h/300 min<sup>-1</sup>/37°C. Odgovarajući volumen nacijepi se na prikladnu selektivnu podlogu.

---

---

### 3.2.9. Transformacija kvasca *S. cerevisiae* elektroporacijom

Za transformaciju kvasca *S. cerevisiae* korištena je metoda koju su opisali Grey i Brendel (1995). Stanice kvasca prikupe se sa YEPD ploče dva dana nakon nacjepljivanja, resuspendiraju u 1 mL otopine sorbitola (1 M) i centrifugiraju 5 min/3000 min<sup>-1</sup>. Supernatant se odbaci, a talog stanica promiješa. 40 µL suspenzije stanica prenese se u sterilnu kivetu za elektroporaciju gdje se pomiješa sa 1 – 5 µL DNA. Nakon primjene odgovarajućeg visokovoltalnog pulsa u kivetu se brzo doda 1 mL otopine sorbitola (1 M). Provede se homogenizacija miješanjem. Odgovarajući volumen suspenzije nacijepi se na prikladnu selektivnu podlogu koja sadrži 1 M sorbitol.

### 3.2.10. Elektroforeza u agaroznom gelu

Gel-elektroforeza provodila se u elektroforetskim kadicama proizvođača *BioRad*, Hercules. Otopljen agarozni gel ohlađen na oko 50°C izlije se u nosač gela na koji je postavljen češalj za formiranje jažica. Nakon što se gel skrutne, nosač gela se postavi u kadicu za elektroforezu. U nju se ulije TBE (1x) pufer tako da sloj pufera iznad gela bude visok oko 1 mm. Iz gela se izvadi češalj. Uzorci DNA se pomiješaju s bojom za nanošenje uzoraka u omjeru 6:1 i unesu mikropipetom u jažice na gelu. Elektroforeza se najčešće provodi pri naponu od 60 V u vremenu 1 – 4 h (ovisno o koncentraciji agaroze u gelu i veličini analiziranih fragmenata DNA). Iznimka su slučajevi u kojima se gel-elektroforeza provodi kako bi se nakon razdvajanja fragmenata DNA određeni fragment izolirao iz gela. U tom slučaju postupak se provodi pri naponu 10 – 40 V kroz 10 – 16 h. Po završetku elektroforeze gel se inkubira u otopini etidij-bromida 15 – 20 min na tamnom mjestu, nakon čega se osvijetli UV svjetlom na transiluminatoru i po potrebi fotografira kroz crveni filtar.

### 3.2.11. Komplementarno sparivanje oligonukleotida

Smjesa za komplementarno sparivanje sastoji se od po 5 µL svakog oligonukleotida i 90 µL otopine za hibridizaciju. Smjesa se zapečati u epruveti za mikrocentrifugiranje te se uroni u kipuću destiliranu vodu gdje se inkubira 1 min na temperaturi vrenja. Dovod topline se prekine, a smjesa se i dalje inkubira u vodi idućih 8 – 10 h. U otopini se pritom komplementarno sparuju oligonukleotidi. Nastala otopina pohranjuje se na 4°C.

### 3.2.12. Metoda po Southernu

Hibridizacija DNA metodom po Southernu provedena je korištenjem kompleta kemikalija za neradioaktivno obilježavanje i otkrivanje homologne DNA prema uputama proizvođača (*Boehringer Mannheim GmbH*, Mannheim), uz manje modifikacije (Gjuračić i Zgaga, 1996). Cilj

---

---

metode jest detektirati fragment DNA komplementaran označenoj DNA-probi nakon što se provede prijenos fragmenata DNA s gela na membranu. DNA-probu čine molekule DNA u koje je tijekom *in vitro* sinteze komplementarnog lanca ugrađen digoksinom obilježen deoksiuridin-trifosfat (dUTP). Nakon hibridizacije probe s komplementarnim fragmentima DNA vezanima na membranu, detekcija se ostvaruje enzimskom aktivnošću alkalne fosfataze fuzionirane sa dUTP-antitijelom. Navedene količine pufera korištene tijekom posthibridizacijskog ispiranja i vizualizacije primjenjive su za membrane površine 100 cm<sup>2</sup>. Sva ispiranja, osim ukoliko je navedeno drugačije, odvijaju se pri sobnoj temperaturi uz lagano protresanje.

Nakon provedene gel-elektroforeze i vizualizacije DNA u otopini etidij-bromida, agarozni gel inkubira se 10 min u otopini HCl (0,25 M). Slijedi kratko ispiranje u destiliranoj vodi i inkubacija u otopini NaOH/amonijev acetat u trajanju 10 - 15 min. Prijenos na membranu odvija se 1 – 2 h u uređaju za prijenos vakuumom (*GE Healthcare Biosciences*, New Jersey) uz podtlak od 15 kPa, pri čemu je gel uronjen u otopinu NaOH (0,4 M). Nakon završenog prijenosa membrana se ispire u amonijevu acetatu (1 M), a zatim inkubira 20 min/120°C. Slijedi provođenje prethibridizacije.

Otopina za prethibridizaciju priprema se dodatkom sintetizirane DNA-probe i 3,0 mL otopine DNA sperme haringe koncentracije 20 µg/mL u 30,0 µL otopine digoksinom-označenog markera. Pripremljena otopina dobro se promiješa i spremi na -20°C. Neposredno prije korištenja proba se odleđi, zagrije do vrenja i inkubira u tim uvjetima 10 min, nakon čega se brzo ohladi u ledu.

Prethibridizacija se provodi inkubacijom 2 – 3 sata pri 68°C uz lagano protresanje u zataljenoj plastičnoj vrećici. Na 1 cm<sup>2</sup> membrane koristi se 0,5 mL otopine za prethibridizaciju.

Idući korak je inkubacija membrane u otopini za hibridizaciju u trajanju od 18 h (preko noći) tijekom koje se koriste isti uvjeti inkubacije korišteni u koraku prethibridizacije. Volumen otopine za hibridizaciju iznosi 10 - 20% korištenog volumena otopine za prethibridizaciju. Nakon završene hibridizacije membrana se dva puta ispire s po 50 mL otopine A pri sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min, uz lagano protresanje, a zatim još dva puta po 15 min s po 25 mL otopine B pri temperaturi od 68°C.

U sklopu provođenja imunološke detekcije membrana se ispire redom: kratko u 100 mL pufera 1, 1 h u 100 mL pufera 2, 30 min u zataljenoj plastičnoj vrećici sa 20 mL pufera 2 (u kojem se nalazi 4 µL kompleksa antitijela i alkalne fosfataze), dva puta po 15 min u 100 mL pufera 1 i kratko u puferu 3. U idućem koraku membrana se zatali u plastičnu vrećicu sa 10 mL pufera 3 uz dodatak 35 µL X-fosfata (5-brom-4-klor-indolil-fosfat) i 45 µL NBT-a (nitrozo-plavi-tetrazolij) te

---

---

se inkubira u mraku na temperaturi od 37°C do pojave tamno obojenih vrpca (20 min do 24 h). Nakon zaustavljanja reakcije ispiranjem membrane u destiliranoj vodi, membrana se osuši na zraku.

### 3.2.12.1. Sinteza DNA-probe

Proba je sintetizirana pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR), pri čemu je kao kalup korišten fragment DNA što sadrži gen koji se želi detektirati hibridizacijom po Southernu. Za označavanje novosintetiziranih molekula korištena je otopina DIG DNA Labeling Mix (10x konc.). Sama reakcija provedena je po sljedećem protokolu: pripremljena otopina inkubira se 5 min/95°C, nakon čega se u nju dodaje 1,0 µL otopine Taq polimeraze (1 jedinica/µL). Nadalje se provede 30 ciklusa koji se sastoje od sljedećih faza:

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| denaturacija                   | 35 s/95°C  |
| sparivanje početnica s kalupom | 35 s/57°C  |
| sinteza DNA                    | 90 s/72°C. |

Po završetku tridesetog ciklusa smjesa se inkubira 10 min/72°C, nakon čega se ohladi na 4°C.

Ovako obilježena DNA proba može se čuvati u otopini za hibridizaciju na -20°C. Moguće ju je upotrijebiti više puta, ali ju je potrebno denaturirati neposredno prije svake upotrebe inkubacijom 5 min/95°C.

Sinteza obilježenog DNA markera provodi se metodom nasumičnog započinjanja (*engl.* random priming), pri čemu se kao kalup koristi DNA bakteriofaga lambda pocijepana endonukleazom *HindIII*. Za obilježavanje se koristi otopina DIG DNA Labeling Mix.

### 3.2.13. Indukcija promotora pGAL1

Svrha indukcije promotora pGAL1 poticanje je transkripcije gena pod njegovom kontrolom. Spomenuti promotor aktivan je samo ukoliko stanica koristi galaktozu kao izvor ugljika. U ovom radu indukcija promotora pGAL1 provedena je u soju BY-aLSUa-Sce, čime je potaknuta ekspresija endonukleaze I-SceI. Ovime je unutar stanice omogućeno uvođenje specifičnog dvolančanog loma u modificiranom lokusu *ARG4* koji sadrži restrikcijsko mjesto za I-SceI.

Prekultura kvasca uzgoji se u 80 mL selektivne kemijski definirane podloge koja kao izvor ugljika sadrži glukozu (2% w/v). Inkubacija se provodi 48 h/250 min<sup>-1</sup>/28°C nakon čega je koncentracija stanica ~10<sup>8</sup> st/mL. Stanice se centrifugiraju 5 min/5000 min<sup>-1</sup> i nacijepe u 400 mL kemijski definirane selektivne podloge (pH 5,5) koja kao izvor ugljika sadrži laktat (2% w/v). Ovaj korak provodi se kako bi se izbjegla lag faza tijekom prijelaza kulture s glukoze na galaktozu kao

---

izvor ugljika. Kultura se inkubira 48 h/250 min<sup>-1</sup>/28°C, čime koncentracija stanica poraste na 5·10<sup>7</sup> st/mL. Slijedi centrifugiranje 5 min/5000 min<sup>-1</sup> i nacjepljivanje u selektivnu kemijski definiranu hranjivu podlogu (pH 5,5) koja sadrži laktat (2% w/v) i galaktozu (2% w/v) kao izvore ugljika. Ovime je započeta indukcija. Zaustavljanje indukcije može se postići dodavanjem sterilne otopine glukoze.

