

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Antonio Zandona

Utjecaj metode za unos DNA na spektar rekombinacijskih događaja u kvascu
Saccharomyces cerevisiae

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivana-Krešimira Sveteca i neposrednim vodstvom dr. sc. Anamarije Štafa te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.

POPIS KRATICA

<i>ADE2</i>	Gen za enzim fosforibozil-aminoimidazol-karboksilazu, sudjeluje u biosintezi adenina
<i>ARS</i>	Kvaščevo ishodište replikacije
<i>bla</i>	Gen za enzim β -laktamazu, odgovoran za rezistenciju na ampicilin
<i>CEN4</i>	Centromerna regija kvaščevog kromosoma IV
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
EDTA	Etilendiamintetra octena kiselina (<i>engl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid)
EIGT	Gensko ciljanje „krajevi unutra“
EOGT	Gensko ciljanje „krajevi van“
<i>HIS3</i>	Gen za enzim imidazolglicerol-fosfat dehidratazu, sudjeluje u biosintetskom putu histidina
<i>ILVI</i>	Gen za enzim treonin deaminazu, sudjeluje u biosintezi izoleucina
kb	Kilobaza
<i>lacZ</i>	Gen za β -galaktozidazu
<i>LEU2</i>	Gen za enzim β -izopropilmalat dehidrogenazu, sudjeluje u biosintetskom putu leucina
<i>LYS2</i>	Gen za enzim α -aminoadipat reduktazu, sudjeluje u biosintezi lizina
<i>MAT</i>	Lokus na kvaščevom III. kromosomu koji određuje tip parenja
<i>MET15</i>	Gen za enzim O-acetil homoserin-O-acetil serine sulfhidrilazu, sudjeluje u biosintezi metionina
ORF	Otvoreni okvir čitanja (<i>engl.</i> open reading frame)
ori	Bakterijsko ishodište replikacije (<i>engl.</i> origin)
pb	Par baza
PEG	Polietilenglikol (<i>engl.</i> polyethylene glycol)
SDS	Natrij-dodecil sulfat (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)
TCD	Duplikacija ciljnog kromosoma (<i>engl.</i> targeted chromosome duplication)
TE	Tris-EDTA pufer (<i>engl.</i> Tris-EDTA buffer)
Tris	3-hidroksimetil-aminometan (<i>engl.</i> tris (hydroxymethyl) aminomethane)
<i>TRP5</i>	Gen za enzim triptofan-sintazu, sudjeluje u biosintezi triptofana
<i>URA3</i>	Gen za enzim orotidin-5'-fosfat dekarboksilazu, sudjeluje u biosintetskom putu uracila

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2. Transformacija, gensko ciljanje i spektar događaja.....	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	4
3. MATERIJALI I METODE	5
3.1. MATERIJALI	5
3.1.1. Plazmidi.....	5
3.1.1.1. Plazmidi pAGU2 i pAULI.....	5
3.1.1.2. Plazmid pLS42	6
3.1.2. Mikroorganizmi.....	6
3.1.2.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	6
3.1.2.2. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
3.1.2.2.1. Soj D7.....	7
3.1.2.2.2. Soj BY	7
3.1.3. Hranjive podloge i otopine	8
3.1.3.1. Hranjive podloge za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i>	8
3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
3.1.3.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA	10
3.1.3.4. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica	12
3.1.3.4.1. Otopine za transformaciju pomoću litijevog-acetata.....	13
3.1.3.4.2. Otopine za transformaciju elektroporacijom	13
3.1.3.4.3. Otopine za transformaciju protoplastiranjem	13
3.1.3.5. Otopine za gel-elektroforezu	14
3.1.3.6. Otopine za metodu po Southern-u.....	14
3.1.3.7. Kemikalije, enzimi i membrane.....	16
3.2. METODE	17
3.2.1. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA.....	17
3.2.1.1. Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena.....	17
3.2.1.2. Izolacija kvašćeve DNA iz stanica uzgojenih u tekućoj podlozi.....	18
3.2.1.3. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol	18
3.2.1.4. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom	19
3.2.1.5. Cijepanje i modifikacija DNA.....	19
3.2.2. Metode za transformaciju kvašćevih stanica	19
3.2.2.1. Transformacija kvašćevih stanica pomoću litijevog acetata	19

