

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Nikolina Gardlo

**PSEUDOPALINDROMI U DNA - UTJECAJ NA  
STABILNOST GENOMA KVASCA *Saccharomyces  
cerevisiae***

Zagreb, 2012.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo pod vodstvom prof. dr. sc. Ivana-Krešimira Sveteca i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011./2012.

## **POPIS KRATICA**

**5-FOA** – 5-fluoroorotična kiselina (*engl.* 5-fluoroorotic acid), koristi se za selekciju stanica kvasca koje nemaju aktivne gene *URA3* ili *URA5*

**bla** – gen za enzim β-laktamazu, odgovoran za rezistenciju bakterija na antibiotik ampicilin

**CYCI** – gen za citokrom c 1 (*engl.* Cytochrome c 1)

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina (*engl.* deoxyribonucleic acid)

**DSB** – dvolančani lom u molekuli DNA (*engl.* double-strand break)

**EDTA** – etilendiamintetraoctena kiselina (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid)

**kb** – kilobaza

**mRNA** – glasnička ribonukleinska kiselina (*engl.* messenger deoxyribonucleic acid)

**ori** – bakterijsko ishodište replikacije

**pb** – par baza

**PCR** – lančana reakcija polimerazom (*engl.* polymerase chain reaction)

**PEG** – polietilenglikol (*engl.* polyethylen glycol)

**SDS** – natrij-dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate)

**SCE** – sorbitol - natrijev citrat - EDTA (*engl.* sorbitol-sodium citrate-EDTA)

**STE** – SDS - Tris - EDTA

**SSC** – natrijev klorid - natrijev citrat (*engl.* sodium chloride – sodium citrate)

**TBE** – Tris - borna kiselina - EDTA (*engl.* Tris-borate-EDTA buffer)

**Tris** – 3-hidroksimetil-aminometan (*engl.* tris(hydroxymethyl)aminomethane)

**URA3** – gen koji kodira za enzim orotidin-5'-fosfat dekarboksilazu (jedan od enzima koji sudjeuju u biosintezi uracila)

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći i specifični ciljevi rada .....	3
3. Materijali i metode.....	5
3.1. Materijali.....	5
3.1.1. Mikroorganizmi.....	5
3.1.1.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i> .....	5
3.1.1.2. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
3.1.2. Plazmidi.....	7
3.1.3. Oligonukleotidi.....	7
3.1.4. Hranjive podloge i otopine .....	8
3.1.4.1. Podloge za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	8
3.1.4.2. Podloge za uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
3.1.4.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA .....	10
3.1.4.4. Otopine za gel-elektroforezu .....	12
3.1.4.5. Otopine za hibridizaciju DNA metodom po Southernu.....	12
3.1.4.6. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica.....	14
3.1.5. Kemikalije i enzimi .....	15
3.2. Metode .....	16
3.2.1. Izolacija plazmida iz velikog volumena bakterijske kulture .....	16
3.2.2. Izolacija genomske DNA iz kvasca <i>S. cerevisiae</i> .....	16
3.2.3. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom.....	17
3.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	17
3.2.5. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima .....	17
3.2.6. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR) .....	18
3.2.7. Metoda hibridizacije po Southernu .....	18

3.2.7.1.	Prijenos DNA na membranu.....	19
3.2.7.2.	Predhibridizacija i hibridizacija.....	19
3.2.7.3.	Posthibridizacijsko ispiranje.....	19
3.2.7.4.	Detekcija.....	19
3.2.8.	Transformacija kvasca metodom pomoću litij acetata.....	20
3.2.9.	Određivanje stope „pop-out“ rekombinacije.....	20
4.	Rezultati.....	22
4.1.	Eksperimentalni sustav.....	22
4.1.1.	Transformacija kvasca.....	22
4.1.2.	Molekularna analiza strukture lokusa <i>CYCI</i> .....	24
4.1.3.	Molekularna analiza pseudopalindroma u konstruiranim sojevima.....	25
4.2.	Rekombinogenost pseudopalindroma.....	29
5.	Rasprava.....	32
6.	Zaključci.....	35
7.	Zahvale.....	36
8.	Popis literature.....	37
9.	Sažetak.....	39
10.	Summary.....	40

# 1. Uvod

Ukupna količina DNA koja se nalazi unutar žive stanice organizirana je na točno određeni način i naziva se genom. Unutar genoma, osobito eukariotskih organizama, mogu se razlikovati pojedini informacijski, funkcionalni i strukturni elementi kao što su kodirajuća i nekodirajuća DNA, geni i regulatorne regije, eukromatin i heterokromatin, ili ishodišta replikacije, centromere i telomere. Pri tome, svi genomi sadrže takozvane ponovljene sekvencije (ponovljenu DNA), a to znači da se unutar genoma mogu nalaziti dvije ili više kopija jednog te istog slijeda nukleotida. S obzirom na njihov međusobni položaj razlikuju se raspršena i uzastopna (bliska) ponavljanja. Posebnu skupinu ponovljenih sekvencija čine bliska obrnuta ponavljanja a nazivaju se palindromi (ili savršeni palindromi) i pseudopalindromi (nesavršeni palindromi). Po definiciji, palindrom u molekuli DNA sastoji se od dva identična obrnuta ponavljanja između kojih se ne nalazi niti jedan par nukleotida. Za razliku od palindroma, obrnuta ponavljanja unutar pseudopalindroma ne moraju biti identična, a mogu biti i razdvojena s jednim ili više parova baza (pb) pri čemu se ova razdvajajuća DNA naziva razmaknica (*engl. spacer*).

Postojanje palindroma i pseudopalindroma u genomima ima veliki biološki značaj. Kratke palindrome duljine 4, 6 i 8 parova baza (pb) prepoznaju enzimi restrikcijsko-modifikacijskog sustava kojim se bakterije štite od bakteriofaga odnosno bakterijskih virusa (Bujnicki, 2001). Posebno je zanimljivo da dugački palindromi i pseudopalindromi imaju dva međusobno suprotstavljena utjecaja na živu stanicu. Naime, oni se često nalaze u promotorima, terminatorima i ishodištima replikacije te su nužni za funkcioniranje genoma i život stanice (Andersen i sur., 1992; Hiratsu i sur., 2000; Weller i sur., 1985). Međutim, također je ustanovljeno da dugački palindromi i pseudopalindromi predstavljaju i opasnost za stabilnost genetičkog materijala. Naime, ove sekvencije u molekuli DNA mogu tvoriti sekundarne strukture (struktura ukosnice i križne strukture). Takve strukture ometaju replikaciju DNA što može dovesti do proklizavanja replikacijske viljuške ili dvolančanog loma u molekuli DNA (Laech, 1994). Također, postoje eksperimentalni dokazi koji ukazuju na postojanje proteina koji specifično prepoznaje palindromsku križnu strukturu u DNA i cijepaju je uvodeći dvolančani lom. Dvolančani lom u DNA je izuzetno opasno oštećenje koje se nužno mora popraviti kako bi stanica preživjela. Popravak dvolančanog loma često uključuje preraspodijelu genetičkog materijala kao što su delecije i translokacije, a to može uzrokovati nepoželjnu promjenu u fenotipu, odnosno razvoj bolesti. Kod čovjeka je poznato nekoliko desetaka genetičkih bolesti uzrokovanih nestabilnošću genetičkog materijala uslijed prisutstva palindroma i

pseudopalindroma. Primjerice, Emanuel sindrom popraćen fizičkim malformacijama i mentalnom retardacijom uzrokovan je recipročnom translokacijom, odnosno rekombinacijom između dvaju pseudopalindroma na kromosomima 11 i 22 (Yosunukaya Fenerci i sur., 2007).

Zbog svega navedenog ne čudi da su palindromi i pseudopalindromi predmet mnogih znanstvenih istraživanja. Tako je ustanovljeno da rekombinogenost odnosno genetička nestabilnost palindroma raste s njegovom duljinom (Lisnić i sur., 2009). Osim toga, razvijeni su i računalni bioinformatički alati koji omogućuju pronalaženje savršenih palindroma u nekom genomu (Lisnić i sur., 2005). Poznato je da nestabilnost pseudopalindroma raste sa sličnošću i duljinom obrnutih ponavljanja, a opada s njihovom udaljenošću. Međutim, nije točno poznato koja je udaljenost između određenih obrnutih ponavljanja potrebna kako bi pseudopalindrom postao genetički stabilan, a upravo se tim važnim pitanjem bavi ovaj rad.

## 2. Opći i specifični ciljevi rada

Dugački palindromi i pseudopalindromi u molekuli DNA imaju važnu ulogu u odvijanju staničnih procesa jer se često nalaze u ishodištima replikacije, promotorima i terminatorima. Međutim, ove sekvencije istovremeno predstavljaju i opasnost za stabilnost genetičkog materijala. Zbog toga su palindromi i pseudopalindromi predmet mnogih znanstvenih istraživanja. U sklopu toga, u prethodnim istraživanjima konstruiran je eksperimentalni sustav u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* u kojem je provedeno sustavno istraživanje utjecaja duljine palindroma na njegovu rekombinogenost (Lisnić i sur., 2009), odnosno genetičku nestabilnost. Međutim, takvo sustavno istraživanje pseudopalindroma do sada još nije provedeno. Stoga je opći cilj ovoga rada započeti sustavno istraživanje rekombinogenosti pseudopalindroma u eukariotskom genomu.

Specifični cilj ovog rada je odrediti utjecaj duljine razmaknice na rekombinogenost pseudopalindroma, odnosno usporediti rekombinogenost palindroma i pseudopalindroma koji sadrže ista obrnuta ponavljanja. Konkretno, uspoređena je rekombinogenost palindroma ukupne duljine 126 parova baza (svako ponavljanje dugačko je 63 parova baza) sa rekombinogenošću pseudopalindroma koji sadrži ista obrnuta ponavljanja ali se između njih nalazi razmaknica duljine 4, 8 i 10 parova baza (pb). Također je ustanovljen i utjecaj razmaknice duljine 10 parova baza između dva obrnuta ponavljanja duljine 75 pb (ukupna duljina palindroma 150 pb).

U svrhu ostvarenja navedenih ciljeva, metodama genetičkog inženjerstva konstruiran je niz sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji na točno određenom mjestu u genomu sadrže odgovarajuće pseudopalindrome. Potom je rekombinogenost svakog pojedinog pseudopalindroma određena na temelju stope unutarkromosomske rekombinacije (rekombinacije „pop-out“). Naime, što je određeni pseudopalindrom nestabilniji, to češće nastaje dvolančani lom koji se u konstruiranim sojevima kvasca popravljiva rekombinacijom „pop-out“. Pri tome dolazi do gubitka pseudopalindroma, ali i gena *URA3*, te se takvi rekombinanti mogu selekcionirati na podlozi s 5-fluoroorotičnom kiselinom. Na temelju učestalosti gubitka gena *URA3* (rekombinacije „pop-out“) uz pomoć računalnog algoritma moguće je izračunati i stopu rekombinacije (vjerojatnost rekombinacije „pop-out“ po jednoj staničnoj diobi), što je direktna mjera za rekombinogenost pojedinih pseudopalindroma.

