

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Pranklin Andrea

**Uspješnost genskog ciljanja u prirodnim, biotehnološki
interesantnim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana-Krešimira Sveteca i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.

POPIS KRATICA

5-FOA	5-fluororotična kiselina (<i>engl.</i> 5-fluoroorotic acid)
ADE2	Gen za enzim fosforibozil-aminoimidazol-karboksilazu, sudjeluje u biosintezi adenina
ARS1	Kvaščevo ishodište replikacije
BIR	Replikacija DNA potaknuta dvolančanim lomom (<i>engl.</i> Break-induced replication)
bla	Gen za enzim β -laktamazu, odgovoran za rezistenciju na ampicilin
CEN4	Centromerna regija kvaščevo kromosoma IV
DIG	Dioksigenin (<i>engl.</i> dioxigenin)
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
dUTP	Deoksiuridin-trifosfat (<i>engl.</i> deoxyuridine-triphosphate)
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina (<i>engl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid)
GTE	Glukoza-Tris-EDTA pufer (<i>engl.</i> glucose-Tris-EDTA buffer)
HIS3	Gen za enzim imidazolglicerol-fosfat dehidratazu, sudjeluje u biosintetskom putu za histidin
kb	Kilobaza
lacZ	Gen za laktoza permeazu
LB	Luria-Bertani hranjiva podloga za uzgoj bakterija
LEU2	Gen za enzim β -izopropilmalat dehidrogenazu, sudjeluje u biosintetskom putu za leucin
LYS2	Gen za enzim alfa aminoacidat reduktazu, sudjeluje u biosintetskom putu za lizin
MAT	Lokus na kvaščevom III. kromosomu koji određuje tip parenja
Mb	Megabaza
MET15	Gen za enzim O-acetil homoserin-O-acetil serin sulfhidrilazu, sudjeluje u biosintetskom putu za metionin i cistein
NBT	Nitrozo-plavi-tetrazolij (<i>engl.</i> nitroblue tetrasodium salt)
nt	Nukleotid
ORF	Otvoreni okvir čitanja (<i>engl.</i> open reading frame)
ori	Bakterijsko ishodište replikacije
pb	Par baza
PCR	Lančana reakcija polimerazom (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PEG	Polietilenglikol (<i>engl.</i> polyethylene glycol)
SCE	Sorbitol-natrijev citrat-EDTA (<i>engl.</i> sorbitol-sodium citrate-EDTA)
SDS	Natrij-dodecil sulfat (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)
SSC	Natrijev klorid-natrijev citrat pufer (<i>engl.</i> sodium chloride-sodium citrate buffer)
STE	Natrijev klorid-Tris-EDTA (<i>engl.</i> sodium chloride-Tris-EDTA)
TBE	Tris-borna kiselina-EDTA (<i>engl.</i> Tris-borate-EDTA buffer)
TE	Tris-EDTA pufer (<i>engl.</i> Tris-EDTA buffer)
Tris	3-hidroksimetil-aminometan (<i>engl.</i> tris (hydroxymethyl) aminomethane)
URA3	Gen za enzim orotidin-5'-fosfat dekarboksilazu, sudjeluje u biosintetskom putu za uracil
YPD	Kvaščevo ekstrakt-pepton-dekstroza medij za uzgoj kvasaca (<i>engl.</i> yeast-extract-peptone-dextrose medium)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2. Gensko ciljanje (<i>engl. gene targeting</i>).....	2
1.2.1. Rekombinacija „krajevi unutra“ (<i>engl. „ends-in“</i>).....	2
1.2.2. Rekombinacija „krajevi-van“ (<i>engl. „ends-out“</i>).....	3
1.3. Aberantni genetički događaji.....	3
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	5
3. MATERIJAL I METODE	6
3.1. Materijal.....	6
3.1.1. Plazmidi.....	6
3.1.1.1. Plazmid pRED150.....	6
3.1.1.2. Plazmid pLS42.....	6
3.1.2. Oligonukleotidi.....	7
3.1.3. Mikroorganizmi.....	7
3.1.3.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	7
3.1.3.2. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
3.1.3.2.1. Sojevi NCYC 3612 i NCYC 3586.....	8
3.1.3.2.2. Sojevi NCYC 3609 i NCYC 3582.....	8
3.1.3.2.3. Sojevi skupine FF.....	8
3.1.3.2.4. Sojevi skupine BY.....	8
3.1.4. Hranjive podloge i otopine.....	9
3.1.4.1. Podloge za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i>	9
3.1.4.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
3.1.4.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA.....	11
3.1.4.4. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica.....	13
3.1.4.5. Otopine za gel-elektroforezu.....	13
3.1.4.6. Otopine za hibridizaciju DNA po Southern-u.....	14
3.1.5. Kemikalije, enzimi i membrane.....	15
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA.....	16
3.2.1.1. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom.....	16
3.2.1.2. Pročišćavanje DNA smjesnom fenol/kloroform/izoamilni alkohol.....	16
3.2.1.3. Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena.....	17
3.2.1.4. Izolacija kvašćeve DNA iz stanica uzgojenih u tekućoj podlozi.....	17
3.2.2. Cijepanje i modifikacija DNA.....	18

3.2.3.	Transformacija kvašćevih stanica litijevim acetatom.....	18
3.2.4.	Gel-elektroforeza.....	18
3.2.5.	Metoda hibridizacije DNA po Southern-u	19
3.2.5.1.	Princip metode.....	19
3.2.5.2.	Priprema DNA sonde.....	20
3.2.5.2.1.	Priprema DNA sonde metodom nasumične početnice	20
3.2.5.2.2.	Priprema DNA sonde lančanom reakcijom polimerazom (PCR)	21
3.2.5.3.	Prijenos DNA na membranu	21
3.2.5.4.	Predhibridizacija i hibridizacija	22
3.2.5.5.	Detekcija.....	22
4.	REZULTATI	23
4.1.	Provjera strukture plazmida pRED150	23
4.2.	Transformacija kvasca.....	24
4.2.1.	Uspješnost genskog ciljanja.....	24
4.2.2.	Spektar aberantnih transformacijskih događaja.....	25
4.3.	Analiza polimorfizama u genomima sojeva E5 α i 2421 α	29
5.	RASPRAVA	32
5.1.	Gensko ciljanje u sojevima E5 α i 2421 α	32
5.2.	Analiza polimorfizama u sojevima E5 α i 2421 α	33
6.	ZAKLJUČCI	35
7.	ZAHVALE	36
8.	POPIS LITERATURE	37
9.	SAŽETAK	40
10.	SUMMARY	41

1. UVOD

1.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* poznat i kao pivski, pekarski i vinski kvasac, jednostanična je nepatogena gljiva mješinarica iz razreda *Ascomycetes*. Najpoznatiji je eukariotski modelni organizam i ima široku primjenu u genetici (Mell i Burges, 2002), molekularnoj biologiji i biotehnologiji (Sherman, 2002), kao i u industriji. Koristi se za proizvodnju alkoholnih pića i prehrambenih proizvoda, a zbog brojnih gena sličnih višim eukariotima (uključujući čovjeka), ovaj kvasac je jako dobar modelni organizam za proučavanje različitih bioloških procesa u eukariota kao što je apoptoza (Madeo i sur., 2002), starenje (Longo i sur., 2012) i neurodegenerativne bolesti (Khurana i Lindquist, 2010) te u istraživanju genske terapije gdje je jedan od važnijih modelnih organizama zbog izuzetno uspješne homologne integracije transformirajuće DNA (Hinnen i sur., 1978, Orr-Weaver i sur., 1981).

Široku primjenu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u različitim istraživanjima dodatno je omogućila činjenica da je on prvi eukariotski organizam čiji je genom u cijelosti sekvencioniran (Goffeau i sur., 1996). Njegov haploidni genom sastoji se od 16 kromosoma koji sadrže 12,16 Mb DNA i mitohondrijske DNA veličine 85,78 kb. Bioinformatičkom analizom utvrđeno je da kromosomska DNA sadrži 6604 otvorenih okvira čitanja (*engl.* Open Reading Frame, ORF), no eksperimentalno je dokazano samo njih 4860 (72,74 %) (*Saccharomyces* Genome Database). Temeljem usporedbe slijeda nukleotida srodnih *Saccharomyces* vrsta pretpostavlja se da u genomu kvasca *S. cerevisiae* postoji 5773 (Cliften i sur., 2003) ili 5726 (Kellis i sur., 2003) gena koji kodiraju za proteine. Uz kromosomsku i mitohondrijsku DNA, genom kvasca čini i ekstrakromosomski element, plazmid 2 μ (Sherman, 2002).

Ovisno o tome koja se informacija nalazi na lokusu *MAT*, kvasac u haploidnom obliku može biti **a** ili α tipa parenja. Za stanice različitog tipa parenja, specifična je sinteza različitih feromona i odgovarajućih receptora na površini stanice suprotnog tipa parenja (Strathern i sur., 1981). Križanjem dva suprotna tipa parenja, nastaju diploidne stanice (**a**/ α tip parenja) koje iskazuju specifične funkcije karakteristične za diploide. Osim vegetativnog razmnožavanja, diploidne stanice mogu u odgovarajućim uvjetima ući u mejotičku diobu kojom nastaju četiri haploidne askospore od kojih su dvije **a**, a dvije α tipa parenja (Herskowitz, 1988). Sojevi kvasca mogu biti homotalični, kakvi se najčešće nalaze u prirodi ili heterotalični, kakvi su najčešće laboratorijski sojevi. Za homotalične haploidne sojeve karakteristično je da stanica majka nakon pupanja promijeni tip parenja. Na taj način u kulturi se nalaze stanice različitog

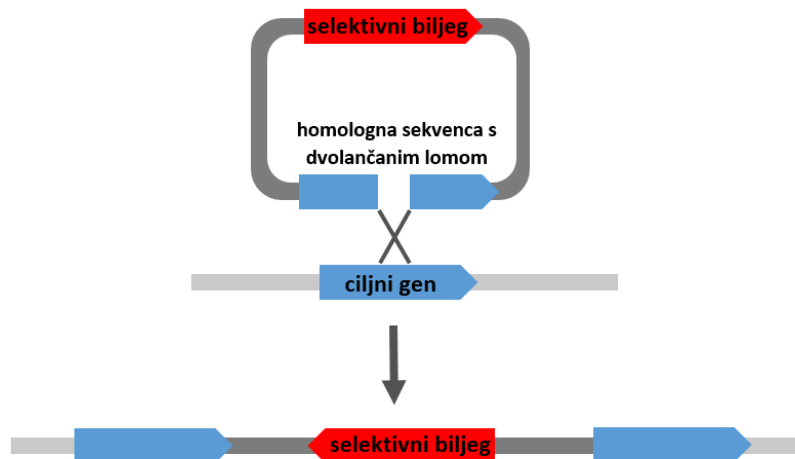
tipa parenja koje se onda križaju te iz jedne stanice **a** ili α tipa parenja nastane diploidna kultura (Oshima i Takano, 1971). Kod heterotaličnih sojeva ne dolazi do promjene tipa parenja, odnosno cijela kultura je istog tipa parenja kao i početna stanica majka. Heterotalizam je karakterističan za laboratorijske sojeve, kod kojih je najčešće inaktiviran gen za endonukleazu Ho, odgovornu za promjenu tipa parenja, čime su omogućena različita istraživanja zbog kontroliranog provođenja križanja i uzgoja haploidnih sojeva određenog tipa parenja.

1.2. Gensko ciljanje (*engl. gene targeting*)

U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* iznimno je uspješno gensko ciljanje (*engl. gene targeting*), to jest homologna rekombinacija transformirajuće DNA sa specifičnom (ciljnom) sekvencom u genomu. Postoje dva molekularno-genetička mehanizma koji omogućavaju gensko ciljanje, a to su rekombinacija „krajevi-unutra“ i rekombinacija „krajevi-van“.

1.2.1. Rekombinacija „krajevi unutra“ (*engl. „ends-in“*)

Hinnen i suradnici (1978) proveli su prvu transformaciju kvasca kružnim plazmidom koji nije sadržavao ishodište replikacije u kvascu (integrativni, nereplikativni plazmid). Pokazali su da se DNA unesena u stranicu kvasca gotovo isključivo ugrađuje u homolognu regiju u genomu. Zatim su Orr-Weaver i suradnici (1981) pokazali da se efikasnost transformacije poveća oko 100 puta ukoliko se na plazmidu uvede dvolančani lom u regiji homolognoj ciljnoj sekvenci u genomu. Dvolančani lom pri tome usmjerava integraciju plazmida upravo u tu homologiju, iako postoje i druge homologne regije između plazmida i genoma kvasca, a integracijom plazmida, to jest rekombinacijom „krajevi unutra“ (Slika 1), dolazi do duplikacije ciljne regije u genomu.