3.2.2.2. Transformacija kvašćevih stanica elektroporacijom	20
3.2.2.3. Transformacija kvašćevih stanica protoplastiranjem.....	21
3.2.3. Metode za vizualizaciju i detekciju DNA.....	23
3.2.3.1. Gel-elektroforeza	23
3.2.3.2. Metoda hibridizacije po Southern-u	23
3.2.3.2.1. Priprema DNA sonde metodom nasumične početnice	24
3.2.3.2.2. Priprema DNA sonde lančanom reakcijom polimerazom (PCR).....	24
3.2.3.2.2. Prijenos DNA na membranu	25
3.2.3.2.3. Predhibridizacija, hibridizacija i detekcija	26
4. REZULTATI	27
4.1. Provjera plazmida i fragmenata za transformaciju	27
4.2. Provjera sojeva	28
4.3. Transformacija kvasca.....	29
4.3.1. Utjecaj metode transformacije na preživljenje i frekvenciju rekombinacijskih događaja... 29	
4.3.2. Utjecaj metode transformacije na udio aberantnih genetičkih događaja	34
4.3.3. Utjecaj metode transformacije na spektar aberantnih genetičkih događaja.....	36
5. RASPRAVA	40
5.1. Utjecaj metode transformacije na preživljenje stanica kvasca	40
5.2. Utjecaj metode transformacije na rekombinacijske događaje	41
5.3. Utjecaj metode transformacije na spektar aberantnih događaja	43
6. ZAKLJUČCI	47
7. ZAHVALE	48
8. POPIS LITERATURE.....	49
9. SAŽETAK.....	52
10. SUMMARY.....	53

1. UVOD

1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je fakultativno aerobni kemoorganotrofni mikroorganizam, koji energiju dobiva razgradnjom ugljikohidrata (Goffeau i sur., 1996). Već dva stoljeća koristi se u tradicionalnoj biotehnologiji u proizvodnji piva i vina (Grba, 2010), a ujedno je i prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran, čime je postao preferencijalni modelni organizam za istraživanje eukariotskih procesa (Goffeau i sur., 1996, Sherman, 2002), a zadnjih desetljeća i za proizvodnju lijekova (Kjeldsen, 2000).

Kvasac ima haploidni i diploidni stanični ciklus koji su međusobno povezani parenjem. Haploidni kvasac ima set od 16 kromosoma koji su dobro okarakterizirani (Sherman, 2002) i sadrži oko 6604 otvorenih okvira čitanja (ORF-ova) (*Saccharomyces* Genome Database). U optimalnim uvjetima generacijsko vrijeme kvasca *S. cerevisiae* iznosi oko 90 minuta pri čemu iz stanice majke pupanjem nastaju stanice kćeri. *S. cerevisiae* razmnožava se spolno i nespolno (Sherman, 2002) te ovisno o informaciji koja se nalazi na *MAT* lokusu, u haploidnom obliku, može biti **a** ili α tipa parenja (Strathern, 1981). Haploidni kvasci izlučuju **a** ili α feromone, koji se vežu na receptore stanice suprotnog tipa parenja, pri čemu kvasci konjugiraju i nastaju diploidne stanice koje mogu sporulirati. Sporulacijom nastaje askus sa 4 haploidne askospore, od čega će dvije biti **a** tipa parenja, a druge dvije α tipa parenja. Nužni uvjeti za sporulaciju su heterozigotnost za tip parenja tj. **a**/ α tip parenja, G_1 faza staničnog ciklusa, nedostatak glukoze i dušika te prisutnost nefermentabilnog izvora ugljika (Herskowitz, 1988). U prirodi haploidni sojevi spontano prelaze u diploidni oblik i takva pojava se naziva homotalizam. Zbog djelovanja endonukleaze Ho haploidna stanica majka će nakon odvajanja pupa mijenjati tip parenja, pri čemu stanice različitog tipa parenja nastale pupanjem konjugiraju i stvaraju diploidnu koloniju. Nasuprot tome, haploidni laboratorijski sojevi su heterotalični i imaju stabilan tip parenja zbog inaktivacije gena koji kodira za endonukleazu Ho (Haber, 2012).