---



---

## **4. REZULTATI**

---

---

Opći je cilj ovog rada istražiti posljedice popravka dvolančanog loma kromosoma prema modelu SSA (poglavlje 1.) na stabilnost genoma kvasca *S. cerevisiae*. Zbog toga je konstruiran eksperimentalni sustav, odnosno soj kvasca BY-aLSUa-Sce koji je detaljno opisan u poglavlju 3.1.1.2. Ovaj soj konstruiran je pomoću dvaju plazmida (pLUrg-Sce i pRHIS-SCE) koji su također konstruirani u ovom radu. Postupci konstrukcije plazmida pLUrg-Sce i pRHIS-SCE opisani su u poglavlju 4.1., a konstrukcija kvasca BY-aLSUa-Sce u poglavlju 4.2. Rezultati istraživanja u konstruiranom eksperimentalnom sustavu opisani su u poglavlju 4.3.

#### 4.1. Konstrukcija plazmida

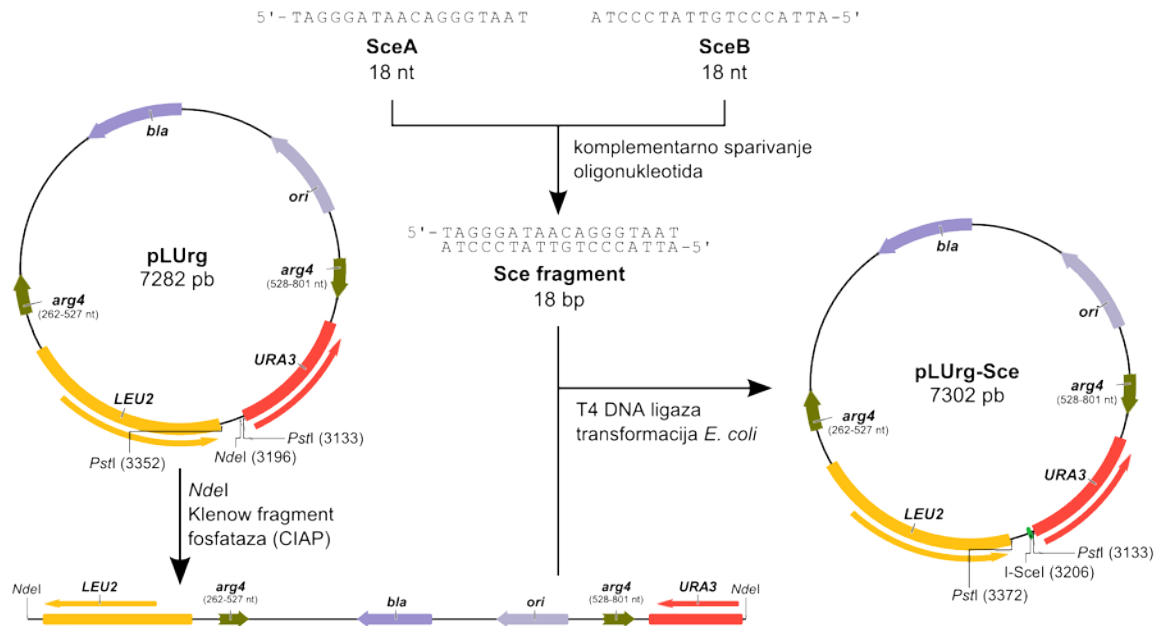
Plazmidi pLUrg-Sce i pRHIS-SCE konstruirani su uobičajenim metodama tehnologije rekombinantne DNA. Pri tome su svi fragmenti DNA nastali cijepanjem restriksijskim endonukleazama. Prije dodavanja u ligacijsku otopinu fragmenti su izolirani iz gela, a ako je to bilo potrebno, stršeci 5'-krajevi prevedeni su u ravne krajeve polimeraznom aktivnošću Klenowog enzima. Za ligiranje fragmenata DNA uvijek je korištena T4 DNA-polimeraza. Osim toga, svi fragmenti koji su sadržavali ishodište replikacije nakon cijepanja podvrgnuti su djelovanju fosfataze CIAP u svrhu sprječavanja religacije vektora. U svrhu umnažanja i izolacije konstruiranog plazmida, ligacijskom otopinom transformirana je bakterija *E. coli* soj XL1 blue (poglavlje 3.1.1.1.), a transformanti su selekcionirani na podlozi s antibiotikom ampicilinom. Strukture svih konstruiranih plazmida provjerene su restriksijskom analizom nakon izolacije plazmida iz malog volumena (poglavlje 3.2.2.).

##### 4.1.1. Plazmid pLUrg-Sce

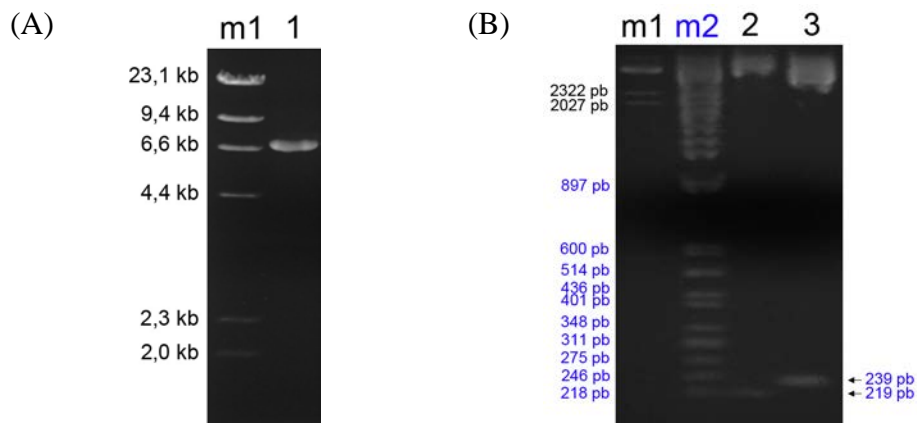
Struktura plazmida pLUrg-Sce detaljno je opisana u poglavlju 3.1.2. Plazmid je konstruiran nizom postupaka prikazanih na Slici 5. Plazmid pLUrg pocijepan je restriksijskom endonukleazom *NdeI*, tretiran polimeraznom aktivnošću Klenowog fragmenta i fosfatazom te je nakon elektroforeze izoliran iz gela i ligiran s dvolančanim Sce-fragmentom koji je pripremljen komplementarnim sparivanjem jednolančanih nukleotida SceA i SceB. Provjera uspješnosti izolacije DNA iz gela i restriksijska analiza konstruiranog plazmida pLUrg-Sce prikazane su na Slici 6.

Rezultati restriksijske analize plazmida pLUrg i pLUrg-Sce (Slika 6.B) potvrđuju uspješnost konstrukcije plazmida pLUrg-Sce. Naime, cijepanjem plazmida pLUrg endonukleazom *PstI* nastaje fragment duljine 219 pb koji sadrži restriksijsko mjesto za endonukleazu *NdeI*. Isti taj fragment u plazmidu pLUrg-Sce dulji je upravo za duljinu Sce-fragmenta ugrađenog u restriksijsko mjesto *NdeI*.

---



Slika 5. Postupak konstrukcije plazmida pLURg-Sce. Prikazana su restrikcijska mjesta korištena tijekom konstrukcije i provjere strukture konstruiranog plazmida.



Slika 6. Provjera uspješnosti izolacije DNA iz gela (A) i provjera strukture plazmida pLURg-Sce (B). 1 – linearizirani plazmid pLURg nakon izolacije iz gela; 2 – plazmid pLURg pocijepan pomoću *PstI*; 3 – plazmid pLURg-Sce pocijepan pomoću *PstI*; m1 – DNA bakteriofaga lambda pocijepana pomoću *HindIII*; m2 – DNA bakteriofaga lambda pocijepana pomoću *AatII*. Strelice označavaju fragment DNA koji sadrži restrikcijsko mjesto *NdeI* (plazmid pLURg) odnosno ugrađeni Sce fragment (plazmid pLURg-Sce).

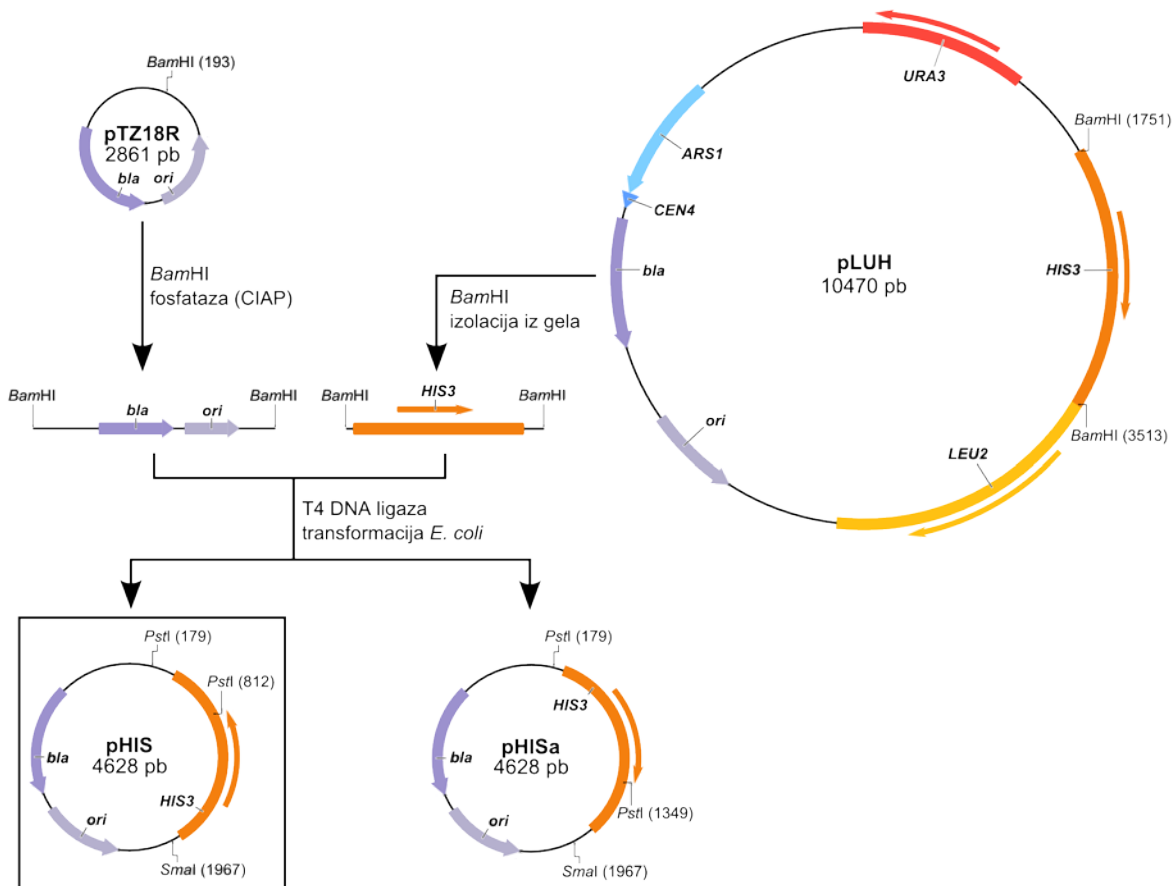
#### 4.1.2. Plazmid pRHIS-SCE

Postupak konstrukcije plazmida pRHIS-SCE nešto je kompliciraniji, a može se podijeliti u tri koraka. Najprije je u plazmid pTZ18R ugrađen fragment koji sadrži kvašćev gen *HIS3* iz