Ovaj rad je dio sustavnog istraživanja rekombinogenosti bliskih obrnutih ponavljanja (palindroma i pseudopalindroma), a dobiveni eksperimentalni podaci biti će iskorišteni za daljnji razvoj postojećeg računalnog programa za pronalaženje palindroma u sekvencioniranim



genomima (Lisnić i sur., 2005). Naime, ovi eksperimentalni podaci omogućit će da se svakom palindromu i pseudopalindromu u sekvencioniranim genomima, uključujući i ljudski genom, pridruži odgovarajući rizik za genetičku stabilnost, a to bi moglo otvoriti nove mogućnosti u istraživanju genetičkih poremećaja potaknutih bliskim obrnutim ponavljanjima u molekuli DNA.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Mikroorganizmi

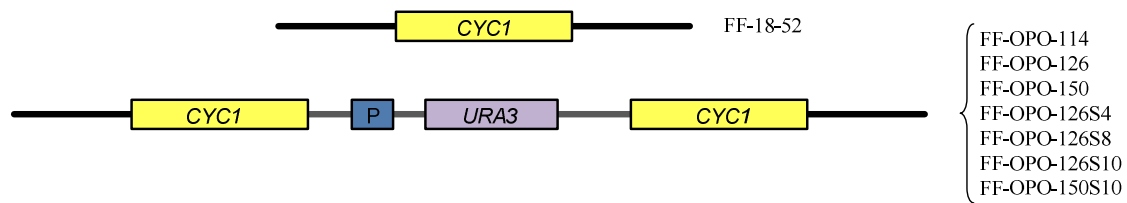
##### 3.1.1.1. Bakterija *Escherichia coli*

U svrhu umnažanja dvolančanih plazmida upotrijebljena je bakterija *E. coli* soj DH5 $\alpha$  genotipa *fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80  $\Delta$ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

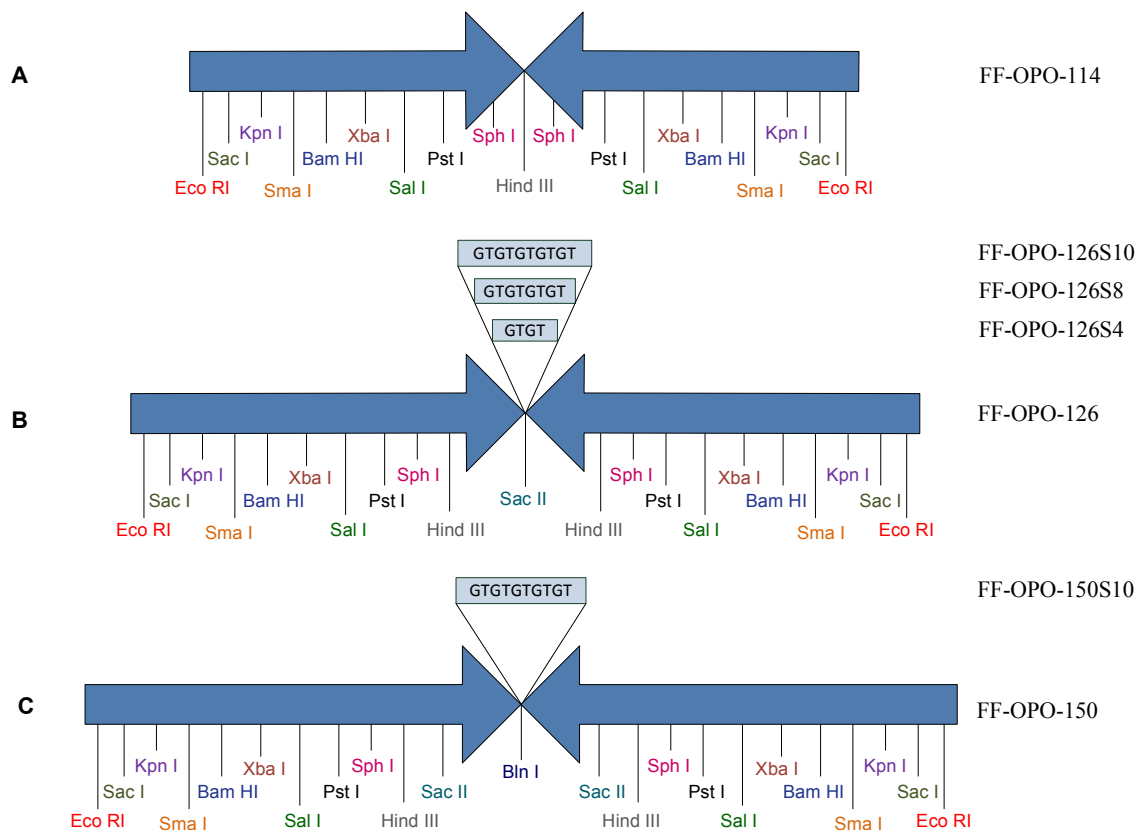
##### 3.1.1.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

U ovom radu korišteno je osam sojeva kvasca *S. cerevisiae*. Od toga su četiri soja prethodno konstruirana (FF-18-52, FF-OPO-114, FF-OPO-126 i FF-OPO-150), a četiri soja su konstruirana u ovom radu (FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8, FF-OPO-126S10 i FF-OPO-150S10). Postupak konstrukcije opisan je u poglavlju 4.1.

Soj kvasca FF-18-52 genotipa *MATa ade5 leu2-3,119 trp1-289 ura3-52 can<sup>R</sup>* bio je polazni soj za konstrukciju svih preostalih sojeva korištenih u ovom radu. Oni se od soja FF-18-52 razlikuju samo po strukturi lokusa *CYCI* na kromosomu 10 (slika 1A). Naime, oni sadrže dvije istosmjerno ponovljene regije gena *CYCI* između kojih se nalazi plazmidna DNA koja sadrži gen *URA3*, a u njegovoj blizini nalazi se odgovarajući palindrom (sojevi FF-OPO-114, FF-OPO-126 i FF-OPO-150) ili pseudopalindrom (sojevi FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8, FF-OPO-126S10 i FF-OPO-150S10). Kao što je vidljivo na slici 1B, ponavljanja unutar palindroma i pseudopalindroma sastoje se od niza mjesta koja prepoznaju restriksijske endonukleaze i koja su i korištena prilikom restriksijske analize pseudopalindroma u konstruiranim sojevima.



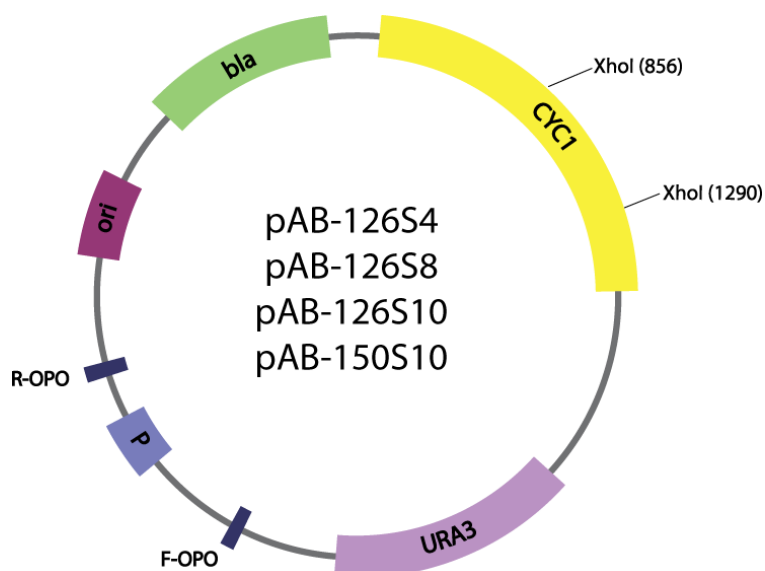
**Slika 1A.** Struktura lokusa *CYC1* na kromosomu 10 sojeva kvasca korištenih u ovom radu. Plavi kvadrat predstavlja položaj u kojem se nalazi pojedini palindrom ili pseudopalindrom. Pored svake strukture lokusa *CYC1* navedeno je i odgovarajuće ime kvaševog soja.



**Slika 1B.** Palindromi i pseudopalindromi u sojevima kvasca korištenim u ovom radu. Ponavljanja unutar palindroma i pseudopalindroma se sastoje od mjesta koja prepoznaju restrikcijske endonukleaze, a pseudopalindromi sadrže i razmaknicu između ponavljanja. Prikazani su: palindrom duljine 114 pb (obrnuta ponavljanja duga 57 pb; **A**), palindrom duljine 126 pb (ponavljanja duga 63 pb), te pseudopalindromi sa istom duljinom ponavljanja i razmaknicama od 4, 8 i 10 pb (**B**), te palindrom duljine 150 pb (ponavljanja duga 75 pb), i pseudopalindrom sa istom duljinom ponavljanja i razmaknicom duljine 10 pb (**C**).

### 3.1.2. Plazmidi

U ovom su radu korišteni plazmidi pAB-126S4, pAB-126S8, pAB-126S10 i pAB-150S10 (slika 2). Svi plazmidi sadrže kvaščeve gene *URA3* i *CYC1* te sadrže ishodište replikacije (*ori*) koje omogućuje njihovo umnožavanje u bakteriji *E. coli*. Bakterije transformirane plazmidom rezistentne su na antibiotik ampicilin budući da plazmid sadrži gen koji kodira za  $\beta$ -laktamazu (*bla*). Plazmidi se međusobno razlikuju samo u pseudopalindromima koji se na njima nalaze. Na plazmidima pAB-126S4, pAB-126S8 i pAB-126S10 nalaze se pseudopalindromi koji sadrže obrnuta ponavljanja duga 63 pb sa razmaknicama od četiri, osam, odnosno od deset parova baza, dok se u plazmidu pAB-150S10 nalazi pseudopalindrom koji sadrži obrnuta ponavljanja duga 75 pb sa razmaknicom od 10 pb. Struktura pojedinih pseudopalindroma prikazana je na slici 1B.



**Slika 2.** Plazmidi pAB-126S4 (6636 pb), pAB-126S8 (6640 pb), pAB-126S10 (6642 pb) i pAB-150S10 (6656 pb). Prikazana su restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad (mjesta koja prepoznaje restrikcijska endonukleaza *XhoI*), te mjesta komplementarnog sparivanja početnica R-OPO i F-OPO. Plazmidi se međusobno razlikuju samo u pseudopalindromima (plavi kvadrat označen sa P) čija je detaljna struktura prikazana na slici 1B.