1.2. Transformacija, gensko ciljanje i spektar događaja

Pojam transformacija spominje se još početkom 20. stoljeća kad je Griffith ispitivao sojeve *Streptococcus pneumoniae* na miševima i zaključio da lizirane stanice virulentnog soja S mogu transformirati nevirulentni soj R, jer u stanicama postoji takozvani transformirajući princip (Griffith, 1928). Kasnije, Avery, MacLeod i McCarty su zaključili da je

transformirajući princip DNA, jer je transformacija iz soja R u S spriječena dodatkom DNaze (Avery i sur., 1944). Transformacija je horizontalni prijenos gena pri čemu u stanicu ulazi gola DNA i dolazi do promjene genotipa i fenotipa. Nakon što je uspješno transformiran niz bakterija, razvijen je i protokol za transformaciju kvasca *S. cerevisiae* (Hinnen i sur., 1978). Kvasac se može transformirati replikativnim i integrativnim plazmidima, pri čemu je za transformaciju replikativnim plazmidima dovoljan unos u stanicu, dok se integrativni plazmidi moraju ugraditi u genom kvasca (Orr-Weaver i sur., 1981).

Transformacijom kvasca kružnim integrativnim plazmidom koji ima dvije regije homologne kvašćevom genomu, podjednaka je vjerojatnost integracije u jedan ili drugi gen (Hinnen i sur., 1978). No, ako se uvede dvolančani lom u jednu od dvije regije na plazmidu, integracija se usmjerava upravo u homolognu regiju u genomu čime se postiže gensko ciljanje (*engl.* gene targeting), a efikasnost se povećava 10 do 1000 puta (Orr-Weaver i sur., 1981). Ovakav pristup se još naziva i gensko ciljanje „krajevi unutra“ (*engl.* ends-in gene targeting, EIGT), jer su krajevi lineariziranog plazmida, nakon sparivanja s homolognom regijom u genomu, okrenuti jedan prema drugome. Osim toga, kvasci se mogu transformirati fragmentima DNA koji nose selektivni marker a sekvence homologne ciljnoj regiji u genomu nalaze se s obje strane markera (bočne homologije). Ovakav pristup zove se i rekombinacija „krajevi van“ (*engl.* ends-out gene targeting, EOGT), jer su nakon spajanja s homolognom regijom u genomu krajevi fragmenta okrenuti jedan od drugog. Rekombinacija „krajevi van“ najčešće se koristi za inaktivaciju gena, zamjenom gena sa selektivnim markerom (*engl.* gene replacemant) (Rothstein, 1983), a transformirajuće fragmente DNA usmjeravaju homologije koje su komplementarne ciljnom lokusu u genomu (Hastings, 1993).

Transformirajuća DNA unosi se u kvasac *Saccharomyces cerevisiae* različitim metodama, a najčešće se koriste: transformacija pomoću lijevog acetata, elektroporacija i transformacija protoplastiranjem. Tijekom transformacije pomoću litijevog acetata, PEG taloži DNA na staničnu stijenku te nakon toplinskog šoka (*engl.* heat-shock) i uklanjanja PEG-a dolazi do endocitoze DNA u stanicu. Ova metoda je jednostavna za provedbu, relativno jeftina i lagano se optimizira. Tijekom elektroporacije stanice se izlažu kratkom pulsnu visokog napona koji rezultira stvaranjem pora na membrani i lakšim ulaskom transformirajuće DNA. Transformacija protoplastiranjem temelji se na potpunom ili djelomičnom uklanjanju stanične stijenke pri čemu nastaju protoplasti (*engl.* spheroplast). Protoplaste je potrebno inkubirati u izotoničnoj otopini i nacijepiti u regeneracijski agar kako bi došlo do obnove stanične stijenke. Dodatno, pri transformaciji protoplastiranjem zabilježena je i fuzija stanica (Gietz i Woods, 2001).