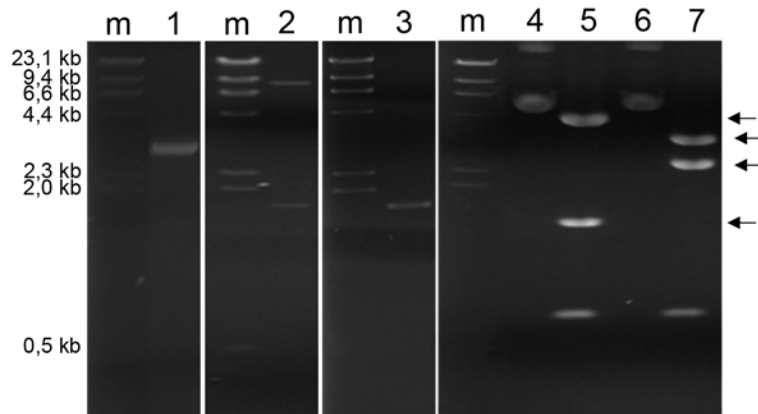
plazmida pLUH te je tako konstruiran plazmid pHIS (Slika 7). U sljedećem je koraku u plazmid pHIS ugrađen fragment plazmida pYES-Sce-NLS koji sadrži ishodište replikacije kvaščeva plazmida 2micron te je time konstruiran plazmid pRHIS (Slika 9). U posljednjem koraku (Slika 11), plazmid pRHIS-SCE konstruiran je ugradnjom fragmenta DNA koji sadrži gen za endonukleazu I-SceI pod kontrolom promotora pGAL1 (također iz plazmida pYES-Sce-NLS).

Pri konstrukciji plazmida pHIS i pRHIS (Slika 7 i Slika 9), fragmenti DNA mogli su se međusobno ligirati u dvjema različitim orijentacijama pa su konstruirana dva oblika ovih plazmida (pHIS i pHISa te pRHIS i pRHISa), ali su za daljnji postupak korišteni samo plazmidi pHIS i pRHIS (uokvireni u Slici 7 i Slici 9).

Rezultati provjere pojedinih postupaka i koraka tijekom konstrukcije plazmida pHIS, pRHIS i pRHIS-SCE prikazani su na Slici 8, Slici 10 i Slici 12.

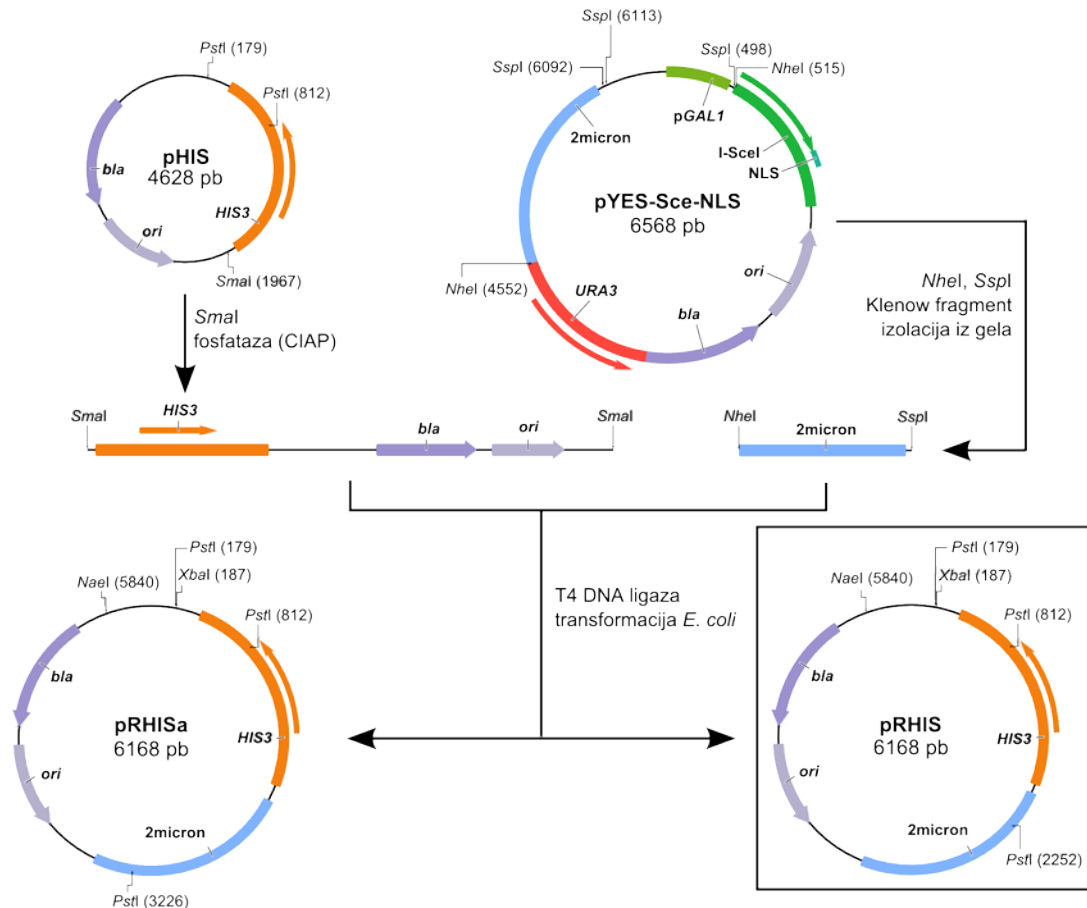


Slika 7. Postupak konstrukcije plazmida pHIS. Prikazana su restrikcijska mjesta relevantna za postupak konstrukcije i restrikcijsku analizu konstruiranog plazmida. U daljnjem postupku korišten je samo plazmid pHIS u kojemu su geni *bla* i *HIS3* u istoj orijentaciji.

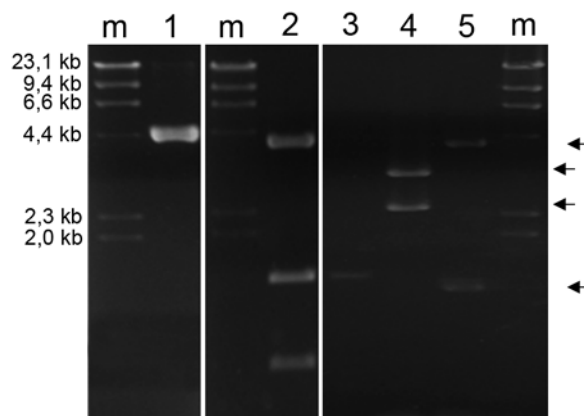


Slika 8. Provjera pojedinih postupaka tijekom konstrukcije plazmida pHIS i restrikcijska analiza konstruiranog plazmida pHIS. 1 – plazmid pTZ18R pocijepan pomoću *Bam*HI i izoliran iz gela; 2 – plazmid pLUH pocijepan pomoću *Bam*HI; 3 – fragment plazmida pLUH koji sadrži gen *HIS3* izoliran iz gela; 4 i 6 – kružni (nepocijepani) konstruirani plazmidi pHIS; 5 – plazmid pHIS pocijepan pomoću *Pst*I (geni *bla* i *HIS3* su u istoj orijentaciji); 7 – plazmid pHISa pocijepan pomoću *Pst*I (geni *bla* i *HIS3* su u različitoj orijentaciji); m – DNA bakteriofaga lambda pocijepana pomoću *Hind*III. Fragmenti označeni strelicama posljedica su ligacije fragmenata u dvjema međusobno različitim orijentacijama.

Iz rezultata prikazanih na Slici 8 (uzorci 5 i 7) vidi se da su konstruirani plazmidi pHIS i pHISa, ali je u daljnjem postupku korišten samo plazmid pHIS u kojem su geni *bla* i *HIS3* u istoj orijentaciji (u skladu s mapom plazmida koja je prikazana na Slici 7).