### 3.1.3. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi F-OPO i R-OPO korišteni su kao početnice za lančanu reakciju polimeraze (poglavlje 3.2.6) kojom je umnožen dio DNA koji sadrži pseudopalindrome u sojevima kvasca FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8, FF-OPO-126S10 i FF-OPO-150S10 kako bi se pseudopalindromi mogli podvrgnuti restrikcijskoj analizi. Početnice su nabavljene kod *Sigma Aldrich*, Njemačka.

**Tablica 1.** Korišteni oligonukleotidi i njihov redosljed nukleotida.

Oligonukleotid	Redosljed nukleotida u smjeru 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)
F-OPO	GGTCCCGCCGCATCCATACCG	72,9
R-OPO	TTGGCGGGTGTCTGGGGCGCAGC	77,3

### 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 ako 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.

#### 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 korištena je podloga bez uracila. Hranjiva podloga komplementira se dodatkom 8,3 mL uracila u jednu litru hranjive podloge. Sterilna koncentrirana otopina uracila priprema se u koncentraciji 2,4 g/L.

Podloga s 5-fluoroorotičnom kiselinom

yeast nitrogen base (bez aminokiselina i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	1,7 g/L
amonijev sulfat	5,0 g/L
glukoza	20 g/L
„drop-out powder“ + 2.4 g uracila	7,25 g/L
5-fluoroorotična kiselina (5-FOA)	0,75 g/L
agar	20 g/L

5-FOA je termolabilna, te se ne smije autoklavirati niti dodavati u hranjivu podlogu topliju od 55°C.

### 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 podesi 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 podese 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.



### 3.1.4.4. 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.

### 3.1.4.5. 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 („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). Pripremljena otopina dobro se promiješa i spremi na -20°C. Neposredno prije korištenja proba se odledi, zagrije do vrenja i inkubira u tim uvjetima 10 min, nakon čega se brzo ohladi u ledu.

Pufer 1

Tris-HCl (0,10 M; pH 7,5)  
NaCl (0,15M)

**Pufer 2:**

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

**Pufer 3:**

Tris-HCl (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)

**3.1.4.6. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica****Litij acetat (1M)**

10,2 g litij acetata dihidrata otopi se u 100 mL destilirane vode, te se sterilizira.

**PEG 3350 (50 w/v)**

50 g PEG-a 3550 otopi se u 100 mL destilirane vode, te se sterilizira.

**Smjesa za transformaciju**

PEG (50w/v) 240  $\mu$ L

litij acetat 36  $\mu$ L

sterilna destilirana voda 50  $\mu$ L

### 3.1.5. Kemikalije i enzimi

Agaroz:	<i>Appligene</i> , Strassbourg.
Apsolutni etanol:	<i>Novokem</i> , Zagreb.
DNA bakteriofaga lambda:	<i>New England Biolabs</i> , Beverly.
EDTA:	<i>Kemika</i> , Zagreb.
Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA:	<i>New England Biolabs</i> , Beverly, <i>Boehringer Mannheim GmbH</i> , Mannheim, <i>Amersham Biosciences</i> , San Francisco.
Etidijev bromid:	<i>Boehringer Mannheim GmbH</i> , Mannheim.
Izopropanol:	<i>Alkaloid</i> , Skopje.
Sastojci hranjivih podloga:	<i>Difco</i> , Detroit <i>Merck</i> , Darmstadt. <i>Sigma Chemical Co.</i> , St. Louis.
Komplet kemikalija za izolaciju DNA iz gela:	<i>QIAGEN</i> , Hilden.
Komplet kemikalija za hibridizaciju DNA metodom po Southernu:	<i>Boehringer Mannheim GmbH</i> , Mannheim.
PEG:	<i>Appligene</i> , Strasbourg.
Ribonukleaza A:	<i>Sigma Chemical Co.</i> , St. Louis.
Tris: Tris Ultra Pure	<i>Sigma Chemical Co.</i> , St. Louis.
Zimoliza (Zymolyaze 100-T i 20-T):	<i>Seikugaku Kogyo Co.</i> , Tokyo.
Kemikalije za pripremu ostalih otopina:	<i>Sigma Chemical Co.</i> , St. Louis, <i>Kemika</i> , Zagreb, <i>Alkaloid</i> , Skopje.

## 3.2. Metode

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

Bakterija *E. coli* uzgojena preko noći u 500 mL tekuće hranjive podloge centrifugira se 10 minuta na 5000 okretaja/min, te se talog resuspendira u 10 mL GTE pufera. Zatim se doda 20 mL svježeg pripremljenog NaOH/SDS (0,2 M), promiješa se okretanjem i inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, doda se 15 mL natrijevog acetata (3 M), inkubira 20 minuta pri -20°C te centrifugira 30 minuta na 13000 okretaja/min. Supernatant se prebaci u novu kivetu i ponovno centrifugira pri istim uvjetima, prelije se u novu kivetu, odredi mu se volumen i pomiješa sa 0,6 volumena izopropanola. Nakon inkubacije (15 minuta pri sobnoj temperaturi), centrifugira se 20 minuta na 15000 okretaja/min., te se supernatant odbaci, a talog osuši i zatim otopi u TE puferu (pH 8). Zatim se provede postupak taloženja DNA amonijevim acetatom i etanolom.

### 3.2.2. 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 pri 3000 okretaja/min, isperu dva puta u vodi, a zatim i u otopini SCE. Nakon toga se resuspendiraju u 180 µL otopine SCE. Doda se 20 µL enzima zimolijaze, nakon čega se suspenzija inkubira 1 h/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). Otopina se inkubira u ledu najmanje 2 sata ili preko noći. Slijedi centrifugiranje 20 min/12000 min<sup>-1</sup>/4°C. Supernatantu volumena 970 µL doda se 630 µL izopropanola, otopina se promiješa i centrifugira 20 min/12000 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.

### 3.2.3. 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. Centrifugira se 20 min pri  $11000 \text{ min}^{-1}$  na  $4^\circ\text{C}$ . Osušeni talog se otopi u 50  $\mu\text{L}$  sterilne deionizirane vode ili TE pufera, nakon čega se otopina DNA inkubira 20 min/ $70^\circ\text{C}$ .

### 3.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Otopljen agarozni gel ohlađen na oko  $50^\circ\text{C}$  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 filter. Gel-elektroforeza provodila se u elektroforetskim kadicama proizvođača *BioRad*, Hercules.

### 3.2.5. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

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

### 3.2.6. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

*In vitro* amplifikacija željenih sekvenci DNA provedena je metodom koju su predložili Mullis i sur (1986.). Za reakciju su potrebne dvije oligonukleotidne početnice komplementarne krajevima fragmenta DNA koji se umnožava, deoksiribonukleozid-fosfati (dATP, sGTP, dCTP, dTTP) u jednakim koncentracijama, termorezistentna DNA polimeraza (Taq DNA polimeraza) i odgovarajući pufer. Prije dodavanja DNA polimeraze, kalup DNA se denaturira 5min/94°C. Reakcija sinteze ponavlja se 30 puta, a jedan ciklus sinteze sastoji se od tri koraka:

- 1) Denaturacija kalupa DNA (94°C)
- 2) Sparivanje početnica s kalupom (40-60°C)
- 3) Sinteza DNA (72°C)

Temperatura sparivanja početnica ovisi o njihovoj duljini i o udjelu pojedinih baza. Za amplifikaciju regije koja sadrži pseudopalindrome u sojevima kvasca FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8 i FF-OPO-150S10, te u kontrolnim sojevima FF-OPO-114, FF-OPO-126 i FF-OPO-150 korištene su početnice F-OPO i R-OPO navedene u poglavlju 3.1.3. Denaturacija kalupa DNA u pojedinom ciklusu trajala je 30 sekundi, sparivanje početnica s kalupom odvijalo se 15sec/64°C, a sinteza DNA u pojedinom ciklusu trajala je 30 sekundi. U zadnjem ciklusu reakcije, sinteza DNA se odvijala 10 minuta. Reakcija umnožavanja DNA fragmenta provedena je u uređaju *Mastercycler personal*, proizvođača *Eppendorf*.

### 3.2.7. Metoda hibridizacije po Southernu

Hibridizacija DNA metodom po Southernu provedena je korištenjem kompleta kemikalija za neradioaktivno obilježavanje i otkrivanje homologne DNA prema uputama proizvođača 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 digoksigeninom 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.

#### **3.2.7.1. Prijenos DNA na membranu**

Nakon provedene gel-elektroforeze i vizualizacije DNA u otopini etidij-bromida, agarozni gel inkubira se 20 min u otopini HCl (0,25 M). Slijedi kratko ispiranje u destiliranoj vodi i inkubacija u otopini NaOH/amonijev acetat u trajanju oko 20 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.

#### **3.2.7.2. Predhibridizacija i hibridizacija**

Prehibridizacija 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 prehibridizaciju. 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 prehibridizacije. Volumen otopine za hibridizaciju iznosi 10 - 20% korištenog volumena otopine za prehibridizaciju.

#### **3.2.7.3. Posthibridizacijsko ispiranje**

Nakon završene hibridizacije membrana se dva puta ispere s po 50 mL otopine A pri sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min, uz lagano protresanje, a zatim još dva puta po 15 min s po 25 mL otopine B pri temperaturi od 68°C.

#### **3.2.7.4. Detekcija**

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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  X-fosfata (5-brom-4-klor-indolil-fosfat) i 45  $\mu\text{L}$  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.

### 3.2.8. Transformacija kvasca metodom pomoću litij acetata

Za transformaciju kvasca korištena je metoda pomoću litij acetata koju su opisali Gietz i Schiestl (2007), ali bez dodavanja „carrier“ DNA. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* uzgaja se do gustoće stanica  $2\text{-}3 \times 10^7$  st/mL. 100 mL kulture se zatim centrifugira 5 minuta na 3000 okretaja/min pri sobnoj temperaturi. Talog se ispere u vodi i zatim resuspendira u 1 mL vode i centrifugira 5 min/3000min<sup>-1</sup>. Supernatant se ukloni, a talog se resuspendira u vodi tako da ukupni volumen bude 1 mL. Dobivena suspenzija se razdjeli u nove Eppendorf mikrotube, po 100  $\mu\text{L}$  u svaku nakon čega se centrifugira 5 min/3000min<sup>-1</sup>. Supernatant se ukloni, a na pelet stanica se doda 34  $\mu\text{L}$  plazmidne DNA i 326  $\mu\text{L}$  smjese za transformaciju (poglavlje 3.1.4.6). Sve zajedno se dobro vorteksira i inkubira 40 min na 42°C. Nakon završene inkubacije centrifugira se 5 min pri 3000 okretaja/min. Supernatant se ukloni, a pelet stanica se resuspendira u 150  $\mu\text{L}$  vode i nacijepi na dvije odgovarajuće selektivne podloge.