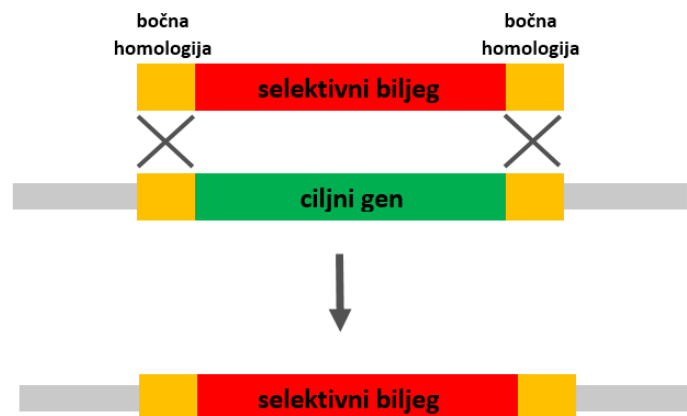


Slika 1. Shematski prikaz rekombinacije „krajevi-unutra“.

Ukoliko se na plazmidu ne nalazi cijeli gen koji je homologan ciljnoj regiji, nego samo njegov središnji dio, integracijom u genom dolazi do inaktivacije ciljnog gena jer umjesto dvije kompletne sekvence ciljnog gena, nastaju dvije nepotpune sekvence, pri čemu jednoj nedostaje 3'-kraj sekvence, a drugoj 5'-kraj sekvence.

1.2.2. Rekombinacija „krajevi-van“ (engl. „ends-out“)

Zamjena gena u kvascu događa se zahvaljujući rekombinaciji „krajevi-van“ (Slika 2), a rezultira zamjenom ciljnog gena sa selektivnim markerom kojeg nosi transformirajuća DNA. Za zamjenu gena potreban je linearni fragment DNA koji na krajevima sadrži regije homologne okolini ciljnog gena u genomu (takozvane „bočne homologije“) (Rothstein, 1983). Pri tome je, za uspješnu zamjenu gena potrebno da duljina bočne homologije iznosi barem 40 pb (Wach i sur., 1994).



Slika 2. Shematski prikaz rekombinacije „krajevi-van“.

1.3. Aberantni genetički događaji

Iako se transformirajuća DNA u genom kvasca najčešće ugrađuje homolognom rekombinacijom, primijećeno je da transformacija kvasca može rezultirati i nekim neočekivanim (aberantnim) događajima (Svetec i sur., 2007, Štafa i sur., 2014), kao što su:

- 1.) **Ilegitimna rekombinacija** – za razliku od homologne, karakteristična je za ostale eukariotske organizme, uključujući i čovjeka. Kod ovakve rekombinacije, transformirajuća DNA se nasumično ugrađuje u bilo koje mjesto u genomu, bez obzira na postojanje homologije, što je ujedno i glavni problem i prepreka primjeni genske terapije na čovjeku.

2.) **Duplikacija kromosoma** – prilikom transformacije, primijećena je duplikacija cijelog ciljnog kromosoma pri čemu nastaju heteroalelni transformanti kod kojih jedan kromosom sadrži transformirajuću DNA, a drugi sadrži intaktni ciljni gen. Dva su moguća mehanizma za ovakvu duplikaciju kromosoma: (i) transformirajuća DNA služi kao klica za replikaciju potaknutu dvolančanim lomom (Malkova i sur., 1996, Štafa i sur., 2014) ili (ii) transformirajuća DNA može invadirati obje sestrinske kromatide i uzrokovati pogrešnu segregaciju u istu stanicu kćer.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog rada je istraživanje biotehnološkog potencijala nedovoljno istraženih sojeva kvasca izoliranih iz prirodnih staništa. U tu svrhu odabrana su dva soja kvasca, soj YIIc17_E5 (E5 α) izoliran iz vina koji dobro podnosi visoke koncentracije etanola i soj UWOPS87-2421 (2421 α) izoliran iz cvijeta kaktusa *Opuntia megacantha* koji može rasti u prisutnosti nekih od inhibitora rasta. Nakon izolacije iz prirodnog staništa, ovim sojevima inaktivirana je endonukleaza Ho što nam je omogućilo stabilno održavanje haploidnih kultura. Osim toga, inaktiviran im je i gen *URA3* čiji proteinski produkt sudjeluje u biosintezi uracila te su ovi sojevi auksotrofni mutanti za uracil te je navedena auksotrofija poslužila kao genetički biljeg za selekciju transformanata. Osim toga, za razliku od soja 2421 α , soj E5 α je i auksotrof za histidin.

U svrhu ispunjavanja općeg cilja ovog rada, specifični cilj bio je istražiti uspješnost genskog ciljanja i spektar aberantnih događaja u dva potencijalno biotehnološki interesantna prirodna izolata kvasca *S.cerevisiae*, E5 α i 2421 α . U tu svrhu u ovom radu kvasci su transformirani integrativnim nereplikativnim plazmidom pRED150 te je određena uspješnost genskog ciljanja na temelju fenotipa i pomoću metode hibridizacije DNA po Southern-u. Pokazalo se da je u ovim sojevima znatno slabije gensko ciljanje nego u laboratorijskim sojevima kvasca *S. cerevisiae* i da često dolazi do duplikacije ciljnog kromosoma, zbog čega su sojevi podvrgnuti komparativnoj bioinformatičkoj analizi gdje su otkrivena dva gena u soju E5 α (*MMS21* i *SLK19*) i jedan gen u soju 2421 α (*ESPI*) koji bi mogli imati ulogu u nestabilnosti genoma ova dva prirodna izolata kvasca.

3. MATERIJAL I METODE

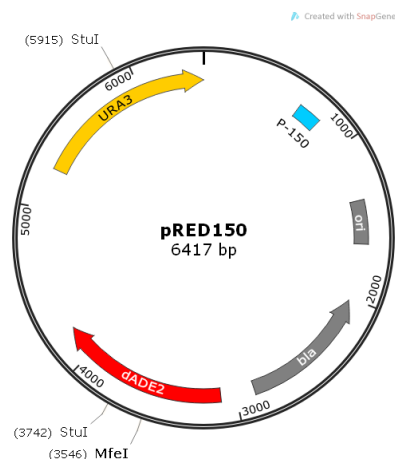
3.1. Materijal

3.1.1. Plazmidi

Korišteni su plazmidi koji sadrže bakterijske sekvence *ori* (bakterijsko ishodište replikacije), i *bla* (gen koji kodira za enzim β -laktamazu te je odgovoran za rezistenciju na ampicilin) koje omogućavaju umnožavanje i održavanje ovih plazmida u bakteriji *Escherichia coli*.

3.1.1.1. Plazmid pRED150

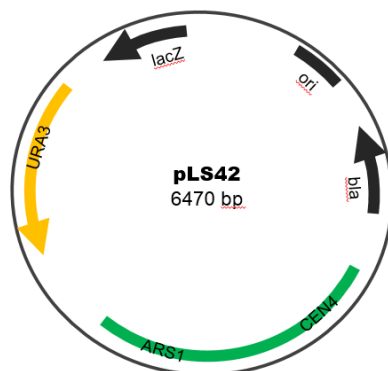
Plazmid pRED150 (Miklenić, 2015., Slika 3) korišten je jer sadrži samo središnji dio kvašćevog gena *ADE2*, od restrikcijskog mjesta enzima *EcoRV* do restrikcijskog mjesta enzima *DraI* (regija *de*), i aktivan gen *URA3*. Ovaj plazmid korišten je za transformaciju sojeva NCYC 3612 i NCYC 3609.



Slika 3. Plazmid pRED150. Prikazana je mapa plazmida s relevantnim restrikcijskim mjestima i kvašćevim i bakterijskim regijama koje plazmid sadržava.

3.1.1.2. Plazmid pLS42

Kao kontrola za efikasnost transformacije, korišten je replikativni plazmid pLS42 (Zgaga, 1990., Slika 4) koji se u stanici kvasca može samostalno replicirati. Stoga se s njim postiže velika efikasnost (uspješnost) transformacije kvasca jer za transformaciju nije nužna njegova ugradnja u genom. Ovaj plazmid sadrži kvašćeve regije *ARS1* (ishodište replikacije), *CEN4* (centromerna regija kvašćevog kromosoma 4) i gen *URA3* koji je korišten za selekciju transformanata.



Slika 4. Plazmida pLS42. Obilježene su kvaščeve i bakterijske regije koje plazmid sadržava (objašnjenje se nalazi u tekstu).

3.1.2. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi ADE2 R i ADE2 F (Tablica 1) korišteni su kao početnice za lančanu reakciju polimerazom pri sintezi sonde, odnosno neradioaktivno obilježene DNA tijekom hibridizacije DNA po Southern-u.

Tablica 1. Oligonukleotidi korišteni za sintezu sonde.

Oligonukleotid	Redoslijed nukleotida [5' – 3']	Duljina [nt]	Tm [°C]
ADE2-F	tataagcgccttagtgagaagccgagaa	28	61
ADE2-R	ttttagcgctacctgtaagcggtgattt	28	61

3.1.3. Mikroorganizmi

U ovom radu korišten je jedan soj bakterije *Escherichia coli* i šest sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.3.1. Bakterija *Escherichia coli*

Za umnažanje dvolančanih plazmida korišten je soj *E. coli* DH5 α genotipa *F'*/*endA1 hsdR17(rK-, mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NalR) relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)* („New England Biolabs“, Ipswich, MA, SAD).

3.1.3.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Svi sojevi kvasca korišteni u ovom radu i njihov genotip navedeni su u Tablici 2. Sojevi NCYC 3612, NCYC 3609, NCYC 3586 i soj NCYC 3582 kupljeni su od National Collection of Yeast Cultures (Norwich, Ujedinjeno Kraljevstvo), sojevi skupine FF potiču iz zbirke Instituta Curie (Orsay, Francuska) i dar su dr. sc. Francisa Fabrea, a sojevi iz skupine BY kupljeni su od EUROSCARF-a (EUROpean *Saccharomyces Cerevisiae* ARchive for Functional analysis, Frankfurt, Njemačka).

3.1.3.2.1. Sojevi NCYC 3612 i NCYC 3586

Soj NCYC 3612 (E5 α) je *MAT α* , a soj NCYC 3586 (E5 α) je *MAT α* derivat soja YIIc17_E5 koji je izoliran iz vina (Liti i sur., 2009, Cubillos i sur., 2009). Disruptiran im je gen za endonukleazu Ho, zbog čega su ovi sojevi heterotalični, odnosno ne dolazi do promjene tipa parenja. Osim toga, auksotrofni su mutanti za uracil (inaktiviran mu je gen *URA3*) i za histidin, no nepoznato je koji gen u metabolizmu histidina je mutiran.

3.1.3.2.2. Sojevi NCYC 3609 i NCYC 3582

Soj NCYC 3609 (2421 α) je *MAT α* , a soj NCYC 3582 (2421 α) je *MAT α* derivat soja UWOPS87-2421 koji je izoliran iz cvijeta kaktusa *Opuntia megacantha* (Liti i sur., 2009, Cubillos i sur., 2009). Disruptiran im je gen za endonukleazu Ho, zbog čega su heterotalični te su auksotrofni mutanti za uracil (inaktiviran im je gen *URA3*).

3.1.3.2.3. Sojevi skupine FF

Svi sojevi skupine FF nastali su modifikacijom soja koji je sadržavao prirodni kvašćev alel *ura3-52*. U ovome alelu gen *URA3* inaktiviran je zbog ugradnje retrotranspozona Ty1 u otvoreni okvir čitanja (Rose i Winston, 1984) zbog čega su svi sojevi s ovim alelom auksotrofni mutanti ovisni o uracilu.