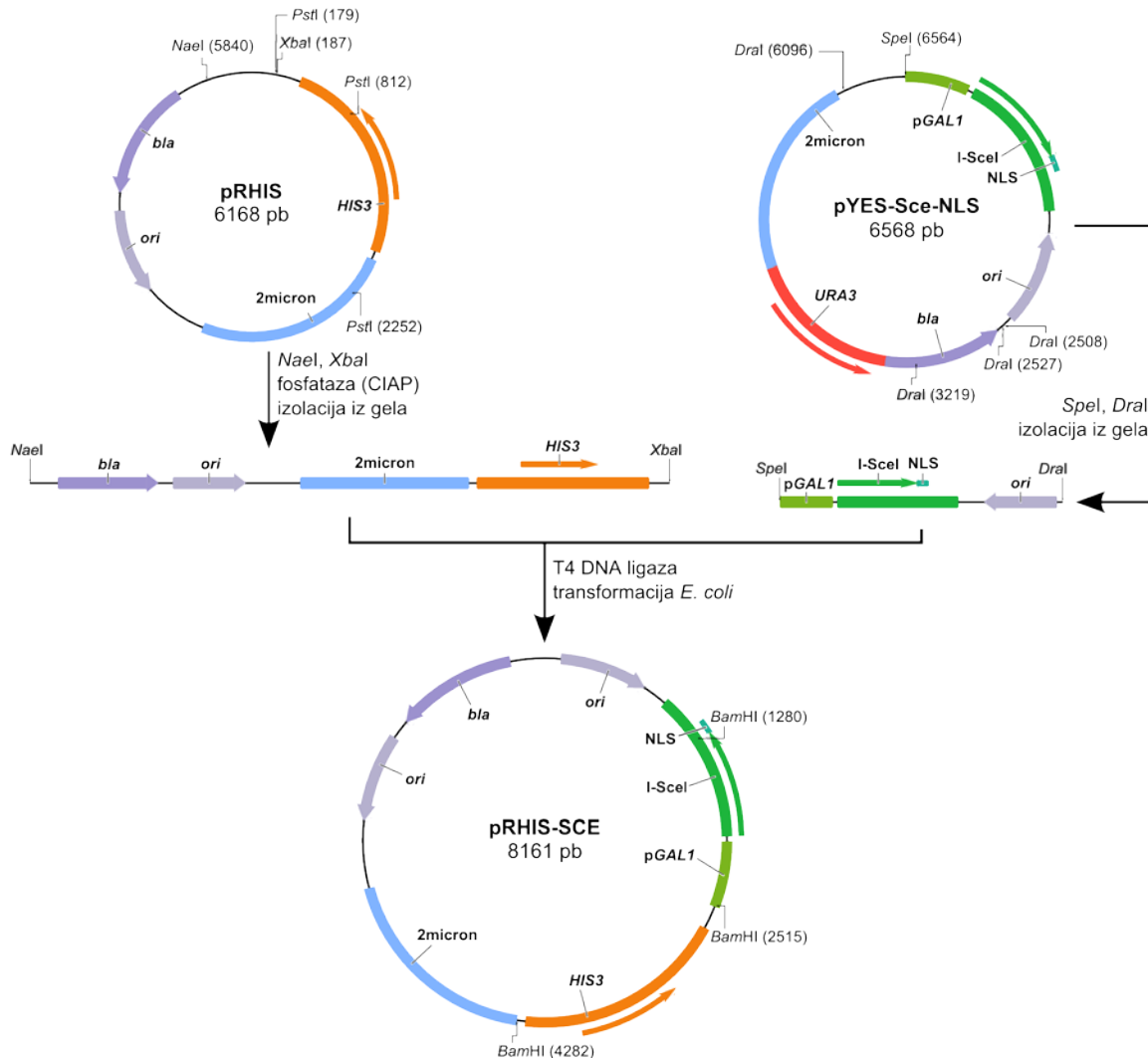
Slika 9. Postupak konstrukcije plazmida pRHIS. Prikazana su relevantna restrikcijska mjesta korištena pri konstrukciji i restrikcijskoj analizi konstruiranog plazmida. U daljnjem postupku korišten je samo plazmid pRHIS.



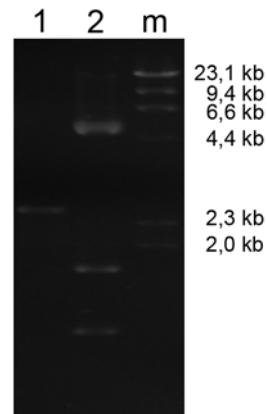
Slika 10. Provjera pojedinih postupaka tijekom konstrukcije plazmida pRHIS i restrikcijska analiza konstruiranog plazmida pRHIS. 1 – linearizirani plazmid pHis izoliran iz gela; 2 – plazmid pYES-Sce-NLS pocijepan pomoću *NheI* i *SspI*; 3 – fragment koji sadrži ishodište replikacije kvašćevog plazmida 2micron, nakon izolacije iz gela; 4 i 5 – plazmidi pRHIS i pRHISa pocijepani

pomoću *Pst*I; m – DNA bakteriofaga lambda pocijepana pomoću *Hind*III. Fragmenti označeni strelicama posljedica su ligacije fragmenata u dvjema međusobno različitim orijentacijama.

Rezultati prikazani na Slici 10 (uzorci 4 i 5) dokazuju uspješnost konstrukcije plazmida pRHIS i pRHISa. U daljnjem postupku konstrukcije korišten je plazmid pRHIS.



Slika 11. Konstrukcija plazmida pRHIS-SCE. Prikazana su restrikcijska mjesta relevantna za postupak konstrukcije i restrikcijske analize konstruiranog plazmida.



Slika 12. Provjera pojedinih postupaka i restrikcijska analiza konstruiranog plazmida pRHIS-SCE. 1 – fragment plazmida pYES-Sce-NLS koji sadrži gen za endonukleazu I-SceI pod kontrolom promotora pGAL1, nakon izolacije iz gela; 2 – konstruirani plazmid pRHIS-SCE pocijepan pomoću *Bam*HI; m – DNA bakteriofaga lambda pocijepana pomoću *Hind*III.

Rezultati restrikcijske analize (Slika 12, uzorak 2) dokazuju uspješnost konstrukcije plazmida pRHIS-SCE čija struktura je u skladu s mapom plazmida koja je prikazana i u poglavlju 3.1.2.

## 4.2. Konstrukcija eksperimentalnog sustava u kvascu

Osnovni eksperimentalni sustav korišten u ovom radu soj je kvasca BY-aLSUa-Sce koji je detaljno opisan u poglavlju 3.1.1.2. Kao polazni materijal za njegovu konstrukciju upotrijebljen je soj BY4742 te plazmidi pLUrg-Sce i pRHIS-SCE čija je konstrukcija opisana u poglavljima 4.1.1. i 4.1.2.

Postupak konstrukcije soja BY-aLSUa-Sce može se podijeliti u dva koraka: najprije je transformacijom soja BY4742 plazmidom pLUrg-Sce konstruiran soj BY-aLSUa, a potom je soj BY-aLSUa transformiran plazmidom pRHIS-SCE, što je rezultiralo konstrukcijom soja BY-aLSUa-Sce. Postupak konstrukcije soja BY-aLSUa prikazan je u poglavlju 4.2.1., a soja BY-aLSUa-Sce u poglavlju 4.2.2.

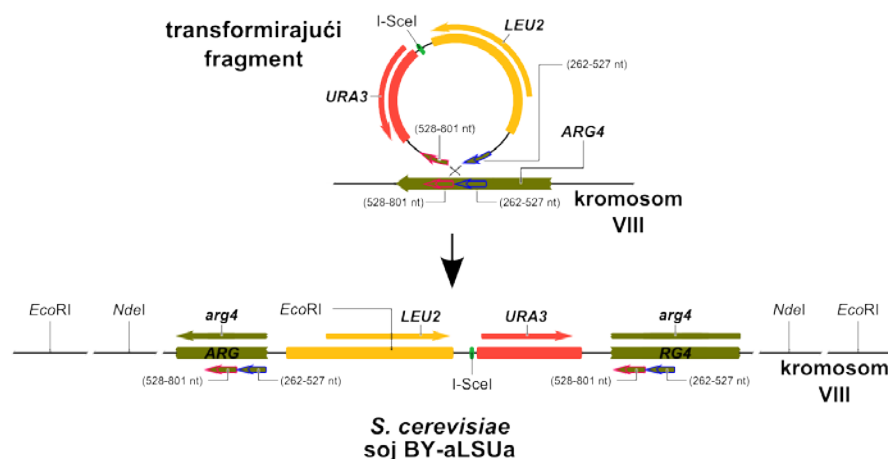
### 4.2.1. Soj BY-aLSUa

Soj BY-aLSUa konstruiran je transformacijom soja BY4742 za koju je najprije bilo potrebno pripremiti transformirajuću DNA koja će biti korištena. Nakon transformacije analizirani su dobiveni transformanti.



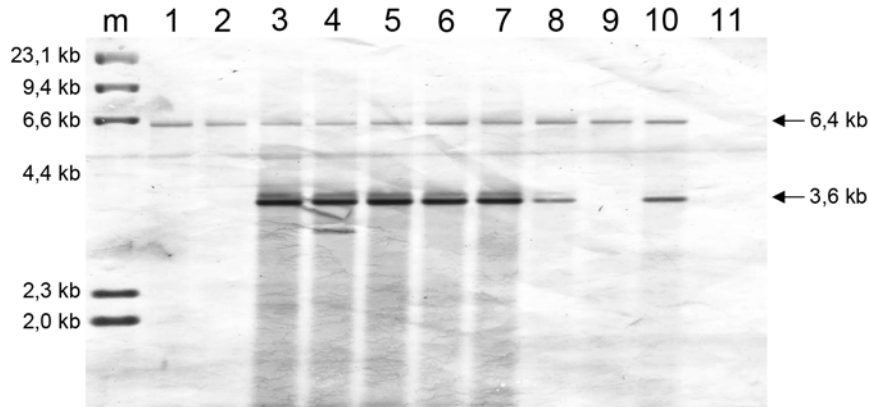
Transformirajuća DNA je fragment DNA nastao cijepanjem plazmida pLUrg-Sce endonukleazom *SacI*. Fragment sadrži gene *URA3* i *LEU2* te restrikcijsko mjesto za endonukleazu I-SceI (Slika 13). Osim toga, na krajevima ovog fragmenta nalaze se dva različita središnja dijela gena *ARG4*. Zahvaljujući tome, tijekom transformacije kvasca ovaj fragment ugrađuje se upravo u gen *ARG4* u kvaščevu genomu (Slika 13). Na ovaj način u genomu kvasca nastaju dvije inaktivne kopije gena *ARG4* (sekvencije *ARG* i *RG4*) između kojih se nalazi ostatak plazmidne DNA, odnosno nastaje struktura lokusa *ARG4* specifična za sojeve BY-aLSUa i BY-aLSUa-Sce (poglavlje 3.1.1.2.).

Transformanti kvasca (potencijalni sojevi BY-aLSUa) najprije su odabrani na temelju genotipa odnosno fenotipa jer je fenotip soja BY4742  $\text{Arg}^+\text{Leu}^-\text{Ura}^-$ , dok je soj BY-aLSUa fenotipa  $\text{Arg}^-\text{Leu}^+\text{Ura}^+$ . U svrhu konačnog odabira soja BY-aLSUa transformanti su podvrgnuti molekularnoj analizi metodom po Southernu (poglavlje 3.2.12.) pri čemu je DNA transformanata pocijepana pomoću *EcoRI*, a kao obilježena proba korištena je sekvencija *URA3*.



Slika 13. Ugradnja transformirajućeg fragmenta u lokus *ARG4*. Ciljana ugradnja transformirajućeg fragmenta u lokus *ARG4* na osmom kromosomu soja BY4742 rezultira specifičnom strukturom lokusa *ARG4* karakterističnog za soj BY-aLSUa i BY-aLSUa-Sce (detaljno opisan u poglavlju 3.1.1.2.).