### 3.2.9. Određivanje stope „pop-out“ rekombinacije

Odabrani soj kvasca nacijepi se u 2 mL filtrirane kemijski definirane podloge bez uracila i inkubira na tresilici pri 175 rpm 48 sati na 28°C. Nakon inkubacije iz ove suspenzije pripremi se četvrto decimalno razrjeđenje u filtriranoj kompletnoj kemijski definiranoj podlozi. 20 pojedinačnih kultura četvrtog decimalnog razrjeđenja volumena 25  $\mu\text{L}$  stavi se u Eppendorf mikrotube te se inkubiraju 48 sati na 28°C pri 175 rpm. Radi određivanja ukupnog broja stanica u predkulturi, sa istim volumenom nacijepi se i šest kompletnih krutih hranjivih podloga, a radi kontrole broja stanica u kojima se dogodila rekombinacija „pop-out“ u predkulturi nacijepe se dvije 5-FOA ploče. Kad je inkubacija završena, svakoj zasebnoj suspenziji stanica doda se 975  $\mu\text{L}$  filtrirane kompletne kemijski definirane podloge. Po 1/20 ili 1/10 volumena 15 zasebnih

kultura nacjepi se na 5-FOA ploče radi određivanja broja kvašćevih stanica koje su izgubile gen *URA3* zbog „pop-out“ rekombinacije. Od preostalih 5 kultura pripremi se treće decimalno razrjeđenje te se po 50  $\mu$ L svake kulture nacijepi na 5 kompletnih krutih hranjivih podloga radi određivanja ukupnog broja živih stanica.

Nakon prebrojavanja kolonija stopa „pop-out“ rekombinacije, te odgovarajući 99%-tni intervali pouzdanosti izračunaju se metodom najveće vjerojatnosti (Lea i Culson, 1949) koristeći paket za statističku analizu rezultata testa fluktuacije Salvador (Zheng, 2005).

## 4. Rezultati

Tema istraživanja provedenog u ovom radu je genetička nestabilnost, odnosno rekombinogenost pseudopalindroma u molekuli DNA. Kao modelni organizam korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, a eksperimentalni pristup osnivao se na određivanju (mjerenju) genetičke nestabilnosti, odnosno učestalosti rekombinacije u definiranom biološkom sustavu. Stoga je u ovom radu konstruiran eksperimentalni sustav (poglavlje 4.1.), odnosno niz sojeva kvasaca *S. cerevisiae* koji na točno određenom mjestu u genomu sadrže odgovarajuće pseudopalindrome. Postupak konstrukcije eksperimentalnih sojeva obuhvaćao je transformaciju ishodnog soja odgovarajućim plazmidima i detaljnu molekularnu analizu dobivenih transformanata, a u svrhu određivanja rekombinogenosti pseudopalindroma, svi konstruirani sojevi podvrgnuti su testu genetičke stabilnosti (poglavlje 4.2.)

### 4.1. Eksperimentalni sustav

Eksperimentalni sustav osniva se na sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (poglavlje 3.1.1.2.) koji omogućavaju precizno, a istovremeno relativno brzo i jednostavno određivanje rekombinogenosti palindroma i pseudopalindroma u eukariotskom genomu. Primjena ovog eksperimentalnog sustava u svrhu određivanja rekombinogenosti pseudopalindroma prikazana je u poglavlju 4.2.

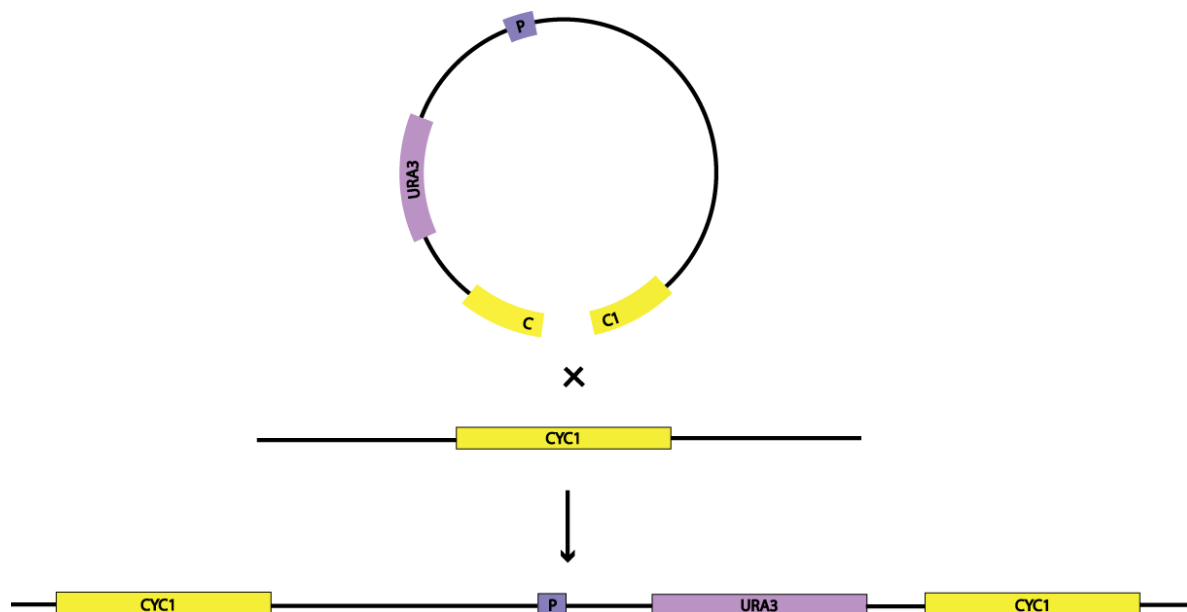
U ovom radu, metodama genetičkog inženjerstva, konstruirana su četiri soja kvasca koji sadrže pseudopalindrome (slika 1), a to obuhvaća transformaciju ishodnog soja kvasca odgovarajućim plazmidima (opisano u poglavlju 4.1.1.) i detaljnu molekularnu analizu transformanata u svrhu odabira i potvrde konstrukcije odgovarajućeg soja (poglavlje 4.1.2.).

#### 4.1.1. Transformacija kvasca

U ovom radu konstruirana su četiri soja kvasca i to FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8, FF-OPO-126S10 i FF-OPO-150S10 koji su detaljno opisani u poglavlju 3.1.1.2., a karakterizira ih struktura lokusa *CYCI* prikazana na slici 1. Naime sojevi FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8 i FF-OPO-126S10 sadrže pseudopalindrome sa obrnutim ponavljanjima dužine 63 pb između

kojih se nalazi razmaknica duga 4, 8 i 10 pb, dok soj FF-OPO-150S10 sadrži pseudopalindrom sa obrnutim ponavljanjima dužine 75 pb između kojih se nalazi razmaknica duga 10 pb.

Prvi korak u konstrukciji navedenih sojeva je transformacija ishodnog soja kvasca FF-18-52 odgovarajućim plazmidima (pAB-126S4, pAB-126S8, pAB-126S10 i pAB-150S10) opisanim u poglavlju 3.1.2. i prikazanim na slici 2. Ovi plazmidi, prije transformacije pocijepani su restriksijskom endonukleazom *XhoI* čime se stimulira njihova ugradnja u lokus *CYC1* (slika 3). Ovakvom ciljanom ugradnjom plazmida nastaje struktura lokusa *CYC1* koja je prikazana na slici 1 (poglavlje 3.1.1.2.).

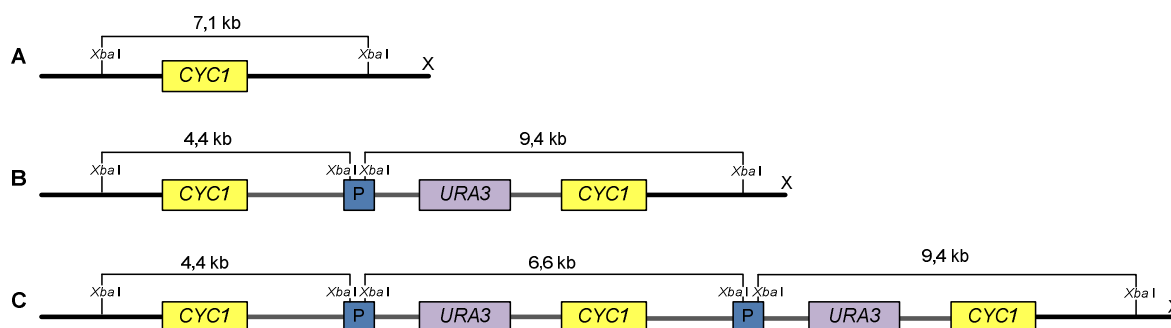


**Slika 3.** Ciljana ugradnja plazmida u kvaščev genom pri čemu nastaje željena struktura lokusa *CYC1*. Plavi kvadrat označen sa P predstavlja položaj na kojem se nalazi pseudopalindrom.

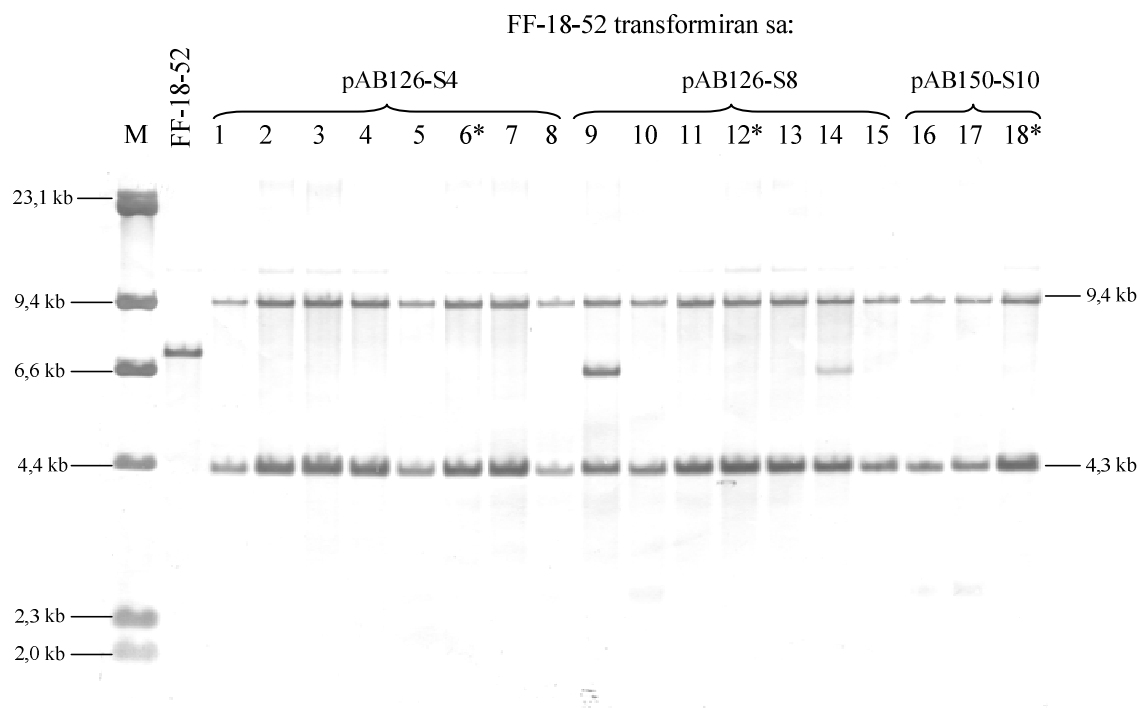
Budući da ishodni soj kvasca (FF-18-52) ne sadrži funkcionalni gen *URA3* nego se on nalazi na plazmidu, transformanti su selekcionirani kao uracil-prototrofi (fenotip  $Ura^+$ ) na hranjivoj podlozi bez uracila. Međutim, ovako selekcionirani transformanti ne moraju nužno imati željenu strukturu lokusa *CYC1*. Naime, često se događa da se u ciljnu regiju (u ovom slučaju regija *CYC1*) ugradi više molekula plazmida, a moguće je i da se plazmid ugradi u neko drugo mjesto u genomu. Zbog toga je, u cilju pronalaska odgovarajućeg transformanta, provedena molekularna analiza hibridizacijom DNA metodom po Southernu čiji su rezultati prikazani u poglavlju