Kvasac je organizam kod kojega se dvolančani lomovi u DNA uspješno popravljaju homolognom rekombinacijom, zbog čega je gensko ciljanje izrazito učinkovito. Ipak, iako je gensko ciljanje u kvascu učinkovito, primijećena je i pojava neželjenih (aberantnih) genetičkih događaja. Svetec i suradnici (2007) i Štafa i suradnici (2014) proučavali su aberantne događaje pri rekombinaciji „krajevi unutra“ i „krajevi van“. Pri rekombinaciji „krajevi van“ opisane su tri vrste neželjenih genetičkih događaja: ilegimna, tj. nasumična integracija transformirajuće DNA, integracija transformirajuće DNA do ciljne regije i duplikacija ciljnog kromosoma. Na udio ciljane zamjene gena utječe dizajn transformirajuće DNA, tj. pokazano je da je najveći postotak ciljane zamjene gena ostvaren kad je u genom rekombinacijom „krajevi van“ ugrađena (integrirana) sekvenca, a najmanji postotak kada je rekombinacijom „krajevi van“ iz genoma uklonjena (deletirana) regija.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

U ovome radu korištena je rekombinacija „krajevi van“ kako bi se ispitaio utjecaj metode transformacije, tj. unosa DNA na udio ciljane zamjene gena. Naime, do sad je pokazano da pri zamjeni gena, transformirajući fragmenti DNA mogu uzrokovati i neželjene (aberantne) genetičke događaje: ilegitalnu rekombinaciju, integraciju transformirajuće DNA do ciljane regije ili duplikaciju ciljnog kromosoma (*engl.* targeted chromosome duplication, TCD). Najčešći aberantni događaj upravo je duplikacija ciljnog kromosoma (*engl.* TCD) pri čemu nastaju heteroalelni transformanti koji imaju dvije kopije ciljnog kromosoma, na jednom se nalazi netransformirana ciljna regija, a na drugom kromosomu ciljna regija koja je zamijenjena transformirajućom DNA (Svetec i sur., 2007, Štafa i sur., 2014).

Opći cilj ovog rada bio doprinijeti boljem razumijevanju molekularnih mehanizama koji utječu na rekombinacijske događaje tijekom ciljane modifikacije kvašćevog genoma. Kako bi se bolje razumio sam mehanizam rekombinacije „krajevi van“, potrebno je detaljno istražiti čitav spektar genetičkih događaja koji mogu nastati kao rezultat tehnologije zamjene gena, te uvjete koji na taj spektar mogu utjecati. Zbog toga, istražen je utjecaj različitih metoda za unos DNA u stanicu kvasca na stabilnost kvašćevog genoma i spektar genetičkih događaja tijekom ciljane zamjene gena.

Specifični cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj najčešće primjenjivanih metoda transformacije (pomoću litijeveg acetata, elektroporacije i protoplastiranja) na udio zamjene gena i na pojavu aberantnih genetičkih događaja. Budući da se ove tri metode razlikuju, željelo se istražiti kako utječe toplinski šok, uklanjanje stijenke ili izlaganje visokom naponu na preživljenje stanica i na ulazak transformirajuće DNA u stanice. Osim toga, kako udio ciljane zamjene gena i spektar aberantnih genetičkih događaja ovisi o dizajnu transformirajuće DNA, željelo se odrediti utječe li i sama metoda unosa DNA na udio ciljanja i spektar događaja. Dobiveni transformanti su selekcionirani na krutim podlogama, a nasumično izabrani transformanti koji su imali aberantni fenotip, podvrgnuti su molekularnoj analizi hibridizacijom po Southern-u, da bi se potvrdilo o kojim se genetičkim događajima radi. Nadalje, dodatni eksperimenti transformacije, provedeni su sa sojem kvasca D7 kako bi se utvrdilo utječu li metode transformacije na stabilnost genoma. Naime, pomoću soja D7 može se pratiti mitotička konverzija gena, recipročna rekombinacija i reverzija, a promjene u frekvenciji odgovarajućih genetičkih događaja mogle bi objasniti i promjene u postotku zamjene gena i aberantnih genetičkih događaja uzrokovanih različitim transformacijskim metodama.