3.1.3.2.4. Sojevi skupine BY

Sojevi skupine BY konstruirani su iz soja S288C koji je sekvencioniran 1996. godine (Gofeau, 1996). Bitno je za naglasiti da navedeni sojevi ne sadrže regiju *URA3* (alel *ura3 Δ 0*). Osim toga, sojevi skupine BY ne sadrže niti otvoreni okvir čitanja *LEU2* (alel *leu2 Δ 0*) niti središnji dio otvorenog okvira čitanja *HIS3* (alel *his3 Δ 1*) zbog čega su sojevi skupine BY

auksotrofni mutanti ovisni o uracilu, leucinu i histidinu. Dodatno, soj BY4741 ovisan je o metioninu zbog delecije gena *MET15* (alel *met15Δ0*), a soj BY4742 ovisan je o lizinu zbog delecije gena *LYS2* (alel *lys 2Δ0*).

Tablica 2. Genotip kvašćevih sojeva korištenih u ovom radu.

Soj	Literaturni navod	Genotip	Napomena
NCYC 3612	Liti i sur., 2009. Cubillos i sur., 2009	<i>MATα ura3::kanMX ho::HygMX</i>	auksotrofni mutant za histidin
NCYC 3609	Liti i sur., 2009. Cubillos i sur., 2009	<i>MATα ura3::kanMX ho::HygMX</i>	
NCYC 3586	Liti i sur., 2009. Cubillos i sur., 2009	<i>MATα ura3::kanMX ho::HygMX</i>	auksotrofni mutant za histidin
NCYC 3582	Liti i sur., 2009. Cubillos i sur., 2009	<i>MATα ura3::kanMX ho::HygMX</i>	
FF1852	Aboussekhra i sur., 1992	<i>MATα leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 ade5 can^R</i>	
FF733	Mercier i sur., 2005; Štafa i sur., 2005	<i>MATα leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 his7-2 lys1-1</i>	
BY4741	Brachmann i sur., 1998	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	
BY4742	Brachmann i sur., 1998	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	

3.1.4. Hranjive podloge i otopine

Sve podloge i otopine steriliziraju se u autoklavu 20 min pri 121 °C i čuvaju pri sobnoj temperaturi (osim ako nije posebno napomenuto) ili se pripremaju iz sterilnih otopina i sterilne deionizirane vode. Krute podloge dobiju se iz tekućih dodatkom 15,0 g/l agara prije sterilizacije.

3.1.4.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

Kompleksna podloga (LB)

tripton	10,0 g/L
kvašćev ekstrakt	5,0 g/L
natrijev klorid	10,0 g/L

Podloga s ampicilinom: ampicilin se dodaje u sterilnu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracije 20,0 mg/mL) do konačne koncentracije od 50,0 µg/mL u krutoj i 100,0 µg/mL u tekućoj podlozi.

3.1.4.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Kemijski definirana podloga (Sherman, 2002)

izvor dušika iz kvasca (bez aminokiselina i amonijevog sulfata)	1,7 g/L
amonijev sulfat	5,0 g/L
glukoza	20,0 g/L
smjesa nukleinskih baza i aminokiselina	1,3 g/L

Kompleksna (kompletna) podloga (YPD)

pepton	20,0 g/L
kvašćev ekstrakt	10,0 g/L
glukoza	20,0 g/L

Smjesa nukleinskih baza i aminokiselina

adenin sulfat	2,5 g
uracil	1,2 g
L-arginin-klorid	1,2 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g
L-glutaminska kiselina	6,0 g
L-histidin-klorid	1,2 g
L-leucin	3,6 g
L-lizin-klorid	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

Kemijski definirana podloga koja ne sadrži jednu ili više aminokiselina ili nukleotidnih baza, priprema se na isti način osim što se prilikom pripreme smjese nukleinskih baza i aminokiselina izostavi odgovarajuća tvar rasta.

Podloga s 5-fluoroorotičnom kiselinom (5-FOA) istog je sastava kao i kemijski definirana podloga uz dodatak dvostruke količine uracila te 1,0 g/L 5-FOA. Otopina 5-FOA sterilizira se filtracijom i dodaje u podlogu čija temperatura nije veća od 55 °C.

3.1.4.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

8 M amonijev acetat

- Otopina se priprema otapanjem 616,64 g amonijevog acetata u 1 L destilirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

20 mg/mL ampicilin

- Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C

0,5 M EDTA pH 8,0

- 18,61 g Na₂EDTA x 2H₂O otopi se u 80 mL deionizirane vode, pH se podesi dodatkom natrijevog hidroksida (približno 2 g peleta) i dopuni deioniziranom vodom do 100 mL.

Fenol

- Redestilirani fenol otapa se pri 67 °C i zasićen je jednakim volumenom TE pufera pH 8,0. Ne sterilizira se i čuva se u tamnoj boci pri 4 °C.

Kloroform/izoamilni alkohol

- Smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 24:1. Otopina se ne sterilizira i čuva pri 4 °C.

GTE-pufer

- 50 mM glukoza
10 mM EDTA
25 mM Tris-HCl pH 8,0
Priprema se iz sterilnih otopina, neposredno prije uporabe.

3 M kalijev acetat pH 4,8

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

3 M natrijev acetat pH 4,8

- 24,6 g bezvodnog natrijevog acetata otopi se u deioniziranoj vodi, pH se podesi ledenom octenom kiselinom i dopuni deioniziranom vodom do 100 mL. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

NaOH/SDS

- 0,2 M natrijev hidroksid
- SDS 10,0 g/L

Otopina se ne sterilizira, a priprema se neposredno prije uporabe.

10 mg/mL RNaza

- Ribonukleaza A se otopi u 10 mM Tris-Cl pH 7,5 i 15 mM natrijevom kloridu te zagrije 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon hlađenja do sobne temperature čuva se pri -20 °C.

TE pufer pH 8,0 ili 7,4

- 10 mM Tris-Cl pH 8,0 ili 7,4
 - 1 mM EDTA pH 8,0
- Priprema se iz sterilnih otopina.

1 M Tris-Cl

- 12,1 g Tris otopi se u 80 mL deionizirane vode, pH se do željene vrijednosti podesi dodatkom koncentrirane kloridne kiseline i dopuni deioniziranom vodom do 100 mL. Približne količine kiseline za pojedine pH vrijednosti su: pH 7,4 ~ 7,0 mL;
pH 8,0 ~ 4,2 mL.

1 M sorbitol

- 18,2 g sorbitola se otopi u 50 mL deionizirane vode i dopuni do 100 mL. Otopina se sterilizira autoklaviranjem i čuva na sobnoj temperaturi.

SCE

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

STE

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

Zimoliaza 20-T

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

3.1.4.4. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica

1 M litijev acetat

- 10,2 g litijevog acetata dihidrata se otopi u 70 mL deionizirane vode i dopuni do 100 mL. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri sobnoj temperaturi.

Litijev acetat/PEG (smjesa za transformaciju)

- PEG₄₀₀₀ 400 g/L
 - 0,1 M litijev acetat
 - 10 mM Tris-Cl (pH 7,4)
 - 0,1 mM EDTA (pH 8,0)
- Priprema se neposredno prije uporabe iz sterilnih otopina.

50 % PEG₄₀₀₀

- 50 g PEG₄₀₀₀ otopi se u 50 mL deionizirane vode i dopuni vodom do 100 mL. Otopina se sterilizira u autoklavu i čuva pri sobnoj temperaturi.

3.1.4.5. Otopine za gel-elektroforezu

Agarozni gel

- priprema se otapanjem agaroze u TBE puferu (0,5 x) koji se pripremi razrjeđivanjem TBE pufera (10 x). Koncentracija agaroze u gelu može biti od 7 do 20 g/L, ovisno o veličini fragmenata koji se razdvajaju elektroforezom.

Boja za nanošenje uzorka (6 x)

- bromfenol plavo 0,03%
- ksilen cijanol FF 0,03 %
- glicerol 60 %
- SDS 1 %
- 100 mM EDTA pH 8,0

Otopina se može sterilizirati filtracijom i čuva se pri 4 °C.

Etidij-bromid

- Osnovna otopina priprema se u koncentraciji od 10 mg/mL, ne sterilizira se i čuva se pri 4 °C u tamnoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine u jednu litru deionizirane vode i također čuva u tamnoj boci.

TBE pufer (10 x)

- | | |
|-------------------|----------|
| ▫ Tris | 108 g/L |
| borna kiselina | 55 g/L |
| 0,5 M EDTA pH 8,0 | 40 mL/L. |

3.1.4.6. Otopine za hibridizaciju DNA po Southern-u

Navedene otopine ne moraju biti sterilne.

1 M amonijev acetat

- Priprema se razrjeđivanjem 8 M amonijevog acetata.

0,25 M HCl

- Priprema se razrjeđivanjem koncentrirane kloridne kiseline (22 mL/L).

DNA-nosač (nespecifična DNA)

- DNA sperme haringe otopljena u TE-puferu pH 8,0 u koncentraciji od 20 mg/mL. Čuva se pri -20 °C.

0,4 M natrijev hidroksid

- 18,2 g natrijevog hidroksida otopi se u deioniziranoj vodi i dopuni vodom do 100 mL.

Natrijev hidroksid/amonijev acetat

- 0,5 M natrijev hidroksid
1 M amonijev acetat.

Otopina A

- | | |
|-------------------|--------|
| ▫ SSC (20 x) | 10 mL |
| 10 % SDS | 1 mL |
| deionizirana voda | 89 mL. |

Otopina B

- | | |
|-------------------|----------|
| ▫ SSC (20 x) | 0,5 mL |
| 10 % SDS | 1,0 mL |
| deionizirana voda | 98,5 mL. |

Otopina za predhibridizaciju - za 100 mL otopine

- SSC (20x) 25,0 mL
- smjesa za sprječavanje nespecifičnih interakcija („blocking reagent“) 1,0 g
- 10 % natrijeva sol N-lauroil sarkozina 1,0 mL
- 10 % SDS 200 μ L.

Otopina za hibridizaciju

- Ima isti sastav kao otopina za predhibridizaciju samo što sadrži i 20-50 ng/mL obilježene DNA (DNA-sonde) te 0,1 mg/mL nespecifične DNA (DNA nosača). Priprema DNA-sonde opisana je u poglavlju 3.2.5.2.

Pufer 1

- 0,1 M Tris-HCl pH 7,5
- 0,15 M natrijev klorid.

Pufer 2

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

Pufer 3

- 1 M Tris pH 9,7 50 mL
- 5 M natrijev klorid 10 mL
- 1 M magnezijev klorid 25 mL
- pH 9,5 se podese dodatkom HCl i dopuni deioniziranom vodom do 500 mL.

SSC (20 x)

- 3 M natrijev klorid
- 0,3 M natrijev citrat.

3.1.5. Kemikalije, enzimi i membrane

5-FOA	„Fermentas International Inc.“, Ontario, Kanada
Agaroz	„Appligene“, Illkirch, Francuska
Apsolutni etanol	„Kemika“, Zagreb, Hrvatska
DNA bakteriofaga λ	„Fermentas International Inc.“, Ontario, Kanada
EDTA	„Kemika“, Zagreb, Hrvatska

Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA, te odgovarajući puferi	„New England Biolabs“, Ipswich, MA, SAD, „Roche Applied Science“, Indianapolis, IN, SAD ili „Pharmacia Biotech“, San Francisco, SAD, „Fermentas International Inc.“, Ontario, Kanada
Etidij-bromid	„Roche Applied Science“ Indianapolis, IN, SAD
Izopropanol	„Kemika“, Zagreb, Hrvatska
Kemikalije za pripremu podloga	„Difco“, Detroit, SAD i „Merck“, Darmstadt, Njemačka
Membrane (najlonske, pozitivno nabijene) i komplet kemikalija za hibridizacije DNA po Southern-u	„Roche Applied Science“ Indianapolis, IN, SAD
PEG	„Fluka“, Buchs, Švicarska
Ribonukleaza A	„Sigma-Aldrich“, Buchs, Švicarska
Sorbitol	„Barr“, Zagreb, Hrvatska
Tris	„Sigma-Aldrich“, Buchs, Švicarska
Zimoliza (Zymolyaze 20-T)	„Seikugaku Kogyo Co.“, Tokyo, Japan
Kemikalije za pripremu ostalih otopina	„Fluka“, Buchs, Švicarska, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska i „Alkaloid“, Skoplje, Makedonija

3.2. Metode

3.2.1. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA

3.2.1.1. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom

DNA se najčešće taloži amonijevim acetatom i etanolom i to tako da se volumenu DNA doda 1/3 volumena 8 M amonijevog acetata i 8/3 volumena apsolutnog etanola. Uzorak se čuva najmanje 2 sata pri -20 °C, a talog DNA dobije se centrifugiranjem 20 minuta na 14000 okretaja u minuti pri 4 °C.