### 4.1.2. Molekularna analiza strukture lokusa *CYC1*

Molekularna analiza transformanata metodom hibridizacije DNA po Southernu (poglavlje 3.2.7.) provedena je u svrhu pronalaženja sojeva sa strukturom lokusa *CYC1* prikazanom na slici 4. U tu svrhu DNA transformanata pocijepana je enzimom *XbaI* koji cijepa plazmide pAB-126S4, pAB-126S8, pAB-126S10 i pAB-150S10 unutar pseudopalindroma, a kao neradioaktivna proba korišten je gen *CYC1*. Restriksijska mapa lokusa *CYC1* za sojeve kvasca kod kojih je došlo do jednostruke ili višestruke integracije plazmida u homologni lokus, te za ishodni netransformirani soj kvasca prikazana je na slici 4. Iz rezultata molekularne analize (slika 5) vidljivo je da su kod svih transformanata prisutni signali veličine 9,4 i 4,3 kb što i odgovara očekivanju za jednostruku integraciju plazmida u homologni lokus. Kod nekih transformanata (9 i 14) vidljiva je dodatna vrpca veličine 6,6 kb što odgovara veličini plazmida kojim je kvasac transformiran, što znači da je u tim slučajevima došlo do višestruke integracije plazmida. Prikazani su rezultati molekularne analize za sojeve dobivene transformacijom soja FF-18-52 sa plazmidima pAB-126S4, pAB-126S8 i pAB-150S10, a analogna analiza provedena je i za sojeve dobivene transformacijom sa plazmidom pAB-126S10 (slika nije prikazana).



**Slika 4.** Restriksijska mapa lokusa *CYC1* netransformiranog soja kvasca (A), soja kvasca kod kojeg je došlo do jednostruke integracije plazmida (B), te soja kvasca kod kojeg je došlo do višestruke integracije plazmida (C).



**Slika 5.** Molekularna analiza transformanata dobivenih transformacijom kvasca *S. cerevisiae*, soj FF-18-52 sa lineariziranim plazmidima pAB-126S4, pAB-126S8 i pAB-150S10. Kromosomska DNA pocijepana je sa enzimom *Xba*I, te hibridizirana s neradioaktivno obilježenim genom *CYCI*. **M:**  $\lambda$ HindIII, **FF-18-52** – ishodni soj, **linije 1-8:** sojevi dobiveni transformacijom sa plazmidom pAB-126S4, **linije 9-15:** sojevi dobiveni transformacijom sa plazmidom pAB-126S8, **linije 16-18:** sojevi dobiveni transformacijom sa plazmidom pAB-150S10. Zvjedicama su označeni transformanti koji su korišteni za daljnju molekularnu analizu i karakterizaciju.

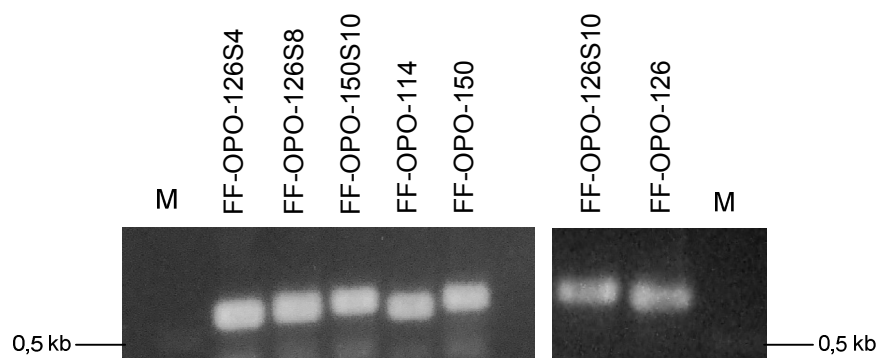
Na temelju rezultata molekularne analize odabrani su transformanti koji imaju odgovarajuću strukturu lokusa *CYCI* te su podvrgnuti daljnjoj molekularnoj analizi (poglavlje 4.1.3.).

### 4.1.3. Molekularna analiza pseudopalindroma u konstruiranim sojevima

Na temelju rezultata molekularne analize prikazane u prethodnom poglavlju odabrani su transformanti koji imaju željenu strukturu lokusa *CYCI* ali tom analizom nije potvrđena i očuvanost pseudopalindroma. Zbog toga je provedena dodatna analiza odabranih sojeva s ciljem da se provjeri da li su pseudopalindromi ostali nepromijenjeni tijekom umnažanja plazmida u bakteriji *E. coli* kao i tijekom transformacije kvasca i replikacije kvašćevog genoma.

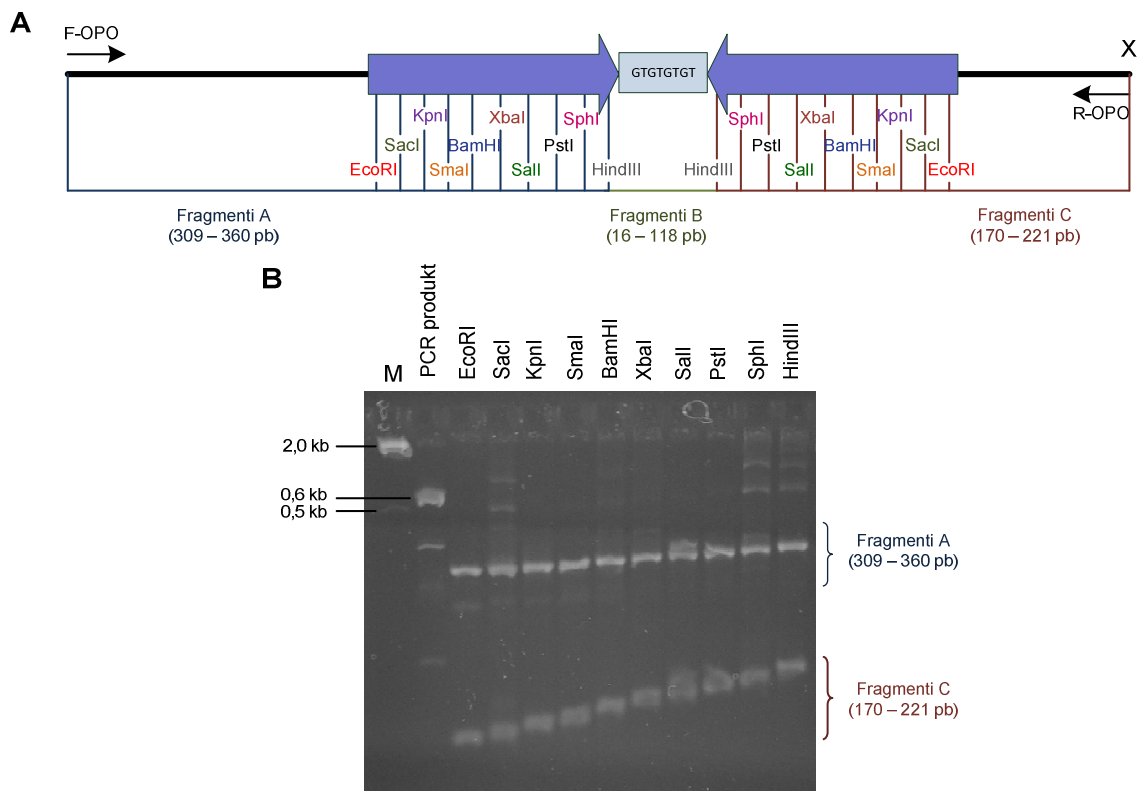
Budući da pseudopalindromi u sojevima kvasca sadrže restrikcijska mjesta za čitav niz endonukleaza (poglavlje 3.1.1.2., slika 1B), njihova očuvanost provjerena je restrikcijskom analizom. U tu svrhu, najprije je dio genoma kvasca koji sadrži pseudopalindrom umnožen

PCR-om pomoću početnica R-OPO i F-OPO (poglavlje 3.1.3.). Osim u sojevima konstruiranim u ovom radu (FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8, FF-OPO-126S10, FF-OPO-150S10), umnožen je i dio DNA u sojevima FF-OPO-114, FF-OPO-126 i FF-OPO-150 koji se sadrže palindrome (struktura palindroma prikazana je na slici 1B u poglavlju 3.1.1.2.), a koji su korišteni za kontrolu prilikom molekularne analize pseudopalindroma. Uspješnost umnažanja provjerena je gel elektroforezom. Kao što je vidljivo sa slike 6, umnažanje DNA bilo je uspješno, a međusobni odnos veličine svih fragmenata u skladu je s očekivanim.



**Slika 6.** Gel elektroforeza fragmenata DNA koji sadrže pseudopalindrome i palindrome umnoženih iz sojeva kvasca FF-OPO-126S4 (593 pb), FF-OPO-126S8 (597 pb), FF-OPO-126S10 (599 pb), FF-OPO-150S10 (623 pb), FF-OPO-114 (577 pb), FF-OPO-126 (589 pb) i FF-OPO-150 (613 pb). Očekivane veličine umnoženih fragmenata prikazane su u zagradama pored naziva soja.

Svi fragmenti umnoženi PCR-om podvrgnuti su restrikcijskoj analizi pri čemu su korišteni svi restrikcijски enzimi prikazani na slici 1B u poglavlju 3.1.1.2. Na slici 7 prikazani su rezultati restrikcijske analize pseudopalindroma u soju FF-OPO-126S8, a na isti način su analizirani i pseudopalindromi u svim drugim konstruiranim sojevima (slika nije prikazana).