3. MATERIJALI I METODE

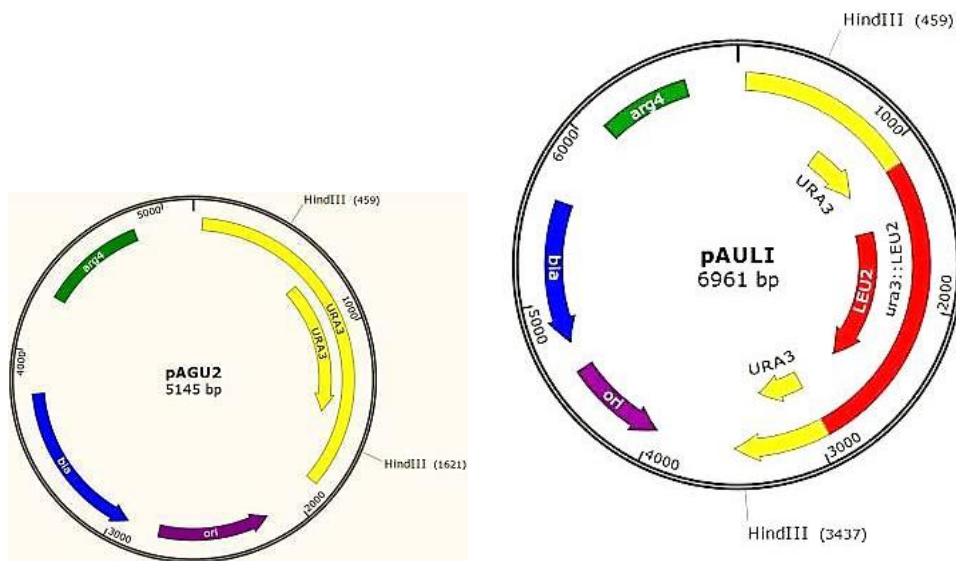
3.1. MATERIJALI

3.1.1. Plazmidi

Plazmidi korišteni u ovom radu sadrže bakterijsko ishodište replikacije (*ori*) te gen koji kodira za enzim β -laktamazu koji se koristi kao marker za rezistenciju na ampicilin (*bla*). Postojanje tih sekvenci omogućuje umnažanje i održavanje ovih plazmida u bakteriji *Escherichia coli*.

3.1.1.1. Plazmidi pAGU2 i pAULI

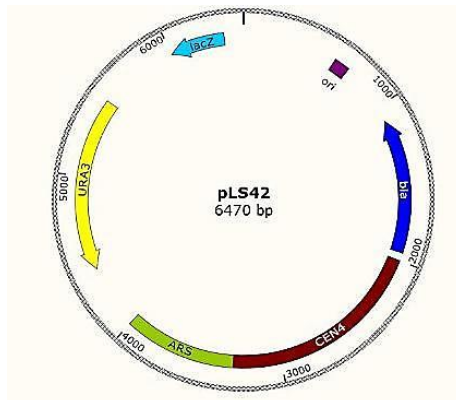
Plazmid pAGU2 (Štafa i sur., 2014) korišten je jer sadrži aktivan gen *URA3*, a plazmid pAULI (Štafa i sur., 2014) sadrži inaktivan gen *URA3* zbog insercije gena *LEU2* u *StuI* restrikcijsko mjesto gena *URA3* (slika 1). Cijepanjem ovih plazmida restrikcijskom endonukleazom *HindIII* oslobađa se transformirajuća DNA koja sadrži gen *URA3* ili *ura3::LEU2*, korištena za transformaciju soja BYauH (*ura3::HIS3*).



Slika 1. Plazmidi pAGU i pAULI. Prikazana je mapa plazmida s kvašćevim i bakterijskim regijama koje plazmid sadrži. Označena su restrikcijska mjesta koja prepoznaje endonukleaza *HindIII* bitna za ovaj rad.

3.1.1.2. Plazmid pLS42

Plazmid pLS42 korišten je za kontrolu efikasnosti transformacije jer se može samostalno replicirati u stanici (Zgaga, 1991). Plazmid sadrži regije: *ARS* (kvaščevo ishodište replikacije), *CEN4* (centromernu regiju kvaščevog kromosoma IV) te gen *URA3* kao selektivni biljeg, koje su bile bitne prilikom provedbe eksperimenta (slika 2).



Slika 2. Plazmid pLS42. Prikazana je mapa plazmida s kvaščevim i bakterijskim regijama koje plazmid sadržava.