3.2.1.2. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol

Otopini DNA doda se 0,5 volumena fenola i 0,5 volumena smjese kloroform/izoamilni alkohol, snažno se promiješa te centrifugira 2 minute na 12000 okretaja u minuti. Gornja faza prenese se u novu kivetu i cijeli postupak ponavlja sve dok se nakon centrifugiranja ne prestane

pojavljivati proteinski talog (između gornje i donje faze). Nakon toga se gornjoj fazi (u novoj kivetu) doda jednaki volumen smjese kloroform/izoamilni alkohol, snažno promiješa, te nakon centrifugiranja (2 minute na 12000 okretaja u minuti) gornja faza prenese u novu kivetu.

3.2.1.3. Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena

Za izolaciju dvolančanog plazmida korištena je standardna metode alkalne lize (Sambrook i Russel, 2001), uz manje modifikacije.

500 mL prekončne kulture bakterije *Escherichia coli* centrifugira se deset minuta na 5000 okretaja u minuti te se talog resuspendira u 10 mL GTE-puferu i ostavi 10 minuta na ledu. Suspenziji se doda 20 mL otopine natrijev hidroksid/SDS te se sve blago promiješa i ponovo ostavi 10 minuta na ledu. Nakon toga, doda se 15 mL 3 M natrijevog acetata, inkubira 20 minuta pri -20 °C te centrifugira 15 minuta na 15000 okretaja u minuti. Supernatant se prebaci u novu kivetu i ponovo centrifugira pri istim uvjetima, prelije se u novu kivetu, odredi mu se volumen i pomiješa s 0,6 volumena izopropanola. Nakon inkubacije od 15 minuta pri sobnoj temperaturi centrifugira se 30 minuta na 10000 okretaja u minuti te se supernatant odbaci, a talog ispere hladnim 70 %-tnim etanolom te otopi u 400 µL TE-puferu i fenolizira (poglavlje 3.2.1.2.). Plazmidna DNA taloži se amonijevim acetatom i apsolutnim etanolom (poglavlje 3.2.1.1.) i otopi u 300 mL TE-puferu pH 8,0 nakon čega se DNA još jednom pretaloži amonijevim acetatom i etanolom te otopi u TE-puferu pH 8,0 do koncentracije od 1 µg/µL.

3.2.1.4. Izolacija kvaščeve DNA iz stanica uzgojenih u tekućoj podlozi

Za izolaciju kvaščeve DNA korištena je metoda koju su opisali Winston i sur. (1983). 4 mL kulture kvasca u stacionarnoj fazi centrifugira se 5 minuta na 5000 okretaja u minuti te se talog stanica ispere s 3 mL deionizirane vode, zatim s 3 mL SCE i na kraju otopi u 200 µL SCE. Nakon dodatka 20 µL zimolijaze 20-T stanice se inkubiraju 1 sat na 37 °C te im se doda 800 µL STE i inkubira 20 minuta pri 70 °C. Uzorci se ohlade u ledu te im se doda 200 µL 3 M kalijevog acetata i ostavi u ledu (pri 4 °C) još najmanje 90 minuta. Nakon centrifugiranja 30 minuta na 15000 okretaja u minuti, 970 µL supernatanta se prenese u novu kivetu uz dodatak 630 µL izopropanola. Nakon centrifugiranja 20 minuta na 14000 okretaja u minuti pri 4 °C talog DNA se osuši vakuum sisaljkom i otopi u 300 µL TE-puferu pH 8,0 te pretaloži amonijevim acetatom i etanolom.

3.2.2. Cijepanje i modifikacija DNA

Cijepanje i modifikacija DNA provedeni su prema uputama proizvođača restriksijskih i modifikacijskih enzima („New England Biolabs” Ipswich, MA, SAD; „Roche Applied Science“ Indianapolis, IN, SAD; „GE Healthcare Bio-Sciences“ AB, Uppsala, Švedska; „Fermentas International Inc.“, Ontario, Kanada).

3.2.3. Transformacija kvašćevih stanica litijevim acetatom

Jedna kolonija kvasca s krute kompletne podloge prenese se u 200 mL tekuće kompletne podloge i preko noći uz aeraciju inkubira pri 28 do 30 °C do koncentracije stanica od 2 do 5 x 10⁷ st/mL. Točan broj stanica odredi se brojanjem u Thoma-ovoj komorici. Stanice se izdvoje centrifugiranjem 5 minuta pri 4000 okretaja u minuti, isperu s 30 mL sterilne deionizirane vode, a zatim se ponovo isperu sa 1 mL sterilne deionizirane vode centrifugiranjem pri istim uvjetima. Isprane stanice ponovo se resuspendiraju u 1 mL sterilne deionizirane vode te se 100 µL suspenzije stanica podijeli u kivete. Stanice se ponovno centrifugiraju 5 minuta pri 4000 okretaja u minuti i iz svake kivete se ukloni 75 µL supernatanta.

Talog stanica se pomiješa sa do 10 µL otopine DNA i 350 µL smjese za transformaciju i ostavi 40 minuta na 28 °C. Stanice se nakon toga podvrgnu toplinskom šoku pri 42 °C tijekom 40 min. Nakon toplinskog šoka uzorci se centrifugiraju 5 minuta pri 4000 okretaja u minuti i ukloni se 350 µL supernatanta. Stanice se resuspendiraju u 180 µL sterilne deionizirane vode i nacijepe na selektivne podloge. Da bi se odredilo preživljenje stanica, na kompletne YPD podloge nacijepljuje se peto i šesto decimalno razrijeđenje suspenzije stanica prije dodavanja DNA i nakon resuspendiranja stanica u sterilnoj deioniziranoj vodi na kraju transformacije. Rezultati transformacije vide se nakon 3 do 5 dana inkubacije pri 28 do 30 °C.

3.2.4. Gel-elektroforeza

Otopljeni agarozni gel (opisan u poglavlju 3.1.4.5.) ohladi se na oko 60 °C i izlije u nosač gela na koji se postavi češalj za formiranje jažica. Kada se gel skrutne, izvadi se češalj, a nosač gela se postavi u kadicu za elektroforezu u koju se ulije TBE-pufer (1 x) tako da sloj pufera iznad gela bude debeo oko 1 mm. Uzorci DNA pomiješaju se s bojom za nanošenje uzoraka u odnosu 6:1 i unesu mikropipetom u jažice na gelu. Elektroforeza se u kadicama GNA 100 najčešće provodi pri naponu do 70 V u vremenu od 1-3 sata (ovisno o koncentraciji agaroze i veličini fragmenata DNA koji se analiziraju). Za elektroforezu DNA korišten je 0,8 %-tni

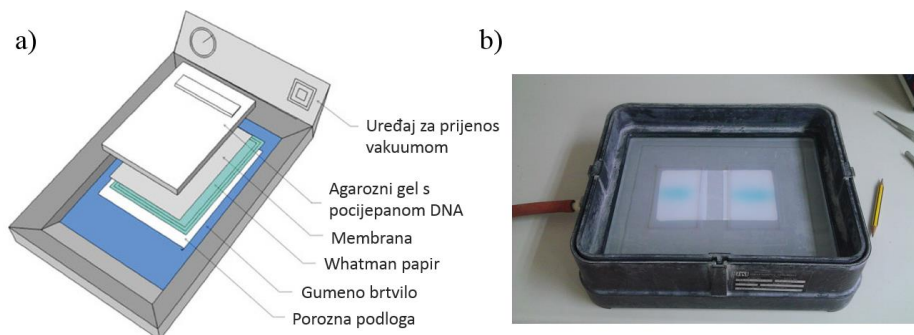
agarozni gel i TBE-pufer. Nakon provedene elektroforeze DNA se vizualizira namakanjem gela u otopini etidij-bromida (15 do 20 minuta) te izlaganju ultraljubičastom svjetlu. Gel se fotografira kroz crveni filter.

3.2.5. Metoda hibridizacije DNA po Southern-u

3.2.5.1. Princip metode

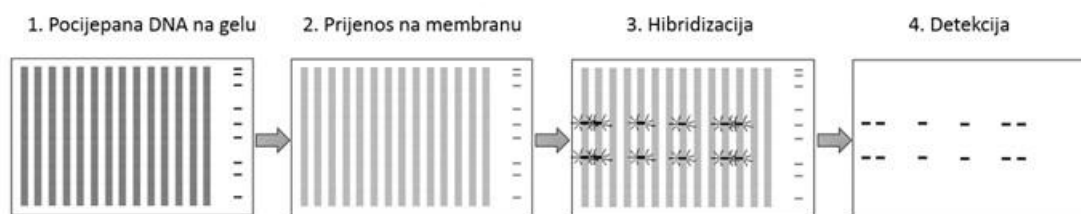
Hibridizacija po Southern-u temelji se na specifičnom sparivanju (hibridizaciji) neradioaktivno obilježene DNA sonde s komplementarnom sekvencom genoma kvasca.

Najprije se izolira DNA iz stanica uzgojenih do stacionarne faze rasta (poglavlje 3.2.1.4.) te se pocijepa odgovarajućim restrikcijskim enzimom. Nakon toga provodi se gel-elektroforeza (poglavlje 3.2.4.), a nakon završetka gel se ispiru u alkalnoj otopini koja uzrokuje depurinaciju DNA (fragmentiranje) te slijedi prijenos DNA s gela na membranu. Prijenos se provodi 90 minuta pomoću uređaja za prijenos vakuumom uz podtlak od 15 kPa, (Slika 5), a kako je najlonska membrana pozitivno nabijena, fragmenti DNA ostaju fiksirani na membrani na poziciji koja odgovara onoj na gelu.



Slika 5. Shematski prikaz uređaja za prijenos DNA s gela na membranu pomoću vakuuma (Kimura i sur. 2010.) (a) i fotografija uređaja iz Laboratorija (b)

Slijedi ispiranje membrane, a zatim inkubacija u predhibridizacijskoj otopini (poglavlje 3.1.4.6.) koja zasićuje membranu i sprječava nespecifično vezanje probe na membranu. Nakon toga, membrana se ispiru u hibridizacijskoj otopini koja je istog sastava kao i predhibridizacijska otopina, ali još k tome sadrži sondu sa dioksinom obilježenim deoksiuridin-trifosfatom (DIG-dUTP). Nakon hibridizacije, slijedi detekcija tako što se na sondu veže antitijelo antiDIG-fosfataza te indukcija reakcije dodatkom supstrata (5-bromo-4-kloro-3'-indolil fosfat) i indikatora (NBT) koji daje ljubičasto obojenje. Shematski prikaz prijenosa DNA i obilježavanja sondom prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz gela i membrane tijekom provođenja hibridizacije DNA po Southernu, www.bio.davidson.edu

Hibridizacija DNA po Southern-u provodila se pomoću kompleta kemikalija za neradioaktivno obilježavanje i otkrivanje homologne DNA („Roche Applied Science“) prema uputama proizvođača, uz manje modifikacije. Navedene količine pufera, za posthibridizacijsko ispiranje i imunološko otkrivanje (detekciju), potrebne su za membranu površine 100 cm², a sva ispiranja (ako nije drugačije naglašeno) odvijaju se pri sobnoj temperaturi uz blago potresanje.

3.2.5.2. Priprema DNA sonde

DNA sonde sintetizirane su na dva načina: metodom nasumične početnice i lančanom reakcijom polimerazom.

3.2.5.2.1. Priprema DNA sonde metodom nasumične početnice

DNA bakteriofaga λ koristi se kao standard za elektroforezu pa sonda mora biti komplementarna cijelom genomu bakteriofaga λ . Ova sonda sintetizirana je metodom nasumične početnice.