Očekivane veličine fragmenata A: 309, 319, 325, 327, 330, 336, 342, 352, 358 i 360 pb  
 Očekivane veličine fragmenata C: 170, 172, 178, 184, 191, 197, 203, 205, 211 i 221 pb

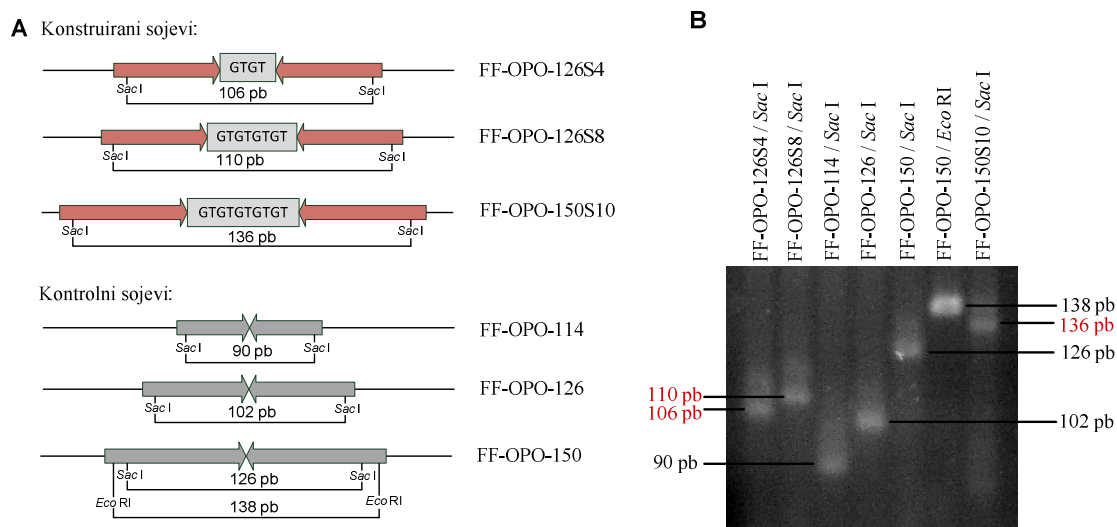
**Slika 7.** Restriksijska analiza pseudopalindroma u soju kvasca FF-OPO-126S8. Na shematskom prikazu umnoženog fragmenta DNA prikazana su restriksijska mjesta koja su korištena u analizi (A). Fragment je pocijepan sa svakom od prikazanih restriksijskih endonukleaza te je provedena gel elektroforeza u 3%-tnom agaroznom gelu. Cijepanjem sa svakim pojedinim enzimom nastaju tri fragmenta – A, B i C, ali na gelu su vidljiva samo dva veća fragmenta A i C čije su očekivane veličine prikazane ispod gela (B).

Kao što je vidljivo sa slike 7, pseudopalindrom je uspješno pocijepan sa svim restriksijskim endonukleazama, što znači da su sva mjesta prepoznavanja restriksijskih enzima očuvana, tj. da nije došlo do promijene u sekvenciji ponavljanja unutar pseudopalindroma.

Međutim, ova analiza ne potvrđuje prisutnost odgovarajućih razmaknica u pseudopalindromima koje se nalaze u najmanjim fragmentima (fragmentima B) nastalim cijepanjem. Da bi se prisutnost razmaknice određene dužine mogla utvrditi potrebno je veličinu središnjih fragmenata B koji nastaju cijepanjem pseudopalindroma određenim restriksijskim enzimom usporediti s središnjim fragmentima koji nastaju cijepanjem palindroma (kontrolni sojevi) istim enzimom. Razlika u veličini predstavlja dužinu razmaknice. Također je potrebno i međusobno usporediti veličine fragmenata nastalih cijepanjem pseudopalindroma sa različitim dužinama razmaknice. Za ovu restriksijsku analizu odabrani su restriksijski enzimi *SacI* i *EcoRI*,



a shematski prikaz očekivanih fragmenata, te provedena gel elektroforeza u 4%-tnom agaroznom gelu prikazana je na slici 8.

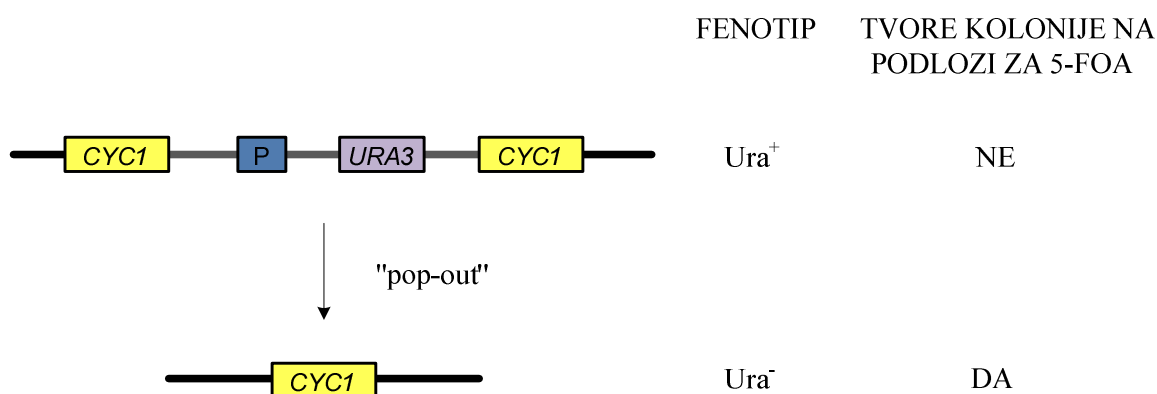


**Slika 8.** Provjera središnjeg dijela pseudopalindroma u konstruiranim sojevima. Na shematskom prikazu fragmenata DNA (A) vidljive su očekivane veličine fragmenata nakon cijepanja određenih pseudopalindroma enzimom *SacI*, odnosno *EcoRI*. Na rezultatima gel-elektroforeze (B) prikazani su samo središnji fragmenti dobiveni cijepanjem PCR produkata navedenim enzimima za konstruirane i kontrolne sojeve.

Iz rezultata gel-elektroforeze vidljivo je da su u svim slučajevima veličine fragmenata u skladu s očekivanjima, odnosno potvrđena je struktura pseudopalindroma.

## 4.2. Rekombinogenost pseudopalindroma

U prethodnim poglavljima opisan je postupak konstrukcije sojeva kvasca koji omogućavaju određivanje genetičke nestabilnosti, odnosno rekombinogenosti pseudopalidroma. Ovaj eksperimentalni sustav osniva se na „pop-out“ rekombinaciji u lokusu *CYC1* u sojevima FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8, FF-OPO-126S10 i FF-OPO-150S10 (slika 1). Naime, „pop-out“ rekombinacija između dviju regija *CYC1* rezultira gubitkom cjelokupne sekvencije između njih i jedne kopije regije *CYC1* (slika 9). Zbog toga stanice kvasca u kojima se dogodio „pop-out“ gube gen *URA3* i mogu se selekcionirati na podlozi koja sadrži 5-FOA jer je 5-FOA toksična za stanice koje sadrže gen *URA3*.



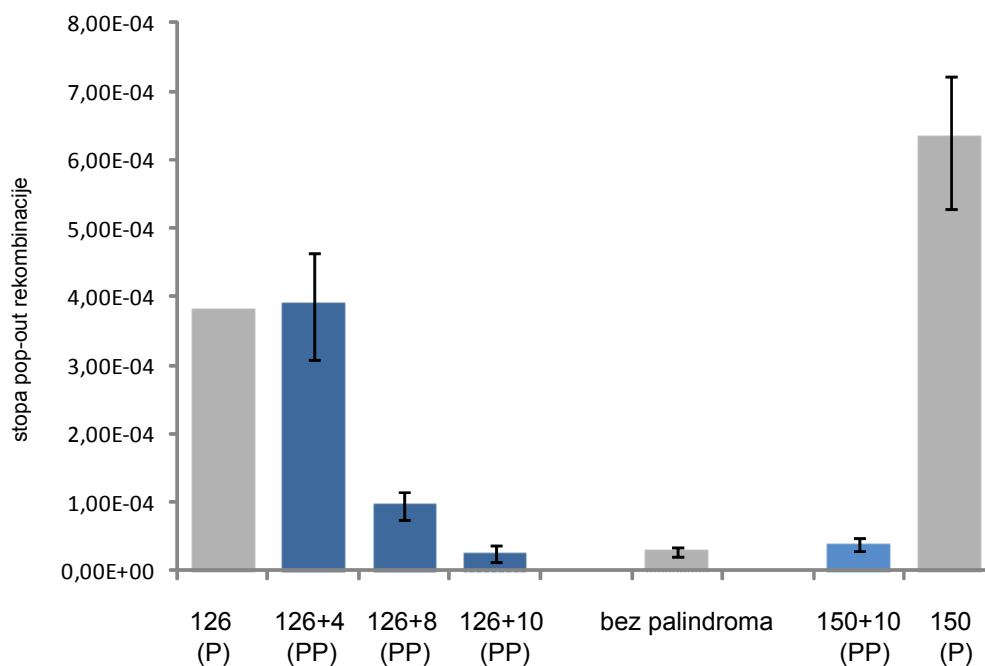
**Slika 9.** Eksperimentalni sustav korišten u ovom radu – „pop-out“ rekombinacija u lokusu *CYC1* na kromosomu 10 u sojevima FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8, FF-OPO-126S10 i FF-OPO-150S10. Plavi kvadrat predstavlja položaj u kojem se nalazi pojedini pseudopalindrom. Naveden je fenotip i sposobnost tvorbe kolonija na podlozi sa 5-FOA prije i nakon „pop-out“ rekombinacije.

U svrhu određivanja rekombinogenosti pseudopalindroma, u svim sojevima koji sadrže odgovarajuće pseudopalindrome (FF-OPO-126S4, FF-OPO-126S8, FF-OPO-126S10 i FF-OPO-150S10) određena je stopa „pop-out“ rekombinacije, odnosno vjerojatnost da se tijekom jedne diobe stanice kvasca dogodi „pop-out“. U tu svrhu, navedeni sojevi podvrgnuti su postupku koji je opisan u poglavlju 3.2.9., a eksperimentalno dobiveni podaci koji su bili potrebni za izračunavanje stope „pop-out“ rekombinacije prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Eksperimentani podaci dobiveni mjerenjem rekombinogenosti pseudopalindroma u konstruiranim sojevima. Ovi podaci korišteni su za izračunavanje stope „pop-out“ rekombinacije.