Iz rezultata molekularne analize (Slika 14) vidi se da svi analizirani transformanti daju vrpce veličine 6,2 kb, što je u skladu sa strukturom lokusa *ARG4* u sojevima BY-aLSUa i BY-aLSUa-Sce (Slika 2). Vrpca veličine 3,6 kb posljedica je višestruke ugradnje transformirajuće DNA pa je u daljnjem postupku kao soj BY-aLSUa korišten transformant koji je dao samo vrpce veličine 6,4 kb.



Slika 14. Rezultati hibridizacije po Southernu provedene kako bi se potvrdila uspješna konstrukcija soja BY-aLSUa. 1 do 10 – analizirani transformanti; 11 – netransformirani soj (BY4742); m – DNA bakteriofaga lambda pocijepana pomoću *HindIII*.

#### 4.2.2. Soj BY-aLSUa-Sce

Soj BY-aLSUa-Sce konstruiran je transformacijom plazmidom pRHIS-SCE u kružnom obliku koji se u stanici kvasca može samostalno replicirati bez da se ugradi u kvašćev genom, a transformanti su selekcionirani na podlozi bez histidina zahvaljujući tome što se na plazmidu pRHIS-SCE nalazi gen *HIS3*.

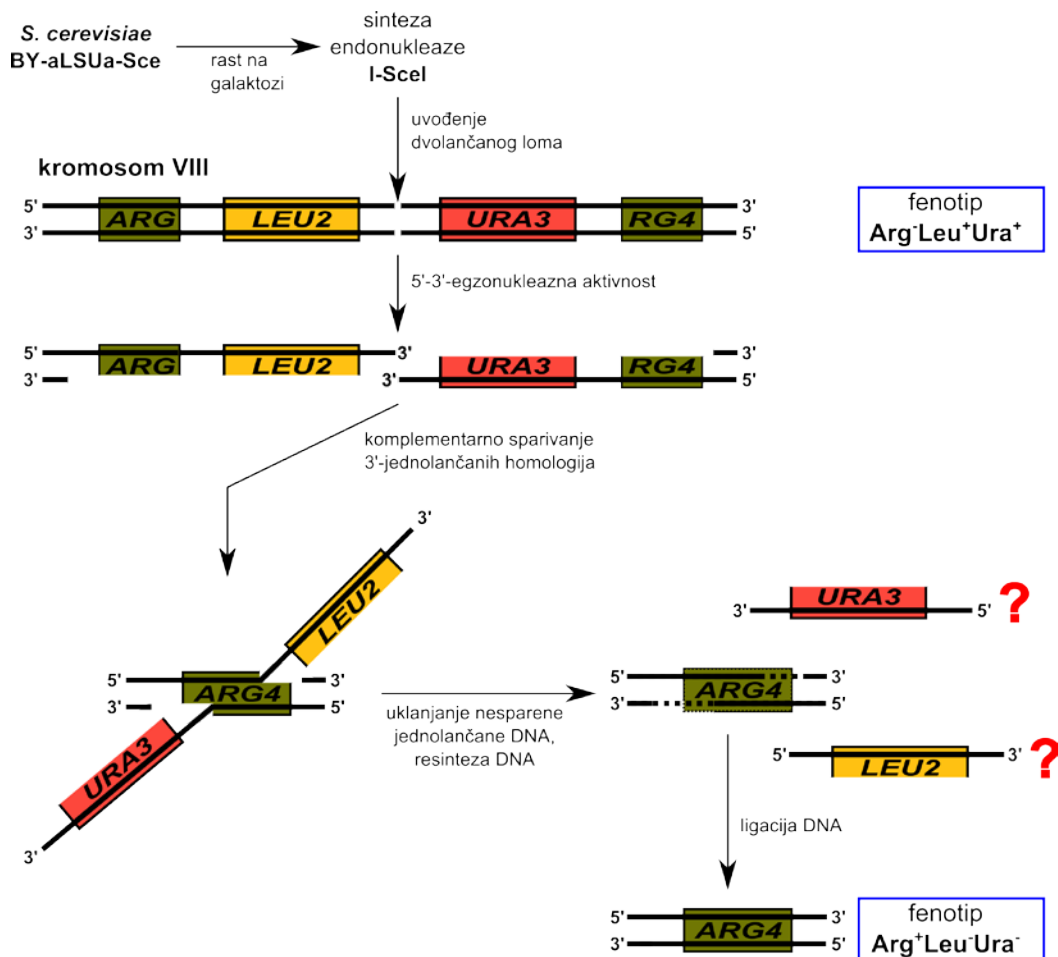
S ciljem da se ustanovi je li plazmid pRHIS-SCE u kvascu pretrpio neke promjene, cjelokupnom DNA soja BY-aLSUa-Sce transformirana je bakterija *E. coli* te je iz nje izolirana plazmidna DNA (plazmid pRHIS-SCE) koja je podvrgnuta restrikcijskoj analizi. Restrikcijskom analizom utvrđeno je da je plazmidna DNA u soju kvasca BY-aLSUa-Sce identična plazmidu pRHIS-SCE (rezultati nisu prikazani).

#### 4.3. Utjecaj popravka dvolančanog loma prema modelu SSA na stabilnost genoma kvasca

Popravak dvolančanog loma u molekuli DNA prema modelu SSA (*engl.* single strand annealing) objašnjen je u poglavlju 1. Ukratko, prema ovom modelu popravljaju se dvolančani lom nastao između dviju istosmjerno ponovljenih sekvencija. Rezultat popravka je gubitak cjelokupne DNA između ponovljenih sekvencija kao i jedne od ponovljenih sekvencija (Slika 1).

U ovom radu (poglavlja 4.1. i 4.2.) konstruiran je soj kvasca BY-aLSUa-Sce (detaljno opisan u poglavlju 3.1.1.2.) u kojemu je moguće inducirati i pratiti tijek popravka dvolančanog loma prema modelu SSA (Slika 15). Naime, rast na galaktozi inducira sintezu endonukleaze I-SceI (poglavlje 3.2.13.) koja uvodi dvolančani lom između sekvencija *LEU2* i *URA3*. Nastali krajevi

DNA procesiraju se 5'-3'-egzonukleaznom aktivnošću, čime nastaju dugački 3'-jednolančani krajevi koji se komplementarno sparuju u području gena *arg4* (između sekvencija *ARG* i *RG4*). Slijedi uklanjanje nesporene jednolančane DNA, resinteza preostalih jednolančanih praznina i ligacija preostalih jednolančanih lomova. Ovakav slijed događaja rezultira gubitkom gena *LEU2* i *URA3* te pojavom funkcionalnog gena *ARG4* pa soj kvasca mijenja fenotip iz  $\text{Arg}^- \text{Leu}^+ \text{Ura}^+$  u  $\text{Arg}^+ \text{Leu}^- \text{Ura}^-$  (Slika 15).



Slika 15. Indukcija i popravak dvolančanog loma prema modelu SSA u konstruiranom eksperimentalnom sustavu. Opis slike nalazi se u tekstu.

Zahvaljujući konstruiranom eksperimentalnom sustavu (Slika 15) moguće je na podlozi bez arginina selekcionirati stanice u kojima se dogodio SSA. Osim toga, kao što je navedeno u Tablici 3, na odgovarajućim podlogama moguće je selekcionirati i druge, rijetke ili neočekivane genetičke događaje koji mogu popratiti SSA.

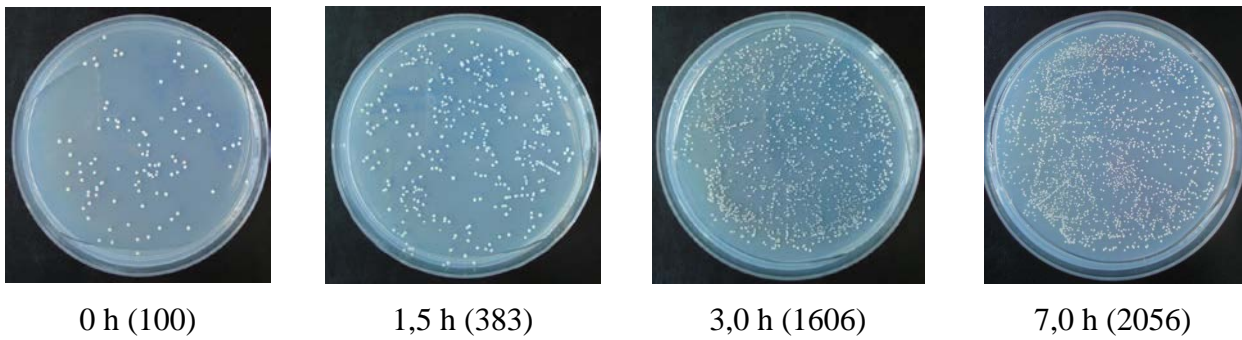
Tablica 3. Selekcionirani fenotipovi rekombinanata. Genotip i genetički događaj pretpostavljeni su na temelju fenotipa.

| Fenotip rekombinanata                              | Selektivna podloga                      | Pretpostavljeni genotip    | Pretpostavljeni genetički događaj                    |
|--|---|----------------------------|--|
| Arg <sup>+</sup>                                   | bez arginina                            | <i>ARG4</i>                | „pop-out“  |
| Arg <sup>+</sup> Leu <sup>+</sup> Ura <sup>+</sup> | bez arginina, leucina i uracila         | <i>ARG4/arg4 LEU2 URA3</i> | „pop-out“ uz duplikaciju kromosoma                   |
| Arg <sup>+</sup> Leu <sup>+</sup> Ura <sup>-</sup> | bez arginina i uracila uz dodatak 5-FOA | <i>ARG4 LEU2 Δura3</i>     | „pop-out“ uz ilegitimnu integraciju gena <i>LEU2</i> |

Indukcija ekspresije gena za endonukleazu I-SceI u soju BY-aLSUa-Sce opisana je u poglavlju 3.2.13. Uzorci su izuzimani u određenim vremenskim intervalima od početka indukcije i naciepljivani na odgovarajuće podloge (Tablica 3). Na taj način praćena je kinetika indukcije i popravka dvolančanog loma prema modelu SSA. Istovremeno je praćena pojava duplikacije kromosoma (poglavljje 4.3.1.) i ilegitimne integracije gena *LEU2* (poglavljje 4.3.2.). Odabrani rekombinanti podvrgnuti su molekularnoj analizi hibridizacijom po Southernu.