Smjesa za sintezu DNA sonde za hibridizaciju sa genomom bakteriofaga λ :

DNA faga λ (100 ng) (potrebno prethodno denaturirati)	13 μ L
Smjesa heksanukleotida	3 μ L
Smjesa deoksiribonukleozid-trifosfata i DIG-dUTP	3 μ L
Klenow enzim	1 μ L

Smjesa za sintezu DNA-sonde za hibridizaciju sa genomom bakteriofaga λ priprema se tako da se 13 μ L otopine koja sadrži 100 ng DNA-kalupa (DNA bakteriofaga λ) denaturira (5 minuta pri 95 °C), a zatim naglo ohladi u ledu te joj se doda 3 μ L smjese heksanukleotida, 3 μ L smjese deoksiribonukleozid-trifosfata i DIG-dUTP i 1 μ L Klenow-og enzima. Nakon inkubacije 18

sati pri 37 °C, reakcija se zaustavlja dodatkom 1 µL 0,5 M EDTA pH 8,0, a DNA se istaloži dodatkom 2 µL 5 M litijevog klorida i 75 µL ledenog apsolutnog etanola i inkubacijom najmanje 2 sata pri -20 °C. Talog dobiven centrifugiranjem otopi se u 200 µL TE pufera pH 8,0.

3.2.5.2.2. Priprema DNA sonde lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom (Mullis i sur., 1986) provedeno je radi sinteze digoksinom (DIG) obilježene sonde za hibridizaciju s genom *ADE2* iz kvasca *S. cerevisiae*.

Reakcijska smjesa volumena 50 µL bila je slijedećeg sastava:

DNA-kalup (izoliran iz gela)	4,00 ng/µL
početnice	1,00 pmol/µL
pufer (10x)	5,00 µL
deoksiribonukleozid-trifosfati	4 x 0,2 µM
Taq polimeraza	jedna jedinica
smjesa za obilježavanje	5,00 µL
sterilna deionizirana voda	do 50,00 µL

Reakcijska smjesa denaturirana je 5 minuta pri 94 °C te je provedeno je 30 ciklusa umnažanja. Jedan ciklus umnažanja sastoji se od 3 koraka:

- 1) Denaturacija dvolančane DNA (30 sekundi pri 95 °C)
- 2) Komplementarno sparivanje klica s kalupom (30 sekundi pri 52 °C)
- 3) Sinteza DNA (180 sekundi pri 72 °C)

Nakon završenih 30 ciklusa slijedi završna sinteza (10 minuta pri 72 °C).

Obilježena DNA sonda može se čuvati u otopini za hibridizaciju pri -20 °C i može se upotrijebiti više puta, ali ih je potrebno denaturirati (5 minuta pri 95 °C) neposredno prije svake nove upotrebe.

3.2.5.3. Prijenos DNA na membranu

Nakon provedene gel-elektroforeze i vizualizacije DNA, agarozni gel se 20 minuta inkubira u 0,25 M kloridnoj kiselini te se nakon kratkog ispiranja u destiliranoj vodi inkubira 20 do 25 minuta u otopini natrijev hidroksid/amonijev acetat. Prijenos DNA na membranu traje 1,5 sat,

a provodi se u uređaju za prijenos vakuumom („Pharmacia Biotech“) uz podtlak od 15 kPa pri čemu je gel uronjen u 0,4 M natrijev hidroksid. Nakon završenog prijenosa membrana se ispere u 1 M amonijevom acetatu, suši 15 minuta pri 37 °C te 20 minuta inkubira pri 120 °C.

3.2.5.4. Predhibridizacija i hibridizacija

Predhibridizacija se provodi 2 do 3 sata pri 65 °C uz lagano potresanje u zataljenoj plastičnoj vrećici s oko 0,5 mL otopine za predhibridizaciju po 1 cm² membrane. Nakon završene predhibridizacije, otopina za predhibridizaciju zamijeni se s oko 5 do 10 puta manjim volumenom otopine za hibridizaciju i provodi preko noći (18 h) u istim uvjetima kao i predhibridizacija. Po završenoj hibridizaciji membrana se, uz blago potresanje dva puta po 5 minuta, ispere s 50 mL otopine A pri sobnoj temperaturi, a zatim još dva puta po 15 minuta sa 25 mL otopine B pri temperaturi od 65 °C.

3.2.5.5. Detekcija

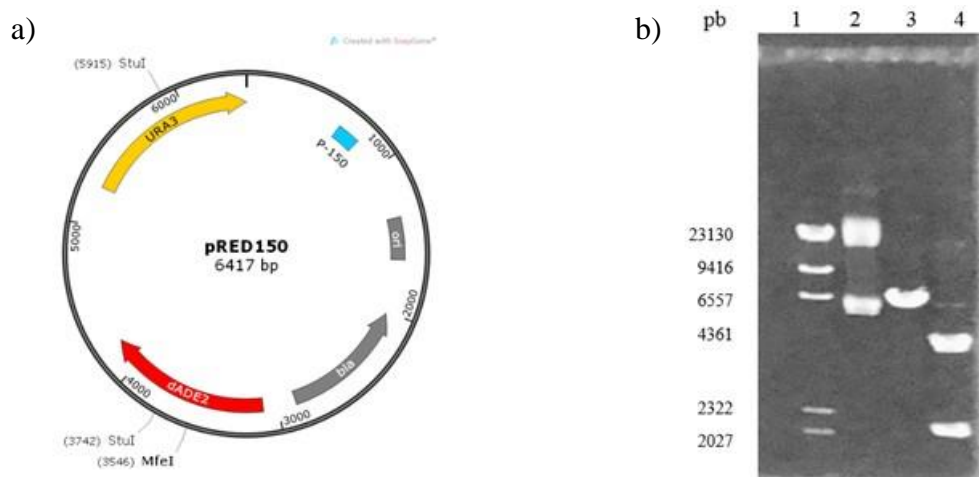
U svrhu detekcije, membrana se kratko ispere u 100 mL pufera 1, zatim se 1 sat ispire u 100 mL pufera 2, a onda 30 minuta u 20 mL pufera 2 u kojem se nalazi 4 µL kompleksa antitijela i alkalne fosfataze. Nakon ispiranja dva puta po 15 minuta u 100 mL pufera 1, membrana se kratko ispere u puferu 3 te zatali u plastičnu vrećicu sa 10 mL pufera 3 uz dodatak 35 µL x-fosfata (5-bromo-4-kloro-indolil-fosfat) i 45 µL NBT-a (nitrozo-plavi-tetrazolij) i inkubira u mraku pri 37 °C do pojave tamno obojenih vrpca (20 minuta do 24 sata). Reakcija se zaustavlja ispiranjem velikom količinom deionizirane vode nakon čega se membrana osuši na zraku.

4. REZULTATI

Tema ovog rada je istraživanje uspješnosti genskog ciljanja u prirodnim izolatima (sojevima) kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Stoga su heterotalični, haploidni sojevi NCYC 3612 (E5 α) i NCYC 3609 (2421 α) transformirani plazmidom pRED150 lineariziranim u središnjem dijelu regije *ADE2* (regija *de*) čime je integracija usmjerena u regiju *ADE2* u genomu kvasca, a spektar transformacijskih događaja utvrđen je metodom hibridizacije DNA po Southern-u. Osim toga s ciljem da se pronade genetički razlog izrazito različite uspješnosti genskog ciljanja provedena je i komparativana bioinformatička analiza genoma navedenih sojeva.

4.1. Provjera strukture plazmida pRED150

Plazmid pRED150 (poglavlje 3.1.1.1.) pocijepan je restrikcijskim endonukleazama *MfeI* i *StuI* kako bi se provjerila njegova struktura te su veličine nastalih fragmenata provjerene gel elektroforezom (Slika 7a i 7b).

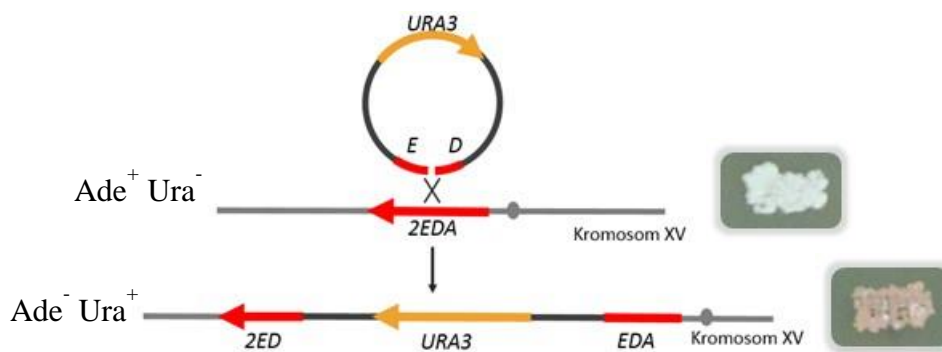


Slika 7. Restriksijska analiza plazmida pRED150. Prikazana je restriksijska mapa (a) i rezultati restriksijske analize (b). 1 – DNA standard, genom bakteriofaga λ pocijepan enzimom *HindIII*, 2 - kružni plazmid pRED150, 3 - pRED150 pocijepan s enzimom *MfeI*, 4 – pRED150 pocijepan s enzimom *StuI*.

Na Slici 7b može se vidjeti da se u uzorku 2, u kojem je kružni plazmid pRED150, pojavljuju dvije vrpce, od kojih gornja odgovara relaksiranom kružnom, a donja superzavijenom plazmidu. U uzorku 3 plazmid pRED150 pocijepan je endonukleazom *MfeI*, koja cijepa samo jednom i uočljiva je vrpca veličine 6417. U uzorku 4, nakon cijepanja endonukleazom *StuI*, pojavljuju se dvije vrpce (2173 i 4244 pb), čime je ujedno i potvrđena struktura plazmida pRED150.

4.2. Transformacija kvasca

Sojevi E5 α i 2421 α (poglavlja 3.1.3.2.1. i 3.1.3.2.2.) kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, koji su auktotrofi za uracil, transformirani su plazmidom pRED150 lineariziranim u regiji *ADE2* restrikcijskom endonukleazom *MfeI*. Cijepanjem plazmida u regiji *ADE2* usmjerava se integracija lineariziranog plazmida upravo u homolognu regiju *ADE2* u genomu, rekombinacijom „krajevi-unutra“ (poglavlje 1.2.1.). Kako se na plazmidu nalazi samo središnji dio gena *ADE2*, integracijom plazmida dolazi do inaktivacije gena *ADE2* u genomu te transformanti postaju auktotrofi za adenin (Slika 8). Zahvaljujući selektivnom markeru *URA3*, koji se nalazi na plazmidu, transformanti su selekcionirani na kemijski definiranoj podlozi koja ne sadrži uracil.



Slika 8. Shematski prikaz promjene fenotipa kvasca prije i nakon transformacije.

4.2.1. Uspješnost genskog ciljanja

Prije transformacije još je jednom provjeren fenotip i boja sojeva E5a, 2421a, E5 α i 2421 α na podlozi bez uracila i na podlozi bez adenina te na kompleksnoj podlozi, a kao kontrole su poslužili sojevi kvasca iz skupine FF i BY (poglavlja 3.1.3.2.3. i 3.1.3.2.4.), kojima je već provjeren genotip i fenotip (Slika 9a).

Ura⁺ transformanti precijepljeni su na kemijski definiranu podlogu bez adenina te na kompleksnu podlogu kako bi se odredila boja to jest fenotip pojedinog transformanta. Naime, transformanti kod kojih je došlo do inaktivacije gena *ADE2* ugradnjom plazmida pRED150, bili su crveni zbog nakupljanja intermedijera u metabolizmu adenina koji je crvene boje (Rébora i sur., 2001). Dodatno, kvasci su preslikani na kemijski definiranu podlogu koja ne sadrži adenin te na njoj ne mogu rasti transformanti kojima je disruptiran gen *ADE2* (Slika 9b). Crvena boja transformanta na kompleksnoj podlozi i Ade⁻ fenotip potvrda su da je u transformantima došlo do genskog ciljanja (Tablica 3).