<b>SOJ KVASCA</b>	<b>POČETNI BROJ STANICA u kulturi</b>	<b>KONAČNI BROJ STANICA u kulturi</b>	<b>BROJ pop-out rekombinanata u 15 nezavisnih kultura</b>
FF-OPO-126-S4	148	$2,3 \cdot 10^6$	9060, 16300, 5120, 1600, 5180, 9940, 7240, 5240, 10520, 9480, 4560, 6500, 26080, 17340, 28620
FF-OPO-126-S8	204	$2,4 \cdot 10^6$	1840, 2720, 3160, 13220, 740, 2480, 2180, 2440, 1040, 940, 1880, 2280, 3600, 15440, 11680
FF-OPO-126-S10	213	$2,78 \cdot 10^6$	140, 620, 960, 1240, 3340, 240, 660, 1480, 800, 440, 1820, 180, 700, 1040, 1180
FF-OPO-150-S10	189	$2,98 \cdot 10^6$	1300, 1540, 2100, 3100, 1320, 1240, 1140, 1240, 1480, 1180, 1160, 1120, 180, 1300, 1800

Stopa „pop-out“ rekombinacije izračunata je metodom najveće vjerojatnosti (Lea i Coulson, 1949) pomoću računalnog programa Salvador (Zheng, 2005). Na slici 10 prikazana je rekombinogenost pojedinih pseudopalindroma, odnosno stopa „pop-out“ rekombinacije u sojevima koji sadrže pojedine pseudopalidrome i to u usporedbi sa stopom „pop-out“ rekombinacije u sojevima koji sadrže odgovarajuće palindrome.



**Slika 10.** Rekombinogenost pojedinih pseudopalindroma (PP) i odgovarajućih palindroma (P). Prikazana je vrijednost stope „pop-out“ rekombinacije s 99 %-tnim intervalom pouzdanosti. Rezultati za sojeve koji sadrže palindrome (P), te za soj bez palindroma preuzeti su iz prethodnih istraživanja (Lisnić i sur., 2009). Prikazani su rezultati za sojeve koji sadrže: palindrom duljine 126 pb (ponavljanja duga 63 pb - **126**), pseudopalindrome sa istom duljinom ponavljanja i razmaknicama od 4, 8 i 10 pb (**126+4**, **126+8** i **126+10**), palindrom duljine 150 pb (ponavljanja duga 75 pb - **150**), pseudopalindrom sa istom duljinom ponavljanja i razmaknicom duljine 10 pb (**150+10**), te za soj koji ne sadrži ni palindrom ni pseudopalindrom.

Na temelju rezultata prikazanih na slici 10 vidljivo je da razmaknica duljine 4 pb unutar pseudopalindroma ukupne duljine 126 pb ne utječe na stopu „pop-out“ rekombinacije, dok razmaknica duljine 8 pb dovodi do njezinog značajnog smanjenja. Razmaknice duljine 10 pb kod obrnutih ponavljanja ukupne duljine 126 pb, kao i kod 150 pb dovodi do velikog smanjenja stope „pop-out“ rekombinacije, koja je tada približno jednaka kao i kod soja bez palindroma.

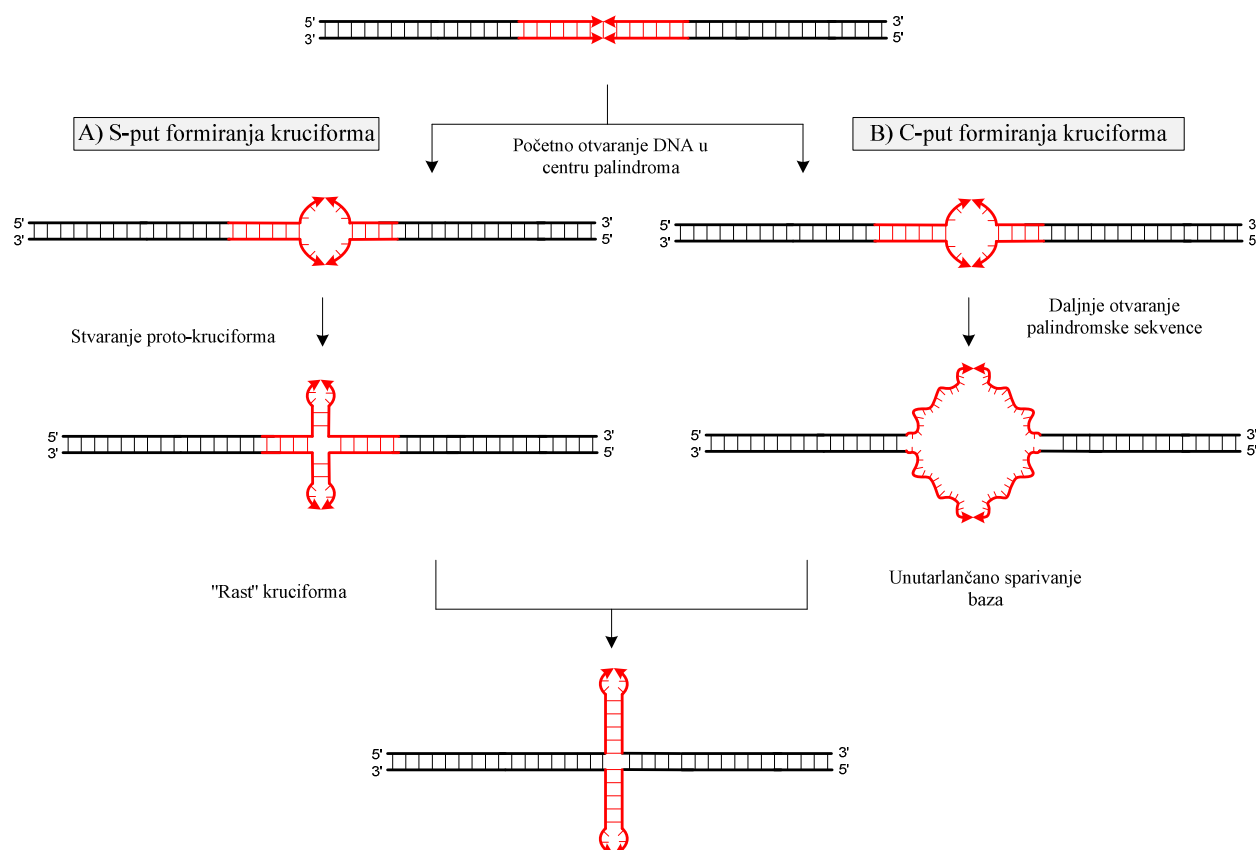
## 5. Rasprava

Dva bliska obrnuta ponavljanja u molekuli DNA tvore palindrome (savršene palindrome) i pseudopalindrome. Ovakvi motivi često se nalaze u ishodištima replikacije DNA, promotorima i terminatorima pa imaju važnu ulogu u funkcioniranju stanice. Međutim, palindromi i pseudopalindromi u molekuli DNA mogu tvoriti sekundarne strukture kao što su ukosnice i kruciformi (križne strukture). Upravo ovo svojstvo palindromske sekvencije (palindrome i pseudopalindrome) čini opasnim za stabilnost genoma jer mogu omesti replikaciju DNA. Osim toga u stanicama postoje enzimi koji cijepaju kruciforme i tako u molekulu DNA uvode dvolančane lomove, a to rezultira prekidom kontinuiteta genetičke informacije i pucanjem kromosoma. Ovakva oštećenja potencijalno su letalna, a njihov popravak djelovanjem odgovarajućih mehanizama može uzrokovati nepoželjne prerasporede genetičkog materijala kao što su različite kromosomske aberacije. Sve ovo za posljedicu ima povećanu učestalost rekombinacije i genetičku nestabilnost koja može rezultirati pojavom ozbiljnih genetičkih bolesti.

Zbog svega navedenog, rekombinogenost, odnosno svojstvo palindroma da potiču genetičku rekombinaciju, a time i nestabilnost genoma predmet je mnogih znanstvenih istraživanja. Tako je poznato da rekombinogenost savršenih palindroma raste s porastom njihove duljine te je ustanovljena i kritična duljina palindroma u genomu kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Naime, Lisnić i suradnici (2009) pokazali su da savršeni palindromi dulji od oko 70 pb značajno povećavaju učestalost genetičke rekombinacije dok kraći palindromi ne destabiliziraju kvašćev genom. Obzirom da je rekombinogenost palindroma povezana s tvorbom sekundarnih struktura, iz ovih rezultata može se zaključiti da u kvascu tek palindromi dulji od oko 70 pb tvore sekundarne strukture, a to je u skladu i s rezultatima bioinformatičke analize kvašćevog genoma koja je pokazala da je najdulji savršeni palindromu genomu kvasca *S. cerevisiae* dugačak 44 pb. Genomi mnogih organizama, uključujući i genom čovjeka, sadrže veliki broj znatno duljih palindromskih sekvencija pa se pretpostavlja da je supresija njihove rekombinogenosti nužna za održavanje stabilnosti genoma.

Istraživanje palindroma obuhvaća i studije termodinamike i kinetike formiranja kruciforma u palindromskoj sekvenciji unutar dvolančane molekule DNA (Ramreddy i sur., 2011). Predložena su dva modela (S-put i C-put) koji objašnjavaju formiranje kruciforma (slika 11), odnosno konformacijsku promjenu iz uobičajene linearne strukture u strukturu kruciforma (Lilley, 1985; Murchie i Lilley, 1987). Oba mehanizma zahtijevaju inicijacijski korak koji uključuje

denaturaciju DNA, odnosno pojavu jednolančane DNA (nekoliko nesparenih nukleotida) u centru palindromske sekvencije. Sada, prema S-putu (slika 11A) odmah nastaje proto-kruciform kao posljedica komplementarnog sparivanja nukleotida unutar jednog te istog lanca DNA, te daljnjim unutarlančanim sparivanjem proto-kruciform raste dok cjelokupna palindromska sekvencija ne prijeđe u oblik kruciforma. Druga je mogućnost da se unutarlančano sparivanje nukleotida, odnosno formiranje kruciforma dogodi tek nakon denaturacije većeg dijela ili čak cjelokupne palindromske sekvencije (C-put, slika 11B).



**Slika 11.** Modeli formiranja kruciforma u palindromskoj sekvenciji u dvolančanoj molekuli DNA prema S-putu (A) i prema C-putu (B). Objašnjenje se nalazi u tekstu.

Prema S-putu formiranja kruciforma (slika 11A), za rekombinogenost palindromskih sekvencija (palindroma i pseudopalindroma) presudnu ulogu ima mogućnost pojave proto-kruciforma odnosno unutarlančano sparivanje nukleotida u samom centru palindromske sekvencije. Stoga bi se moglo očekivati da su pseudopalindromi u kojima se između obrnutih ponavljanja nalazi razmaknica znatno stabilniji od savršenih palindroma koji sadrže ista obrnuta ponavljanja kao i pseudopalindrom, ali takvo sustavno istraživanje još nije provedeno.