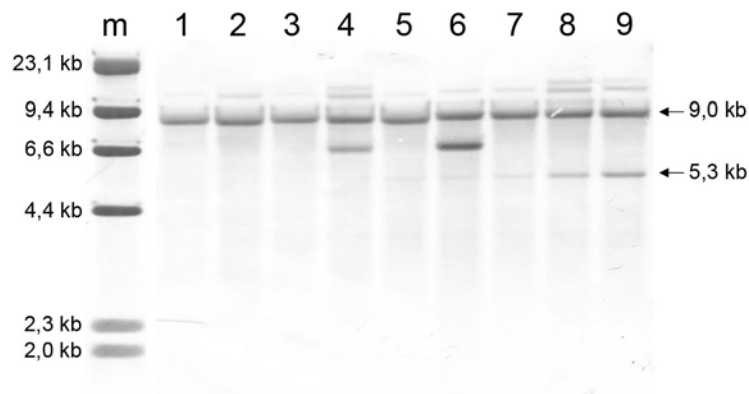
#### 4.3.1. Kinetika popravka dvolančanog loma prema modelu SSA i duplikacije kromosoma

Dvolančani lom između dviju istosmjerno ponovljenih sekvencija gotovo isključivo se popravljaju prema modelu SSA (Paques i Haber, 1999). Drugim riječima, broj stanica u kojima se dogodio SSA jednak je broju stanica u kojima je uveden dvolančani lom. Ova činjenica omogućava praćenje i kinetike indukcije i popravka dvolančanog loma na podlogama bez arginina. U tu svrhu 100 μL drugog decimalnog razrjeđenja uzoraka izuzetih u različitim vremenskim intervalima od početka indukcije naciepljeno je na podlogu bez arginina (Slika 16). Osim toga, 50μL četvrtog decimalnog razrjeđenja naciepljeno je na dvije kompletne podloge radi određivanja ukupnog broja stanica u uzorku. Iz Slike 16 vidljivo je da se broj stanica poraslih na podlozi bez arginina povećava produljenjem indukcije, što je ujedno i dokaz da u konstruiranom eksperimentalnom sustavu zaista dolazi do ekspresije gena za I-SceI, uvođenja dvolančanog loma u ciljano mjesto i njegovog popravka prema modelu SSA.



Slika 16. Kolonije porasle na podlozi bez arginina. Naznačeno je vrijeme indukcije. Unutar zagrada istaknut je broj poraslih kolonija.

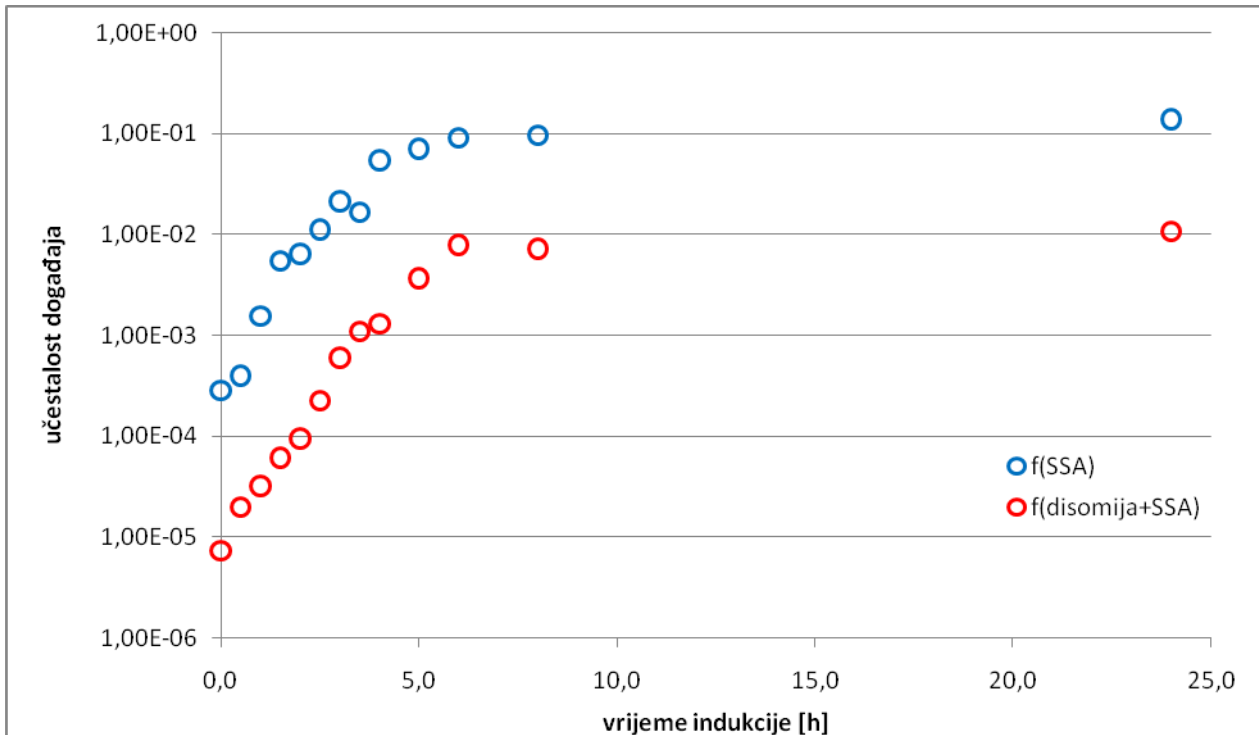
Kinetika popravka dvolančanog loma, odnosno pojave alela *ARG4*, praćena je i hibridizacijom DNA po Southernu (Slika 17). Iz dijela uzoraka izuzetih tijekom indukcije izolirana je genomna DNA koja je zatim pocijepana restriksijskom endonukleazom *NdeI*. Hibridizacija je provedena probom koja se komplementarno sparuje s alelima *arg4* i *ARG4*. Veličina detektiranog fragmenta DNA u soju BY-aLSUa iznosi 9,0 kb, a kao posljedica rekombinacije „pop-out“, kojom se rekonstituira gen *ARG4*, pojavljuje se fragment duljine 5,3 kb. Ovi rezultati u skladu su s restriksijskim mapama prikazanim na Slici 2.



Slika 17. Rezultati hibridizacije po Southernu provedene kako bi se pratila kinetika popravka dvolančanog loma rekombinacijom „pop-out“. Odgovarajuće restriksijske mape prikazane su na Slici 2. 1 – uzorak izuzet neposredno prije početka indukcije; uz preostale uzorke naznačeno je vrijeme trajanja indukcije: 2 – 0,5 h; 3 – 1,0 h; 4 – 1,5 h; 5 – 2,0 h; 6 – 3,0 h; 7 – 7,0 h; 8 – 24,0 h; 9 – 53,0 h; m – DNA bakteriofaga lambda pocijepana pomoću *HindIII*.

Rezultati molekularne analize (Slika 17) jasno pokazuju da s porastom vremena indukcije raste i udio stanica koje na osmom kromosomu imaju rekonstituirani gen *ARG4*. Udio stanica u kojima je dvolančani lom popravljen prema modelu SSA, u odnosu na ukupan broj stanica, ovisno o vremenu indukcije prikazan na Slici 18.

Osim na podloge bez arginina, 2 mL izuzetog uzorka naciijepljeno je i na podlogu koja ne sadrži ni arginin, ni leucin ni uracil. Prethodnim istraživanjima pokazano je da su prilikom spontane rekombinacije „pop-out“ na ovoj podlozi selekcionirani isključivo rekombinanti s duplikacijom osmog kromosoma (Žunar, 2009). Pritom jedna kopija kromosoma nosi funkcionalne gene *URA3* i *LEU2*, dok druga kopija nosi rekonstituiran funkcionalni gen *ARG4*, koji je nastao kao posljedica SSA. Kinetika pojave rekombinanata koji sadrže dva osma kromosoma (disomika za osmi kromosom) prikazana je na Slici 18.



Slika 18. Grafički prikaz kinetike pojave rekombinanata u ovisnosti o vremenu. Učestalost događaja (*engl.* frequency, *f*) izračunata je kao omjer broja selekcioniranih rekombinanata i ukupnog broja stanica.

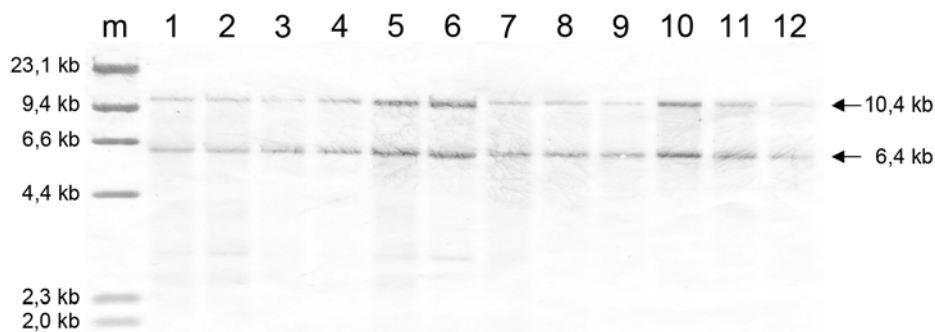
Iz prikazanih rezultata (Slika 18) vidljivo je da se maksimalni udio stanica u kojima se dogodio „pop-out“ (9%) postiže nakon 6 h indukcije. To je 1000 puta više nego što je zabilježeno u neinduciranim stanicama (Žunar, 2009).

Također, primjećuje se da je krivulja udjela stanica u kojima se dogodio „pop-out“ paralelna s krivuljom udjela stanica u kojima se dogodio SSA i duplikacija osmog kromosoma, ali i da je udio potonjih stanica oko 100 puta manji. Stoga se može zaključiti da je oko 1% rekombinacije „pop-out“ popraćeno duplikacijom kromosoma.