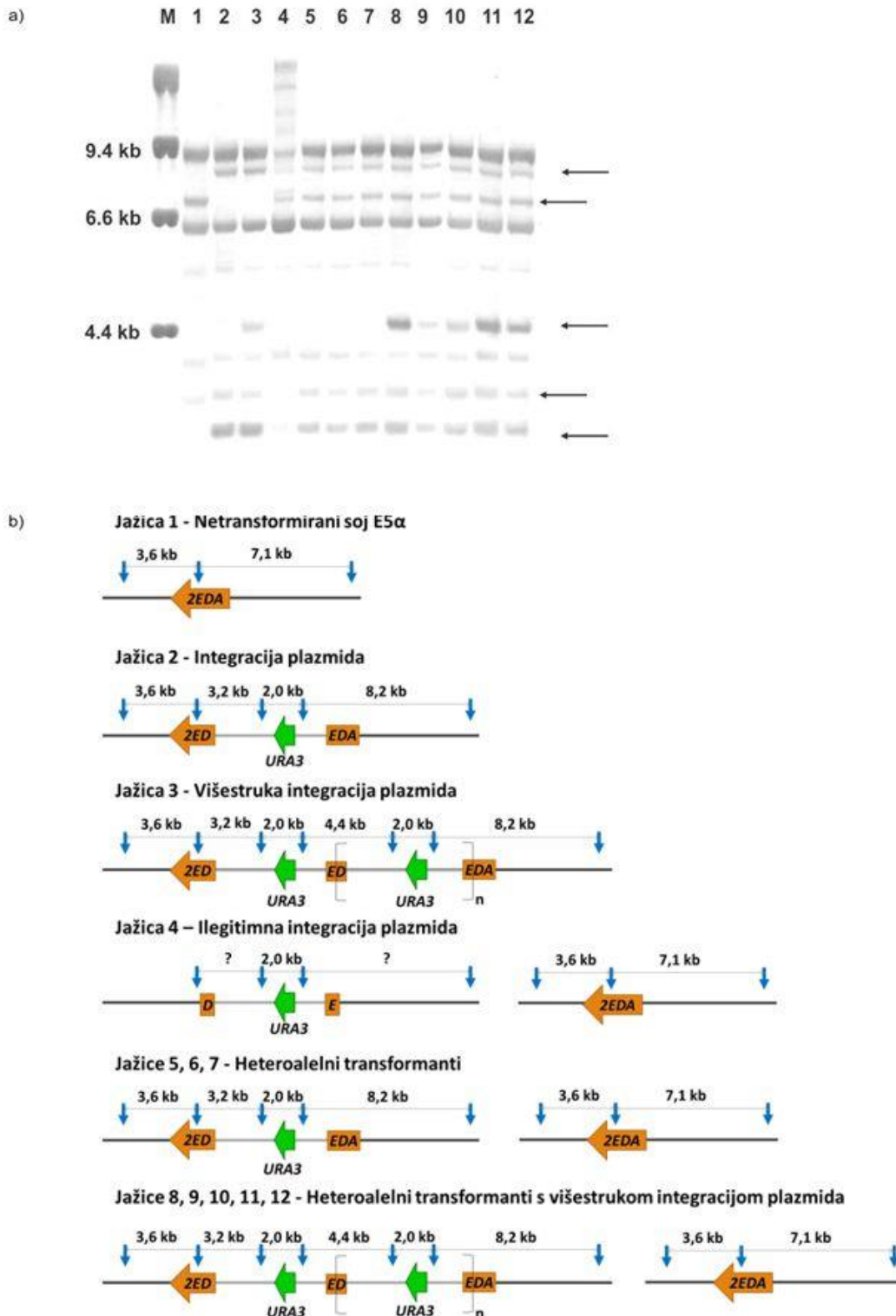
Tablica 3. Uspješnost genskog ciljanja u sojevima 2421 α i E5 α .

Soj	Ukupni broj Ura ⁺ transformanata	Broj crvenih transformanata na kompleksnoj podlozi	Broj Ade ⁻ transformanata	Postotak genskog ciljanja
2421α	88	22	22	25,0 %
E5α	117	2	2	1,7 %

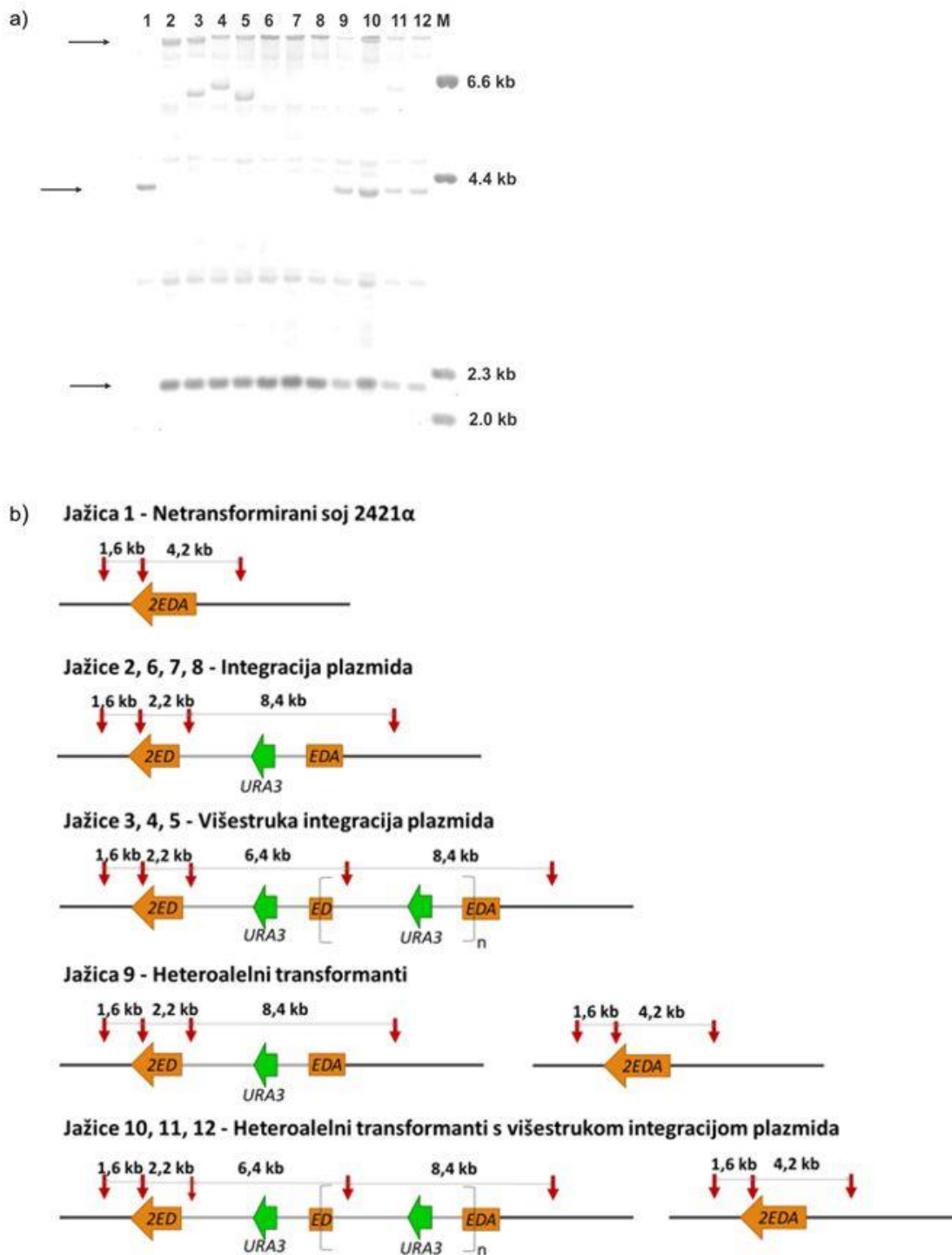
Na temelju rezultata prikazanih na Slici 9 i u Tablici 3 može se vidjeti da nisu svi transformanti nastali ciljanom integracijom plazmida u gen *ADE2*. Naime, 75 % transformanata u soju 2421 α i čak 98,7 % transformanata u soju E5 α posljedica su aberantnih transformacijskih događaja (poglavlje 1.3.), to jest integracije lineariziranog plazmida u druge dijelove genoma.

4.2.2. Spektar aberantnih transformacijskih događaja

Kako bi se odredio spektar (aberantnih) transformacijskih događaja provedena je molekularna analiza transformanata hibridizacijom po Southern-u (poglavlje 3.2.5.). Analizirano je 30 od ukupno 117 transformanata (25,64 %) iz soja E5 α i 28 od ukupno 88 (31,82 %) iz soja 2421 α . Rezultati molekularne analize i shematsko objašnjenje aberantnih transformacijskih događaja prikazani na Slikama 10 (soj E5 α) i 11 (soj 2421 α), a rezultati za oba soja u Tablici 4.



Slika 10. Rezultati molekularne analize (a) i shematski prikaz aberantnih transformacijskih događaja (b) nastalih transformacijom soja E5 α lineariziranim plazmidom pRED150. Pri hibridizaciji po Southern-u korištene su sonde ADE2 i λ . M - DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom *Hind*III; 1 genomska DNA netransformiranog soja, 2-12 genomska DNA transformanata pocijepana endonukleazom *Nde*I. b) Shematski prikaz događaja detektiranih molekularnom analizom. Plave strelice označavaju restrikcijska mjesta *Nde*I, fragment veličine 2,0 kb ne hibridizira sa sondom ADE2.



Slika 11. Rezultati molekularne analize (a) i shematski prikaz aberantnih transformacijskih događaja (b) nastalih transformacijom soja 2421 α lineariziranim plazmidom pRED150. Pri hibridizaciji po Southern-u korištene su sonde ADE2 i λ : M - DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom *Hind*III; 1 genomska DNA netransformiranog soja 2421 α , 2-12 genomska DNA transformanata pocijepana endonukleazom *Ase*I. b) Shematski prikaz događaja detektiranih molekularnom analizom: Crvene strelice označavaju restrikcijska mjesta *Ase*I.

Tablica 4. Rezultati molekularne analize hibridizacijom po Southern-u za sojeve E5 α i 2421 α . Naznačen je broj odgovarajućih transformacijskih događaja te broj analiziranih crvenih (Ade⁻) i bijelih (Ade⁺) transformanata u odnosu na ukupni broj odgovarajuće klase transformanata za određeni soj.

Molekularni događaj	Broj analiziranih transformanata u soju E5 α		Broj analiziranih transformanata u soju 2421 α	
	crveni (Ade ⁻)	bijeli (Ade ⁺)	crveni (Ade ⁻)	bijeli (Ade ⁺)
Integracija plazmida	1	-	12	-
Višestruka integracija plazmida	1	-	10	-
Heteroalelni transformanti	-	22	-	4
Heteroalelni transformanti s višestrukom integracijom plazmida	-	5	-	1
Ilegitimna integracija	-	1	-	1
Analizirano / Ukupni broj odgovarajuće klase transformanata	2 / 2	28 / 115	22 / 22	6 / 66

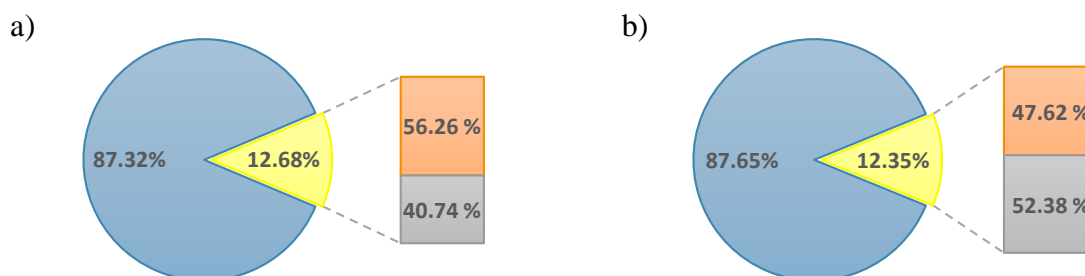
U soju E5 α analizirana su oba crvena (Ade⁻) transformanta i 28 bijelih (Ade⁺) transformanata. Od dva Ade⁻ transformanta, jedan je nastao integracijom jedne molekule plazmida u regiju *ADE2*, dok je drugi posljedica višestruke integracije. Analiza Ade⁺ transformanata pokazala je da je jedan posljedica ilegitimne integracije, a čak 27 / 28 (96,43 %) analiziranih je heteroalelno (od čega je u pet heteroalelnih transformanata došlo do višestruke integracije plazmida), to jest nastalo duplikacijom ciljnog kromosoma. Preračunavanjem na ukupni broj dobivenih Ura⁺ transformanata možemo zaključiti da ih je čak 94,87 % (111 / 117) heteroalelno.

U soju 2421 α , od 28 analiziranih transformanata, do integracije plazmida došlo je u 12 / 22 (54,54 %) Ade⁻ transformanata dok se višestruka integracije plazmida dogodila u dodatnih 10 / 22 (45,45 %) Ade⁻ transformanata. Jedan Ade⁺ transformant nastao je ilegitimnom integracijom plazmida, dok je 5 / 6 (83,3 %) Ade⁺ transformanata nastalo duplikacijom ciljnog kromosoma (od čega je u jednom heteroalelnom transformantu došlo do višestruke integracije). Ukoliko se preračuna na ukupni broj Ura⁺ transformanata, udio heteroalelnih transformanata je 62,5 % (55 / 88) što je znatno manje nego u soju E5 α ($p < 0,0001$).