Ovaj rad predstavlja početak sustavnog istraživanja rekombinogenosti pseudopalindroma. Zbog toga je u ovom radu konstruiran eksperimentalni sustav koji omogućava precizno, a

istovremeno relativno brzo i jednostavno određivanje (mjerenje) rekombinogenosti palindroma (poglavlje 4.2.). U ovoj fazi, navedeni sustav iskorišten je u svrhu uspoređivanja rekombinogenosti srodnih palindroma i pseudopalindroma. Naime, jedina razlika u redosljedu nukleotida u ovim sekvencijama bila je ta što pseudopalindromi, za razliku od palindroma, sadrže razmaknicu duljine 4, 8 ili 10 pb dok su i palindromi i pseudopalindromi sadržavali identične obrnuto ponovljenje sekvencije. Dobiveni rezultati (poglavlje 4.2.; slika 10) nedvojbeno pokazuju da umetanje razmaknice od 4 pb u centar palindroma ukupne duljine 126 pb (sastoji se od dva obrnuta ponavljanja duljine 63 pb) ne smanjuje njegovu rekombinogenost. Međutim, razmaknica duljine 8 pb ima značajan antirekombinogeni učinak dok razmaknica od 10 pb potpuno poništava rekombinogenost palindroma od 126, ali i od 150 pb. Ovi rezultati jasno upućuju na zaključak da postoji kritična udaljenost između obrnutih ponavljanja pri kojoj pseudopalindromi prestaju biti rekombinogeni i to će zasigurno biti predmet budućih istraživanja. Osim toga rezultati prikazani na slici 10 navode i na zaključak da razmaknica od 4 pb ne može stabilizirati palindrome dulje od 126 pb, kao i da razmaknica od 10 pb najvjerojatnije stabilizira sve palindrome duljine do 150 pb. Naravno, sasvim je moguće da pri tome značajnu ulogu ima nukleotidni sastav obrnutih ponavljanja i ova je hipoteza svakako vrijedna daljnjih istraživanja.

Rezultati ovog rada, kao i rezultati spomenutih budućih istraživanja na ovom području, mogli bi naći primjenu u daljnjem razvoju računalnih programa za identifikaciju palindroma i pseudopalindroma u sekvencioniranim genomima. Naime, eksperimentalni podaci o rekombinogenosti ovih sekvencija mogu omogućiti da se pojedinim palindromskim sekvencijama pridruži odgovarajući rizik za stabilnost genoma, a to bi moglo otvoriti nove mogućnosti u istraživanju genetičkih poremećaja potaknutih postojanjem palindroma i pseudopalindroma u molekuli DNA pa tako i u genomu čovjeka.

## 6. Zaključci

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Razmaknica duljine 4 pb ne uzrokuje smanjenje rekombinogenosti palindroma ukupne duljine 126 pb dok razmaknica duljine 8 pb ima značajni antirekombinogeni utjecaj, a razmaknica duljine 10 pb potpuno poništava rekombinogenost palindroma duljine 126 ali i 150 pb.
2. Moguće je da razmaknica duljine 4 pb ne smanjuje rekombinogenost palindroma duljih od 126 pb te da razmaknica od 10 pb poništava rekombinogenost svih palindroma kraćih od 150 pb, međutim, to može ovisiti o nukleotidnom sastavu obrnutih ponavljanja unutar palindroma i pseudopalindroma.
3. Eksperimentalni podaci o rekombinogenosti palindroma i pseudopalindroma mogu omogućiti razvoj računalnih programa koji će pojedinim palindromskim motivima pridružiti odgovarajuću razinu opasnosti za stabilnost genoma, a to može otvoriti nove mogućnosti u istraživanju genetičkih poremećaja koji su posljedica postojanja palindroma i pseudopalindroma u molekuli DNA.



## 7. Zahvale

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. Ivanu-Krešimiru Svetecu što mi je omogućio sudjelovanje u ovom istraživanju, te na iznimnoj pomoći tijekom pisanja ovog rada.

Posebno zahvaljujem i dipl. inž. Marini Miklenić koja me podučila svim eksperimentalnim tehnikama korištenima u ovom radu, te koja me dobrim savjetima vodila kroz eksperimente. Osim toga, zahvalila bih joj na strpljenju i velikoj pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Također bih željela zahvaliti i ostalim djelatnicima Laboratorija na savjetima i prijateljskoj atmosferi.

## 8. Popis literature

Andersen, J. T., Poulsen, P, Jensen, K. F. (1992) Attenuation in the *rph-pyrE* operon of *Escherichia coli* and processing of the dicistronic mRNA. *Eur J Biochem.* **206**, 381-390.

Bujnicki, J. M. (2001) Understanding the evolution of restriction-modification systems: clues from sequence and structure comparasions. *Acta Biochim Pol.* **48**, 935-967.

Gietz, R. D., Schiestl, R. H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protocols.* doi:10.1038/nprot.2007.13.

Gjuračić, K., Zgaga, Z. (1996) Illegitimate integration of single-stranded DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **253**, 173-181.

Hiratsu, K., Mochizuki, S., Kinashi, H. (2000) Cloning and analysis of the replication origin and the telomeres of the large linear plasmid pSLA2-L in *Streptomyces rochei*. *Mol Gen Genet.* **263**, 1015-1021.

Lea, E.A., Coulson, C.A. (1949) The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J. Genetics* **49**, 264-285.

Leach D. R. (1994) Long DNA palindromes, cruciform structures, genetic instability and secondary structure repair. *Bioessays.* **16**, 893-900.

Lilley, D. M. (1985) The kinetic properties of cruciform extrusion are determined by DNA base-sequence. *Nucleic Acid Res.* **13**, 1443-1465.

Lisnić, B., Svetec, I. K., Šarić, H., Nikolić, I., Zgaga, Z. (2005) Palindrome content of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Curr Genet.* **47**, 289-297.

Lisnić, B., Svetec, I. K., Štafa, A., Zgaga, Z. (2009) Size-dependet palindrome-induced intrachromosomal recombination in yeast. *DNA repair.* **8**, 383-389.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Quant. Biol.* **51**, 263-273.

Murchie, A. I., Lilley, D. M. (1987) The mechanism of cruciform formation in supercoiled DNA: initial opening of central basepairs in salt-dependent extrusion. *Nucleic Acid Res.* **146**, 835-847.

Ramreddy, T., Sachidanandam, R., Strick, T. R. (2011) Real-time detection of cruciform extrusion by single-molecule DNA nanomanipulation. *Nucleic Acids Res.* **39(10)**, 4275-4283.

Weller, S. K., Spadaro, A., Schaffer, J. E., Murray, A. W., Maxam, A. M., Schaffer, P. A. (1985) Cloning, sequencing and functional analysis of *oriL*, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis. *Mol Cell Biol.* **5**, 930-942.

Winston, F., Chumley, F., Fink, G. R. (1983) Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 211-228.

Yosunkaya Ferenci, E., Guven, G. S., Kuru, D., Yilmaz, S., Tarkan-Arguden, Y., Cirakoglu, A., Deviren, A., Yuksel, A., Hacıhanefioglu, S. (2007) Supernumerary chromosome der(22)t(11,22): Emanuel syndrome associates with novel features. *Genet Couns.* **18**, 401-408.

Zheng, Q. (2005) New algorithms for Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Math. Biosci.* **196**, 198-214.

## 9. Sažetak

Nikolina Gardlo

### PSEUDOPALINDROMI U DNA - UTJECAJ NA STABILNOST GENOMA KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

U genomima svih organizama, uključujući i čovjeka, primijećeno je da se isti redoslijed nukleotida može pojaviti na više različitih mjesta. Pri tome, ta ponavljanja mogu biti u istoj ili obrnutoj orijentaciji, a posebno su zanimljiva bliska obrnuta ponavljanja koja se nazivaju palindromi (ili savršeni palindromi) i pseudopalindromi (nesavršeni palindromi). Naime, palindromi se sastoje od dva identična obrnuta ponavljanja koja nisu razdvojena niti jednim parom baza (pb), dok obrnuta ponavljanja u pseudopalindromima ne moraju biti identična, a mogu biti i razdvojena s jednim ili više pb. Palindromi i pseudopalindromi u molekuli DNA tvore sekundarne strukture (ukosnice i križne strukture) koje mogu uzrokovati lomove kromosoma te tako potaknuti preraspodjelu genetičkog materijala, genetičku nestabilnost i pojavu mnogih genetičkih bolesti. U prethodnim istraživanjima detaljno je analizirana ovisnosti genetičke nestabilnosti i duljine palindroma, ali slična analiza pseudopalindroma još nije provedena. Stoga je u ovom radu istražen utjecaj pseudopalindroma, odnosno udaljenosti između obrnutih ponavljanja (duljina razmaknice) na genetičku stabilnost eukariotskog genoma. U tu svrhu, metodama genetičkog inženjerstva konstruiran je niz sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji na točno određenom mjestu u genomu sadrže odgovarajuće pseudopalindrome. Rezultati određivanja genetičke nestabilnosti konstruiranih sojeva pokazali su da umetanje razmaknice duljine 4 pb u centar palindroma duljine 126 pb, odnosno između dva ponavljanja duljine 63 pb ne smanjuje njihovu genetičku nestabilnost. Međutim, razmaknica duljine 10 pb potpuno stabilizira palindrome duljine 126 i 150 pb.

Ključne riječi: palindromi, pseudopalindromi, obrnuta ponavljanja, genetička (ne)stabilnost, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.

## 10. Summary

Nikolina Gardlo

### **PSEUDOPALINDROMES IN DNA – THE INFLUENCE ON STABILITY OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae* GENOME**

Identical nucleotide sequences can be found in multiple positions in the genomes of all organisms, including human. Since such sequences can be repeated in the same and the opposite orientation, they can create closely spaced inverted repeats known as palindromes (perfect palindromes) and pseudopalindromes (imperfect palindromes). A palindrome is composed of two identical inverted repeats which are not separated by intervening (or spacer) DNA, whereas inverted repeats in pseudopalindromes may not be identical and may be separated by one or more base pairs (bp). Palindromes and pseudopalindromes can form DNA secondary structures (such as hairpins and cruciforms) which can cause chromosome breakage and thus stimulate the rearrangements of genetic material, genetic instability and occurrence of many genetic diseases. Previously, a detailed study of size dependent instability of perfect palindromes was performed. However, pseudopalindromes were never subjected to such systematic analysis. Therefore, in this study the influence of pseudopalindromes, i.e. the distance between inverted repeats (spacer DNA length) on genetic instability of eukaryotic genomes was investigated. For this purpose, several strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae* were constructed using standard methods of genetic engineering. Each of these strains carried a particular pseudopalindrome in a specific location in the genome which allowed their genetic instability to be determined. The results of this study showed that the insertion of 4 bp spacer DNA in the center of a 126 bp long palindrome (i.e. between the two 63 bp long repeats) does not reduce its genetic instability. However, the 10 bp spacer DNA completely abolishes genetic instability of 126 and 150 bp long palindromes.

Key words: palindromes, pseudopalindromes, inverted repeats, genetic (in)stability, yeast *Saccharomyces cerevisiae*.