### 4.3.2. Rekombinacija „pop-out“ popraćena ugradnjom jednolančanog fragmenta *LEU2*

U skladu s modelom SSA u našem eksperimentalnom sustavu očekuje se oslobađanje jednolančanih fragmenata *URA3* i *LEU2* koji se, neovisno jedan o drugome, mogu ugraditi u genom kvasca. Takvi rekombinanti mogli bi se selekcionirati kao stanice čiji je fenotip ili  $\text{Arg}^+\text{Ura}^+$  ili  $\text{Arg}^+\text{Leu}^+$ . Međutim, tijekom prethodnih istraživanja (Žunar, 2009) ustanovljeno je da je fenotip svih selekcioniranih rekombinanata  $\text{Arg}^+\text{Leu}^+\text{Ura}^+$ . Molekularna analiza pokazala je da se radi o rekombinaciji „pop-out“ popraćenoj duplikacijom kromosoma. Stoga je za selekciju rekombinanata u kojima je nastupila ilegitimna rekombinacija fragmenta *LEU2* korištena podloga koja ne sadrži arginin i leucin, ali sadrži 5-fluoroorotičnu kiselinu (5-FOA) (podloga -arg-leu+FOA). Budući da je 5-FOA toksična za stanice koje imaju funkcionalni gen *URA3*, na ovoj podlozi mogu se selekcionirati isključivo stanice fenotipa  $\text{Arg}^+\text{Leu}^+\text{Ura}^-$ . U svrhu selekcije ovih rekombinanata, uzorci izuzimani tijekom indukcije naciepljeni su na podlogu -arg-leu+FOA. Osim toga, sve stanice iz preostalih 150 mL kulture nakon 24 h indukcije također su naciepljene na ovu podlogu, čime je selekcionirano 30 rekombinanata.

S ciljem da se ustanovi koji je genetički događaj odgovoran za pojavu selekcioniranih rekombinanata provedena je molekularna analiza metodom po Southernu pri čemu je DNA rekombinanata pocijepana endonukleazom *EcoRI*. Kao proba korišten je gen *LEU2* (Slika 19). U slučaju ilegitimne integracije gena *LEU2* veličina dvaju fragmenata na membrani bila bi nasumična i stoga različita u svakom rekombinantu. Međutim, svi rekombinanti dali su isti signal, identičan onome u kontrolnom soju BY-aLSUa.



Slika 19. Rezultati hibridizacije po Southernu provedene u svrhu analize rekombinanata selekcioniranih na podlozi -arg-leu+FOA. Veličina detektiranih fragmenata u kontrolnom soju BY-aLSUa iznosi 10,4 kb i 6,4 kb (Slika 2). 1 do 12 – analizirani rekombinanti; m – DNA bakteriofaga lambda pocijepana pomoću *HindIII*.

Rezultati molekularne analize (Slika 19) jasno pokazuju da gen *LEU2* nije ilegitimno integriran u genomu nego se zajedno s genom *URA3* nalazi na osmom kromosomu, u istoj poziciji kao u kontrolnom soju BY-aLSUa, iako je njegov fenotip  $\text{Arg}^+\text{Leu}^+\text{Ura}^-$ . Ova pojava može se objasniti duplikacijom osmog kromosoma uz koju je nastupila inaktivacija gena *URA3* spontanom mutacijom ili, vjerojatnije, uslijed gubitka dijela DNA tijekom nehomolognog spajanja krajeva DNA nastalih djelovanjem endonukleaze I-SceI.

Bitno je naglasiti da od ukupno  $2 \cdot 10^{10}$  stanica nacijepljenih na podlogu -arg-leu+FOA, od kojih je u  $2 \cdot 10^9$  stanica došlo do rekombinacije „pop-out“, nije pronađen nijedan rekombinant kod kojeg je uz „pop-out“ došlo i do ilegitimne integracije gena *LEU2*. Drugim riječima, učestalost tog događaja među stanicama do kojih dolazi do rekombinacije „pop-out“ manja je od  $5 \cdot 10^{-10}$  po stanici.

---



---

## **5. RASPRAVA**

---

---

Rekombinacija „pop-out“ intrakromosomska je homologna rekombinacija između dviju istosmjerno ponovljenih sekvencija koja rezultira gubitkom jedne od ponovljenih sekvencija i cjelokupne regije između njih. Pritom rezultati mnogih studija upućuju na zaključak da se spontana rekombinacija „pop-out“ događa kao rezultat dvolančanog loma koji se zatim popravljaju prema modelu SSA (model komplementarnog sparivanja jednolančanih krajeva, *engl.* single strand annealing). Ovaj model opisan je u Uvodu (poglavlje 1). Istraživanje ove vrste rekombinacije, odnosno popravka dvolančanog loma između dviju istosmjerno ponovljenih sekvencija, važno je i interesantno jer ovakvi događaji mogu biti odgovorni za gubitak dugačkih regija DNA u genomima svih organizama, pa i u genomu čovjeka (Hastings i sur., 2009).

Zanimljivo je da model SSA predviđa oslobađanje dviju jednolančanih molekula DNA čija sudbina u stanici do sada nije bila predmet istraživanja. Osim toga, poznato je da jednolančana DNA unesena u stanicu kvasca podliježe ilegitalnoj rekombinaciji (Gjuračić i Zgaga, 1996; Schiestl i sur., 1993), odnosno ima potencijal da se s podjednakom vjerojatnošću ugradi u bilo koje mjesto kvašćeva genoma. Stoga je osnovni cilj ovog rada bio istražiti ugrađuje li se jednolančana DNA koja nastaje kao produkt SSA u kvašćev genom. Ovo je važno znanstveno pitanje ne samo jer preispituje trenutno važeći model SSA nego i zato što bi ovakav proces mogao imati važnu ulogu u evoluciji eukariotskih genoma. Ilegitalna integracija jednolančane DNA potvrdila bi njeno oslobađanje djelovanjem endonukleazne aktivnosti proteinskog kompleksa Rad1-Rad10. Ovaj proces mogao bi biti odgovoran i za „skraćivanje“ genoma kvasca (Kellis i sur., 2004; Scannell i sur., 2007) nakon njegove duplikacije (*engl.* whole genome duplication, WGD).

Drugo važno znanstveno pitanje odnosi se na rezultate prethodnih istraživanja u Laboratoriju. Naime, ustanovljeno je da je približno 1% spontanih rekombinacijskih „pop-out“ događaja popraćeno duplikacijom kromosoma na kojem se dogodio „pop-out“ (Žunar, 2009). Stoga je bilo interesantno ustanoviti hoće li se ovaj omjer genetičkih događaja promijeniti ako se rekombinacija „pop-out“ inducira uvođenjem dvolančanog loma i tako potakne njegov popravak prema modelu SSA.

Za potrebe ovog rada konstruiran je eksperimentalni sustav, odnosno soj kvasca *S. cerevisiae* (BY-aLSUa-Sce; poglavlje 3.1.1.2.) u kojemu se SSA potiče uvođenjem dvolančanog loma pomoću endonukleaze I-SceI (Slika 15). Ovim procesom oslobađaju se dvije molekule jednolančane DNA od kojih jedna nosi informaciju za gen *LEU2*, a druga za gen *URA3*. Osim toga, popravak dvolančanog loma prema modelu SSA uzrokuje rekonstituciju gena *ARG4*. Zahvaljujući ovim genetičkim biljezima, na odgovarajućim hranjivim podlogama mogu se jednostavno selekcionirati pojedini genetički događaji (poglavlje 4.3.) i izračunati njihova učestalost.

---

---

Eksperiment je proveden tako da su uzorci stanica za analizu uzimani u određenim vremenskim intervalima, nakon indukcije sinteze endonukleaze I-SceI koja uvodi dvolančani lom. Uzeti uzorci stanica naciyepljeni su na odgovarajuće hranjive podloge da bi se selekcionirale stanice fenotipa koji je nastao kao rezultat određenog genetičkog događaja (Tablica 3).

Iz dobivenih rezultata prikazanih na Slici 18 vidi se da udio stanica u kojima se dogodio SSA (rekombinanti fenotipa Arg<sup>+</sup>) raste s vremenom indukcije i doseže maksimum od 9% oko šestog sata indukcije. Također se vidi da je krivulja udjela stanica u kojima se dogodio SSA paralelna s krivuljom udjela stanica u kojima se dogodio SSA i duplikacija osmog kromosoma, ali je udio potonjih stanica oko 100 puta manji (oko 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-3</sup> po stanici). Na temelju toga može se zaključiti da oko 1% SSA rezultira duplikacijom kromosoma na kojem se dogodio SSA.

Zabilježena učestalost stanica fenotipa Arg<sup>+</sup>Leu<sup>+</sup>Ura<sup>-</sup> vrlo je malena i iznosi manje od 2,3·10<sup>-9</sup> po stanici. Njihov fenotip sugerirao je da su one nastale ugradnjom jednolančanog *LEU2*-fragmenta nastalog kao posljedica SSA. Međutim, molekularna analiza ovih rekombinanata (Slika 19) pokazala je da oni ipak sadrže dva osma kromosoma. Pritom se na jednom od osmih kromosoma dogodila rekombinacija „pop-out“ te bi se očekivalo i da njihov fenotip bude Arg<sup>+</sup>Leu<sup>+</sup>Ura<sup>+</sup>. Ovi rezultati mogu se objasniti inaktivacijom gena *URA3* ili spontanom mutacijom ili kao posljedica mutagenog popravka dvolančanog loma nehomolognim spajanjem krajeva DNA.

Budući da ni u jednoj od 2·10<sup>9</sup> stanica u kojima se dogodio SSA nije zabilježena ilegitimna ugradnja jednolančanog *LEU2*-fragmenta, može se zaključiti da je učestalost pojave ovog događaja tijekom SSA, ako je on moguć, manja od 5·10<sup>-10</sup> po stanici. Ovi rezultati ukazuju na dvije mogućnosti. Moguće je da samo jedna jednolančana transformirajuća molekula DNA (ss*LEU*) koja nastaje tijekom SSA nije dovoljna da transformira stanicu kvasca. Naravno, moguće je i da je nastali fragment prekratak pa se inaktivira djelomičnom ili potpunom degradacijom. Druga je mogućnost da SSA ne uključuje odcjepljivanje jednolančane DNA ili da se ona odmah degradira.

U nastavku istraživanja na ovom području, u konstruiranom eksperimentalnom sustavu, pratit će se uspješnost popravaka dvolančanog loma prema modelu SSA i njegove posljedice u relevantnim mutantima. Bilo bi interesantno inaktivirati nukleaze eventualno odgovorne za degradaciju jednolančane DNA (Mimitou i Symington, 2011). To bi moglo povećati učestalost ugradnje jednolančane DNA (koja nastaje tijekom SSA) na detektabilnu razinu. Nadalje, bilo bi dobro modificirati eksperimentalni sustav na način da nastaju dulji jednolančani fragmenti.