4.3. Analiza polimorfizama u genomima sojeva E5 α i 2421 α

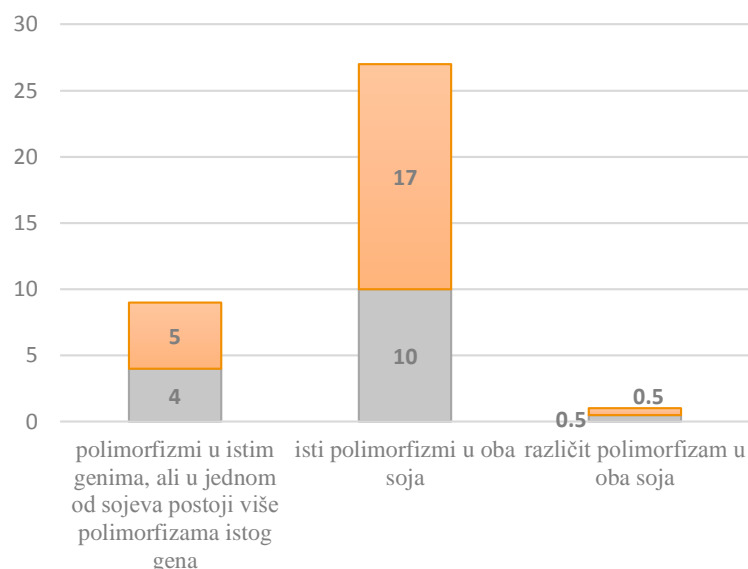
Uspješnost genskog ciljanja je znatno uspješnija u soju 2421 α (25 %), nego u soju E5 α (1,7 %), no to je još uvijek bitno manje nego u laboratorijskim sojevima u kojima uspješnost genskog ciljanja iznosi gotovo 100 %. Kako bi pokušali otkriti je li smanjena uspješnost genskog ciljanja u sojevima 2421 α i E5 α posljedica polimorfizama ili inaktivacije nekog neesencijalnog gena provedena je bioinformatička analiza kojom su detektirani polimorfizmi jednog nukleotida (*engl.* Single Nucleotide Polymorphisms, SNP), a sekvencije su uspoređene sa sekvencijom laboratorijskog soja S288C (Liti i sur., 2009).

U soju 2421 α polimorfizmi se pojavljuju u 213 gena, dok se u soju E5 α polimorfizmi se pojavljuju u 170 gena. Od gena s detektiranim polimorfizmima, samo dio bi mogao utjecati na neki od aspekata metabolizma DNA i takvih je 21 (12,35 %) u soju E5 α i 27 (12,68 %) u soju 2421 α . Grafički prikaz bioinformatičke analize gena prikazan je na Slikama 12 i 13.



Slika 12. Grafički prikaz bioinformatičke analize gena s polimorfizmima u sojevima 2421 α (a) i E5 α (b). Plavom bojom označen je udio gena koji ne utječu na metabolizam DNA, a žutom udio gena koji bi mogli imati utjecaj na različite aspekte metabolizma DNA. Crvena boja označava udio gena uključenih u metabolizam DNA u kojima dolazi do pomaka okvira čitanja, a sivo u kojima ne dolazi do pomaka okvira čitanja.

Usporedbom sekvencija DNA sojeva 2421 α i E5 α (Slika 13), može se uočiti i da se polimorfizmi pojavljuju u istih 37 gena. U 9 gena (*NRP1*, *MOT3*, *GAL11*, *PUF6*, *YDL242W*, *YER186C*, *YGL118C*, *YKL102C*, *YLR361C-A*) pojavljuje se više različitih polimorfizama u jednom od sojeva, a u 27 gena pojavljuju se isti polimorfizmi. Samo jedan gen (*YGL036W*) ima različite polimorfizme u oba soja te u ovom genu dolazi do pomaka okvira čitanja u soju 2421 α , ali ne i u soju E5 α .



Slika 13. Analiza sekvencija 37 gena koji imaju polimorfizme i u soju E5α i u soju 2421α. Crveno je označen broj gena kod kojih je došlo do pomaka okvira čitanja, a sivo broj gena s polimorfizmima koji ne uzrokuju pomak okvira čitanja.

Popis gena kandidata koji bi mogli utjecati na različite aspekte metabolizma DNA nalazi se u Tablici 5 (soj 2421α) i Tablici 6 (soj E5α).

Tablica 5. Popis gena s pomakom okvira čitanja koji bi mogli biti odgovorni za smanjenu uspješnost genskog ciljanja u soju 2421α.

Funkcija proteina	Gen	Vrsta mutacije
Popravak DNA	YBR272C / <i>HSM3</i>	Delecija
	YFL061W / <i>DDI2</i>	Insercija
Odgovor na stres tijekom replikacije DNA	YGR140W / <i>CBF2</i>	Delecija
	YGR098C / <i>ESP1</i>	Delecija
	YJR127C / <i>RSF2</i>	Delecija
	YOL093W / <i>TRM10</i>	Delecija
Remodeliranje kromatina	YDL002C / <i>NHP10</i>	Delecija
	YFR037C / <i>RSC8</i>	Insercija
	YDR207C / <i>UME6</i>	Delecija
Segregacija kromosoma	YFR036W / <i>CDC26</i>	Insercija
	YPL106C / <i>SSE1</i>	Delecija
Transkripcijski faktor	YOR372C / <i>NDD1</i>	Delecija
	YLR176C / <i>RFX1</i>	Delecija
	YMR019W / <i>STB4</i>	Insercija
	YMR227C / <i>TAF7</i>	Delecija
Protein kinaza	YGL021W / <i>ALK1</i>	Delecija

Tablica 6. Popis gena s pomakom okvira čitanja koji bi mogli biti odgovorni za smanjenu uspješnost genskog ciljanja u soju E5 α .

Funkcija proteina	Gen	Vrsta mutacije
Popravak DNA	YBR272C / <i>HSM3</i>	Delecija
	YKR056W / <i>TRM2</i>	Delecija
Replikacija DNA	YNL102W / <i>POL1</i>	Insercija
	YGR250C / <i>NA</i>	Delecija
	YGL212W / <i>VAM7</i>	Insercija
Segregacija kromosoma	YOR195W / <i>SLK19</i>	Delecija
	YEL019C / <i>MMS21</i>	Delecija
Protein kinaza	YDL025C / <i>NA</i>	Delecija
Dvojbena okvira čitanja	YOR013W / <i>IRC11</i>	Delecija
	YOR235W / <i>IRC13</i>	Insercija

Kao najzanimljiviji geni kandidati iz soja E5 α , koji ujedno utječu na metabolizam DNA i imaju i pomak okvira čitanja te bi mogli i uzrokovati pojavu heteroalelnih transformanata, nameću se dva gena (*MMS21* i *SLK19*) s funkcijom u segregaciji kromosoma, dok bi u soju 2421 α za pojavu heteroalelnih transformanata mogao biti odgovoran gen *ESPI*, čiji produkt sudjeluje u razdvajanju sestrinskih kromatida te se njegova koncentracija povećava u uvjetima stresa prilikom replikacije DNA.

5. RASPRAVA

Gensko ciljanje je iznimno uspješno u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Naime, transformacija kvasca lineariziranim plazmidom gotovo uvijek rezultira integracijom u ciljni lokus i duplikacijom ciljne sekvence (rekombinacija „krajevi-unutra“, integracija plazmida, Slika 1) dok se linearni fragmenti DNA koriste za zamjenu ciljnih regija (rekombinacija „krajevi-van“, zamjena gena, Slika 2). Iako oba tipa genskog ciljanja zahtijevaju proteine uključene u homolognu rekombinaciju, ova dva procesa se znatno razlikuju. Kod integracije plazmida, odnosno rekombinacije „krajevi-unutra“, krajevi transformirajuće DNA su nakon pronalaska homologije okrenuti jedan prema drugome, dok su prilikom zamjene gena krajevi transformirajuće DNA okrenuti prema van. Prilikom rekombinacije „krajevi-unutra“ dvolančani lom koji uvodimo da bi povećali uspješnost pronalaska ciljne sekvencije, gotovo se uvijek popravljaju prema homolognoj sekvenci u genomu, što onda rezultira i homolognom integracijom, dok je ilegitalna integracija oko 0,1 % i to je ujedno do nedavno bio jedini zabilježeni aberantni događaj u kvascu (Zgaga i sur., 2001). No kasnije se pokazalo da transformacija može rezultirati duplikacijom cijelog kromosoma koji sadrži ciljanu sekvencu. Takvi heteroalelni transformanti sadrže dva kromosoma, od kojih jedan ima početni alel, a drugi ima alel nakon genskog ciljanja i sadrži selektivni marker (Svetec i sur., 2007, Štafa i sur., 2014). Ovakvi aberantni događaji jako su rijetki prilikom rekombinacije „krajevi-unutra“ te kako je ovom radu prilikom transformacije kvasaca korišten upravo ovaj mehanizam, bilo je očekivano uspješno gensko ciljanje.

5.1. Gensko ciljanje u sojevima E5 α i 2421 α

U eksperimentu su korištena dva soja kvasca izolirana iz prirodnog staništa: soj E5 α izoliran iz vina u Francuskoj i soj 2421 α izoliran iz kaktusa *Opuntia megacantha* na Havajima. Jedinice modifikacije su bile inaktivacija gena za endonukleazu *HO* i gena *URA3* (Tablica 2). Kvasci su transformirani plazmidom pRED150 (poglavlje 4.2.) koji nosi biljeg *URA3* i središnji dio gena *ADE2*. Taj plazmid omogućuje selekciju transformanata na tri različita načina:

- 1) transformanti, za razliku od netransformiranih stanica, rastu na podlozi bez uracila;
- 2) transformanti ne rastu na podlozi bez adenina jer se ciljanjem u regiju *ADE2* ovaj gen inaktivira;
- 3) na kompleksnoj podlozi transformanti koji imaju inaktivan gen *ADE2* razvijaju crvenu boju, za razliku od ostalih koji imaju aktivan *ADE2* i koji su bijeli.

Nakon transformacije, očitani su rezultati genskog ciljanja na temelju fenotipa na selektivnim hranjivim podlogama (poglavlje 4.2.1.). Utvrđeno je da je uspješnost genskog ciljanja, odnosno udio homologne integracije plazmida 25 % u soju 2421 α i samo 1,7 % u soju E5 α (Slika 9b). Ovdje se već vidi značajna razlika u postotku integracije plazmida između ova dva soja, a s obzirom na to da se radi o kvascu *S. cerevisiae* i rekombinaciji „krajevi-unutra“ to je izuzetno niski postotak genskog ciljanja u oba soja. Dodatno, hibridizacijom po Southern-u analizirani su i transformanti koji nisu nastali genskim ciljanjem kako bi se odredio spektar aberantnih transformacijskih događaja (poglavlje 4.2.2., Tablica 4).

Usporedbom samo bijelih, aberantnih (Ade⁺), transformanata utvrđeno je da je u soju E5 α 96,43 % (27 / 28) heteroalelno, dok je u soju 2421 α njih 83,33 % (5 / 6) heteroalelno. Uzrok ovako velikom broju heteroalelnih transformanata može biti nestabilnost genoma, mutacije u genima odgovornim za segregaciju kromosoma u mitozu, a moguće je i da je u nekim transformantima došlo do spontane duplikacije kromosoma te su ovakvi aberantni događaji svakako zanimljivi za daljnje istraživanje.

Iako je gensko ciljanje znatno uspješnije u soju 2421 α , pokazalo se da je u oba prirodna izolata vrlo česta pojava heteroalelnih transformanata (62,5 % u soju 2421 α i 94,87 % u soju E5 α) te su u ovom radu istraženi i polimorfizmi jednog nukleotida koji bi mogli biti uzrok ovom aberantnom događaju.

5.2. Analiza polimorfizama u sojevima E5 α i 2421 α

Kako su ovi sojevi sekvencionirani, pomoću bioinformatičke analize polimorfizama (poglavlje 4.3., Slike 12 i 13) određeni su geni u sojevima E5 α i 2421 α koji bi mogli biti odgovorni za razlike u genskom ciljanju u ova dva soja i koji bi mogli imati ulogu u nestabilnosti njihovog genoma. U Tablicama 5 i 6 navedeni su geni koji su izdvojeni iz popisa od 213 gena s polimorfizmima u soju 2421 α , odnosno od 170 gena u soju E5 α .