Eksperimentalni sustav konstruiran u ovom radu i u budućnosti će se koristiti u istraživanju mehanizma modela SSA i evolucije kvašćeva genoma, ali ima i praktičnu primjenu. Naime, zbog visokog udjela stanica s duplikacijom kromosoma na kojem se inducira SSA, odnosno

---

rekombinacija „pop-out“, ovaj eksperimentalni sustav može se primijeniti za jednostavnu indukciju i konstrukciju disomičnih stanica za bilo koji željeni kromosom, što je interesantno ne samo u znanstvenim istraživanjima, nego i u industrijskoj biotehnologiji.

---

---

## **6. ZAKLJUČCI**

---

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Konstruiran je eksperimentalni sustav (soj kvasca *S. cerevisiae* BY-aLSUa-SCE) koji se može koristiti u istraživanju molekularnih mehanizama popravka dvolančanog loma mehanizmom komplementarnog sparivanja jednolančanih krajeva DNA (SSA, *engl.* single strand annealing).
  2. Vjerojatnost ugradnje jednolančanog fragmenta DNA koji nastaje tijekom SSA izražena po stanici u kojoj se dogodio SSA manja je od  $2,3 \cdot 10^{-9}$ .
  3. Učestalost duplikacije kromosoma raste s učestalosti rekombinacije „pop-out“ te je oko 1% do 9% rekombinacija „pop-out“ popraćeno duplikacijom kromosoma na kojem se dogodio „pop-out“.
  4. Eksperimentalni sustav razvijen u ovom radu može se prilagoditi za konstrukciju i održavanje sojeva kvasca koji sadrže dvije kopije željenog kromosoma.
-

---

## **7. ZAHVALE**

---

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. Ivanu-Krešimiru Svetecu koji mi je omogućio da sudjelujem u ovom znanstvenom radu. On me svojim savjetima i sudjelovanjem u raspravama podučio nepristranom kritičkom prosuđivanju činjenica te planiranju i provođenju eksperimenata. Zahvaljujem mu na velikom strpljenju i odgovorima na moja brojna pitanja, kao i na iznimnoj pomoći tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Posebno zahvaljujem i dipl. ing. Marini Miklenić na strpljenju kojim me podučila brojnim eksperimentalnim tehnikama i znanstvenom pristupu problemima, kao i na pomoći tijekom provedbe eksperimenata i pisanja rada.

Također zahvaljujem dipl. ing. Berislavu Lisniću i svim ostalim zaposlenicima Laboratorija na savjetima i prijateljskom raspoloženju.

---



---

## **8. POPIS LITERATURE**

---

- 
- 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.
- Bundock, P., Hooykaas, P. J. (1996) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15272-15275.
- Gjuračić, K., Zgaga, Z. (1996) Illegitimate integration of single-stranded DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **253**, 173-181.
- Gregorić, S. (2008) Utjecaj enzima I-SceI i Dnl4 na nastanak i stabilnost dvolančanog loma u DNA kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu.
- Grey, M., Brendel, M. (1995) Ten-minute electrotransformation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* **47**, 269-272.
- Hastings, P. J., Lupski, J. R., Rosenberg, S. M., Ira, G. (2009) Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* **10**, 551-564.
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., Liu, J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **44**, 113-139.
- Kellis, M., Birren, B. W., Lander, E. S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617-624.
- Lin, F. L., Sperle, K., Sternberg, N. (1984) Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol* **4**, 1020-1034.
- Mani, R. S., Chinnaiyan, A. M. (2010) Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat Rev Genet* **11**, 819-829.
- Mimitou, E. P., Symington, L. S. (2008) Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770-774.
- Mimitou, E. P., Symington, L. S. (2011) DNA end resection--unraveling the tail. *DNA Repair (Amst)* **10**, 344-348.
-

- 
- Paques, F., Haber, J. E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 349-404.
- Richard, G. F., Kerrest, A., Dujon, B. (2008) Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 686-727.
- Scannell, D. R., Butler, G., Wolfe, K. H. (2007) Yeast genome evolution--the origin of the species. *Yeast* **24**, 929-942.
- Schiestl, R. H., Dominska, M., Petes, T. D. (1993) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with nonhomologous DNA: illegitimate integration of transforming DNA into yeast chromosomes and in vivo ligation of transforming DNA to mitochondrial DNA sequences. *Mol Cell Biol* **13**, 2697-2705.
- Schiestl, R. H., Petes, T. D. (1991) Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7585-7589.
- Semon, M., Wolfe, K. H. (2007) Consequences of genome duplication. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 505-512.
- Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**, 3-41.
- Symington, L. S. (2002) Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 630-670.
- Štafa, A. (2009) Genetičke promjene tijekom zamjene gena u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
- Winston, F., Chumley, F., Fink, G. R. (1983) Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 211-228.
- Žunar, B. (2009) Duplikacija kromosoma kao rezultat pop-out rekombinacije. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu.
-

---

## **9. SAŽETAK**

---

---

Bojan Žunar

**MEĐUOVISNOST INTRAKROMOSOMSKE REKOMBINACIJE I DUPLIKACIJE  
KROMOSOMA U KVASCA *Saccharomyces cerevisiae***

Genomi svih složenih eukariota, uključujući i genom čovjeka, bogati su ponovljenim sljedovima nukleotida. Ovime je stabilnost genoma ugrožena budući da rekombinacija između dviju istosmjerno ponovljenih sekvencija na istom kromosomu može rezultirati gubitkom jedne ponovljene sekvencije i cjelokupne regije između njih. Ova vrsta homologne rekombinacije naziva se rekombinacija "pop-out". Ustanovljeno je da su gotovo svi "pop-out"-događaji potaknuti pojavom dvolančanog loma u DNA između dvije istosmjerno ponovljene sekvencije. Ovakav dvolančani lom popravljja se komplementarnim sparivanjem jednolančanih krajeva (SSA, engl. single strand annealing) i rezultira oslobađanjem dviju jednolančanih molekula DNA. Budući da jednolančana DNA ima velik potencijal za ilegimnu integraciju u kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, cilj ovog rada bio je odrediti vjerojatnost da se jednolančana DNA nastala tijekom SSA ugradi u genom kvasca. Zbog toga je konstruiran eksperimentalni sustav (soj kvasca *S. cerevisiae*) u kojem je SSA moguće potaknuti uvođenjem dvolančanog loma pomoću endonukleaze I-SceI. Međutim, iako je SSA induciran u približno  $2 \cdot 10^9$  stanica kvasca, nije zabilježen niti jedan rekombinant u kojemu je nastupila ugradnja jednolančane DNA. Ovaj rezultat upućuje na zaključak da je učestalost takvog događaja, izražena po broju stanica u kojima je nastupio SSA, manja od  $1/(2 \cdot 10^9)$ . U istom eksperimentalnom sustavu detektirana je duplikacija kromosoma, a njena učestalost proporcionalna je učestalosti rekombinacije "pop-out" pri čemu je 1 do 9% pop-out događaja popraćeno duplikacijom kromosoma. Ovi rezultati ističu mogućnost da SSA-mehanizam ima važnu ulogu u evoluciji eukariotskog genoma. Pored toga, eksperimentalni sustav razvijen za potrebe ovog rada može se primijeniti u konstrukciji i održavanju sojeva kvasca koji sadrže dvije kopije željenog kromosoma.

Ključne riječi: komplementarno sparivanje jednolančanih krajeva (SSA), popravak dvolančanog loma, duplikacija kromosoma, nestabilnost genoma, *Saccharomyces cerevisiae*.

---

---

## **10. SUMMARY**

---

Bojan Žunar

**INTERCONNECTION OF INTRACHROMOSOMAL RECOMBINATION AND WHOLE CHROMOSOME DUPLICATION IN YEAST *Saccharomyces cerevisiae***

Genomes of all higher eukaryotes, including human genome, are very rich in repetitive DNA. This poses a risk for the genome stability because recombination between two directly repeated sequences found on the same chromosome can result in a loss of the one repeated sequence and entire intervening region. This type of homologous recombination is known as pop-out recombination. It has been shown that almost all of the spontaneous pop-out events are triggered by the appearance of the double strand break (DSB) in the intervening DNA between the two directed repeats. Subsequently the DSB is repaired by single strand annealing (SSA) resulting in liberation of two single-strand DNA (ssDNA) fragments. Since ssDNA has great potential for illegitimate integration in *Saccharomyces cerevisiae* genome, the aim of this study was to determine integration expectancy of the ssDNA released during SSA. Therefore the yeast experimental system in which SSA can be induced by DSB introduced by I-SceI endonuclease was constructed and used. Although the SSA was induced in  $2 \cdot 10^9$  yeast cells the integration of ssDNA was not observed suggesting that expectancy of such event is less than  $1/(2 \cdot 10^9)$  per SSA recombinant. Interestingly, in the same experimental system the chromosome duplication was detected. Moreover, the chromosome duplication frequency was proportional to pop-out frequency and 1 to 9 % of pop-out events were associated with duplication of involved chromosome. These results point out the possible role of the SSA in the evolution of the eukaryotic genome.

In addition, experimental system developed for the purpose of this study can be used for construction and maintenance of the yeast strains featuring two copies of the targeted chromosome.

Key words: single strand annealing (SSA), double-strand break (DSB) repair, chromosome duplication, genome instability, *Saccharomyces cerevisiae*.

---

## Životopis

Rođen sam 1988. godine u Varaždinu. Osnovnu i srednju školu (opća gimnazija) pohađao sam u Ivancu gdje sam 2006. godine maturirao s odličnim uspjehom. Prehrambeno-biotehnološki fakultet upisao sam iste godine te u roku završio preddiplomski studij "Biotehnologija" s prosjekom ocjena 4,956, čime sam stekao akademski naziv sveučilišnog prvostupnika inženjera biotehnologije. Na prvoj godini diplomskog studija opredijelio sam se za smjer "Molekularna biotehnologija". Trenutno pohađam i diplomski studij Bioindustrijskih tehnika, dislocirani studij u suradnji sa Sveučilištem u Orleansu. Dobitnik sam Dekanove nagrade za najbolje rezultate ostvarene u svojoj generaciji tijekom studija Biotehnologije i Povelje dekana za ostvarene rezultate u svojoj generaciji na 1. godini diplomskog studija Molekularne biotehnologije. Prisustvovao sam na dvije međunarodne radionice: 1st International Symposium of Biotech Students (Zagreb, rujan, 2009) i 1st Axa Systems Biology of Aging Workshop (Pariz, listopad 2009). Aktivno se služim engleskim jezikom i član sam Hrvatske udruge genetičkih inženjera (HUGI).

---