U soju 2421 α pronađeno je 27, a u soju E5 α 21 gen čiji proteinski produkti bi mogli imati utjecaj na različite aspekte metabolizma DNA, dok je usporedbom svih gena koji sadrže polimorfizme, izdvojeno je 37 gena koji imaju polimorfizme u oba soja (Slika 13). Od tih 37 gena, samo jedan gen (*HSM3*, čiji je proteinski produkt uključen u popravak nesparenih i krivo sparenih baza tijekom sporog rasta kvasca) kodira za protein koji bi mogao utjecati na stabilnost genoma.

Geni koji su posebno zanimljivi su oni koji sudjeluju u segregaciji kromosoma i razdvajanju kromatida tijekom replikacije, osobito u soju E5 α gdje je udio heteroalelnih transformanata preko 90 %. Geni *SLK19* i *MMS21* imaju mutacije koje uzrokuju pomak okvira čitanja u soju E5 α , a niti jedan od ovih gena nema mutacije u soju 2421 α . Gen *SLK19* kodira za protein koji je povezan s kinetohorama i potreban je za segregaciju kromosoma u mitozu i mejozi, dok produkt gena *MMS21* ima ključnu ulogu u razdvajanju kromatida tijekom replikacije i popravka DNA. Nasuprot tome, u soju 2421 α , mutiran je gen *ESP1*, čiji je proteinski produkt separaza i sudjeluje u razdvajanju sestrinskih kromatida te se ekspresija ovog gena povećava prilikom stresa tijekom replikacije DNA. Iako se u soju E5 α pojavljuje još 19, a u soju 2421 α još 26 gena čiji bi produkti mogli imati ulogu u duplikaciji kromosoma, mutacije u genima *SLK19* i *MMS21*, odnosno u genu *ESP1* čine se najizglednijim uzrokom česte pojave heteroalelnih transformanata prilikom integracije plazmida.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Uspješnost genskog ciljanja u soju kvasa *Saccharomyces cerevisiae* 2421 α je četiri puta, a u soju E5 α 86,82 puta niža nego u standardnim laboratorijskim sojevima, a najčešći aberantni događaj prilikom integracije plazmida je duplikacija ciljnog kromosoma.
2. Bioinformatička analiza pokazala je da bi česta duplikacija ciljnog kromosoma tijekom genskog ciljanja mogla biti posljedica mutacija u genima *MMS21* i *SLK19* u soju E5 α , odnosno u genu *ESP1* u soju 2421 α .

7. ZAHVALE

Koristim ovu priliku kako bih se zahvalila mentoru izv. prof. dr. sc. Ivanu-Krešimiru Svetecu što mi je omogućio izradu ovog rada te na korisnim savjetima, podršci i pomoći prilikom izrade i pisanja rada.

Posebno zahvaljujem višoj asistentici dr. sc. Anamariji Štafa na strpljenju, uloženom vremenu, savjetima i na pomoći u savladavanju novih eksperimentalnih tehnika rada te asistentu mag. ing. Bojanu Žunaru na pomoći prilikom bioinformatičke analize sojeva.

Također srdačno zahvaljujem svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama na iskazanoj susretljivosti i prijateljskoj atmosferi.

8. POPIS LITERATURE

- Aboussekhra, A., Chanet, R., Adjiri, A., Fabre, F. (1992) Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the *RAD51* gene, whose sequence predicts a protein with similarities to prokaryotic RecA proteins. *Mol Cell Biol* **12**, 322-3234.
- 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.
- Cliften, P., Sudarsanam, P., Desikan, A., Fulton, L., Fulton, B., Majors, J., Waterston, R., Cohen, B.A., Johnston, M. (2003) Finding functional features in *Saccharomyces cerevisiae* genomes by phylogenetic footprinting. *Science* **301**, 71-76.
- Cubillos, F.A., Louis, E.J., Liti, G. (2009) Generation of a large set of genetically tractable haploid and diploid *Saccharomyces* strains. *FEMS Yeast Res* **9**, 1217-1225.
- Davidson, Biology department (2015)
<<http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/Southernblot.html>>. Pristupljeno 12. travnja 2015.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-547.
- Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**, 536-553.
- Hinnen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R. (1978) Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 1929-1933.
- 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.
- Khurana, V., Lindquist, S. (2010) Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nat Rev Neurosci* **11**. 436-449.

- Kimura, M., Stone, R.C., Hunt, S.C., Skurnick, J., Lu, X., Cao, X., Harley, C.B., Aviv, A. (2010) Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nature Protocols* **5**, 1596-1607.
- Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Vassiliki, K., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O'Kelly, M.J.T., van Oudenaarden, A., Barton, D.B.H., Bailes, E., Nguyen, A.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* **458**, 337-341.
- Longo, V.D., Shadel, G.S., Kaeberlein, M., Kennedy, B. (2012) Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab* **16**, 18-31.
- Madeo, F., Engelhardt, S., (2002) Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet* **41**, 208-216.
- Malkova, A., Ivanov, E.L., Haber, J.E. (1996) Double-strand break repair in the absence of *RAD51* in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7131-7136.
- Mell, J.C., Burgess, S.M. (2002) Yeast as a model genetic organism. U: Encyclopedia of Life Sciences, Mcmillan Publishers Ltd.
- Mercier, G., Berthault, N., Touleimat, N., Kepes, F., Fourel, G., Gilson, E., Dutreix, M. (2005) A haploid-specific transcriptional response to irradiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **33**, 6635-6643.
- Miklenić, M. (2015) Recombinogenicity of palindromes and quasipalindromes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* genome. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51** Pt 1, 263-273.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6354-6358.

- Oshima, Y., Takano, I. (1971) Mating types in *Saccharomyces*: their convertibility and homothallism. *Genetics* **67**, 327-335.
- Rébora, K., Desmoucelles, C., Borne, F., Pinson, B., Daignan-Fornier, B. (2001) Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol Cell Biol* **21**, 7901 – 7912.
- Rothstein, R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 202-211.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York.
- Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**, 3-41.
- Svetec, I-K., Štafa, A., Zgaga, Z. (2007) Genetic side effects accompanying gene targeting in yeast: the influence of short heterologous termini. *Yeast* **24**, 637-652.
- Štafa, A., Svetec, I-K., Zgaga, Z. (2005) Inactivation of the *SGS1* and *EXO1* genes synergistically stimulates plasmid integration in yeast. *Food Technol Biotechnol* **43**, 103-108.
- Štafa, A., Miklenić, M., Žunar B., Lisnić, B., Symington, L.S., Svetec, I-K. (2014) Sgs1 and Exo1 suppress targeted chromosome duplication during ends-in and ends-out gene targeting. *DNA Repair (Amst)* **22**, 12-23.
- Strathern, J., Hicks, J., Herskowitz, I. (1981) Control of cell type in yeast by the mating type locus: the $\alpha 1 - \alpha 2$ hypothesis. *J Mol Biol* **147**, 357-372.
- Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R., Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-1808.
- Winston, F., Chumley, F., Fink, G.R. (1983) Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 211-228.
- Zgaga, Z. (1990) Istraživanje popravka plazmidne DNA u kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
- Zgaga, Z., Gjuračić, K., Svetec, I-K., Mitrikeski, P.T., Gregorić, S. (2001) Plasmid integration in yeast: Conceptions and misconceptions. U: *Current Studies of Biotechnology*, **2**: Environment. (Knievald, Z., ured.) Croatian Society of Biotechnology, Zagreb, 135-140.

9. SAŽETAK

Uspješnost genskog ciljanja u prirodnim, biotehnoški interesantnim sojevima kvasca
Saccharomyces cerevisiae

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jedan je od najčešće korištenih modelnih organizama, prvi eukariotski organizam čiji je genom sekvencioniran i koji je transformiran stranom DNA pri čemu se DNA integrirala u genom homolognom rekombinacijom. Dva su mehanizma homologne integracije u kvascu: rekombinacija „krajevi-unutra“ pri kojoj se linearizirani plazmid ugrađuje u ciljnu regiju u genomu te rekombinacija „krajevi-van“ tijekom koje transformirajuća DNA zamjenjuje ciljni gen. Pri transformaciji lineariziranim plazmidom, transformirajuća DNA može se i nasumično ugraditi u genom ilegitimnom rekombinacijom ili uzrokovati duplikaciju ciljnog kromosoma te takve događaje zovemo aberantnim događajima. U ovom radu istražena je integracija nereplikativnog lineariziranog plazmida pRED150 u regiju *ADE2* genoma kvasca rekombinacijom „krajevi-unutra“. Korištena su dva prirodna izolata kvasca, soj E5 α izoliran iz vina i soj 2421 α izoliran iz kaktusa. Na temelju analize fenotipa i hibridizacijom po Southern-u utvrđeno je da je veći dio transformanata nastao aberantnim genetičkim događajima, što je izraženije u soju E5 α gdje je u preko 90 % transformanata došlo do duplikacije ciljnog kromosoma. U soju 2421 α je homologna integracija češća, no ona iznosi oko 25 %, što je i dalje niski postotak za kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Nadalje, sojevi su podvrgnuti bioinformatičkoj analizi kako bi se otkrilo mogu li polimorfizmi u sekvencijama imati ulogu u ovim aberantnih događajima. U soju E5 α , primijećen je pomak okvira čitanja u genima *SLK19* i *MMS21* čiji proteinski produkti sudjeluju u segregaciji kromosoma prilikom mitoze, dok je u soju 2421 α polimorfizam prisutan u genu *ESP1* čiji proteinski produkt je separaza uključena u razdvajanje sestrinskih kromatida. Upravo ova tri gena mogla bi imati ulogu u duplikaciji kromosoma prilikom integracije transformirajuće DNA u ova dva soja.

Ključne riječi: kvasac *Saccharomyces cerevisiae* / gensko ciljanje / homologna rekombinacija / rekombinacija „krajevi-unutra“ / duplikacija kromosoma

10. SUMMARY

Efficacy of gene targeting in natural, biotechnological interesting strains of yeast
Saccharomyces cerevisiae

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most widely used model organisms and it is also the first eukaryotic organism whose genome was sequenced. Additionally, it is also the first eukaryotic organism transformed via homologous recombination. There are two mechanisms of homologous integration: “ends-in” recombination which results in integration of the linearized plasmid and “ends-out” recombination which results in replacement of a targeted region with the transforming DNA fragment. The transforming DNA fragment can also integrate via illegitimate recombination in any part of the genome or it can lead to chromosome duplication (TGD, Targeted Chromosome Duplication). Those type of events are called aberrant transformation events and are rare in yeast *S. cerevisiae*. In this research integration of the linearized non-replicative plasmid pRED150 in *ADE2* region of yeast genome via “ends-in” recombination was followed. Two natural yeast isolates were used, strain E5 α was isolated from wine and strain 2421 α was isolated from cactus. Based on phenotype analysis and Southern blot hybridization it was found that big portion of the transformants arose from aberrant transformation events. These events are more frequent in E5 α strain where over 90 % of transformants have targeted chromosome duplication. In strain 2421 α homologous recombination is more frequent, but reached only 25 % that is still very low percentage for yeast *S. cerevisiae*. Furthermore, bioinformatics analysis was performed to detect any Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) that could be linked to genome instability and chromosome missegregation. Polymorphisms resulting in frameshift mutation in *SLK19* and *MMS21* genes, involved in chromosome segregation, and in *ESPI* gene, involved in sister chromatid separation, were discovered in E5 α and 2421 α strains respectively, and those three genes could be implicated in chromosome duplication during integration of transforming DNA.

Key words: yeast *Saccharomyces cerevisiae* / gene targeting / homologous recombination / “ends-in” recombination / chromosome duplication

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1991. godine u Leobenu (Austrija). Osnovnu školu pohađala sam u Podturnu, a 2006. godine upisala sam Gimnaziju Čakovec, prirodoslovno-matematički smjer. Nakon završene gimnazije, 2010. godine upisujem preddiplomski studij Biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, koji završavam u roku te stječem zvanje sveučilišna prvostupnica biotehnologije. 2013. godine upisala sam diplomski studij Molekularne biotehnologije također na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu te sam trenutno studentica druge godine diplomskog studija.