3.1.2. Mikroorganizmi

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

3.1.2.1. 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* (*Nal*R) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*) *U169 deoR* (ϕ 80*dlac* Δ (*lacZ*)*MI5*) („New England Biolabs“, Ipswich, MA, SAD).

3.1.2.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni u ovom radu kupljeni su od EUROSCARF-a (EUROpean *Saccharomyces Cerevisiae* ARchive for Functional analysis,

Frankfurt, Njemačka) ili potječu iz zbirke Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizma Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta (sojevi su navedeni u tablici 1).

3.1.2.2.1. Soj D7

Diploidni soj D7 konstruirao je F. K. Zimmerman (Zimmerman i sur., 1975) i koristi se za detekciju mitotičke rekombinacije, recipročne rekombinacije (*engl.* crossing over), konverzije gena i reverzije. Za ovaj soj (tablica 1), bitna je inaktivacija gena *ADE2* točkastim mutacijama (*ade2-40* i *ade2-119*), isto tako vrijedi za gen *TRP5* (*trp5-12* i *trp5-27*) te *ILV1* (*ilv1-92*). Za rast je potrebno dodati u podlogu adenin, triptofan i izoleucin.

Tablica 1. Genotipovi kvasaca korištenih u izradi ovog rada

Soj	Literaturni navod	Genotip
BYauH	Štafa i sur., 2014	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3::HIS3</i>
BY4741	Brachmann i sur., 1998	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
BY4742	Brachmann i sur., 1998	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
BY4743	EUROSCARF	<i>MATa/a his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i>
D7	Zimmerman i sur., 1975	<i>MATa/a ade2-40/ade2-199 trp5-12/trp5-27 ilv1-92/ilv1-92</i>

3.1.2.2.2. Soj BY

Prilikom izrade ovoga rada korišteni su i sojevi BY skupine (tablica 1), konstruirani iz soja S288C čiji je genom sekvencioniran 1996. godine (Goffeau i sur., 1996). Sojevi ne sadrže regije *URA3* (alel *ura3Δ0*), *LEU2* (alel *leu2Δ0*) niti *HIS3* (alel *his3Δ1*) i zbog toga su auksotrofni mutanti ovisni o uracilu, leucinu i histidinu. BY4741 ovisan je još i o metioninu zbog delecije gena *MET15* (alel *met15Δ0*). BY4742 ovisan je o lizinu zbog delecije gena *LYS2* (alel *lys2Δ0*) uz ovisnost o uracilu, leucinu i histidinu.

BY4743 ovisan je samo o uracilu, leucinu i histidinu jer je nastao parenjem sojeva BY4741 i BY4742 koji su suprotnog tipa parenja (dolazi do komplementacije alela *MET15* i *LYS2*).

U eksperimentima transformacije korištena su dva transformanta BYauH (*ura3::HIS3*) dobivena iz soja BY4741, koji je a tipa parenja, tako da je u gen *URA3* insertiran gen *HIS3* (*ura3::HIS3*).

3.1.3. Hranjive podloge i otopine

Sve podloge i otopine steriliziraju se u autoklavu 20 minuta 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 g/L agara prije sterilizacije.

3.1.3.1. Hranjive podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

LB (Kompletna podloga)

Bacto-tripton	10 g/L
Bacto-yeast extract	5 g/L
NaCl	10 g/L

Podloga sa ampicilinom: Ampicilin se dodaje u sterilnu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracije 20 mg/mL) do konačne koncentracije od 50 µg/mL u krutu podlogu odnosno od 100 µg/mL u tekuću podlogu.

3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

<u>Kompletna podloga (YPD)</u>	1000mL
Bacto-pepton	20 g
Yeast extract	10 g
Glukoza	20 g
H ₂ O	do 1000mL nadopuniti

<u>Regeneracijski agar</u>	1000mL
Yeast nitrogen base (YNB) bez aminokiselina i amonijevog sulfata	1,68 g
Amonijev-sulfat	5,0 g
Glukoza	20,0 g
Sorbitol	182,0 g
Drop out (smjesa aminokiselina, D.O.)	1,3 g
H ₂ O	do 1000 mL nadopuniti
Agar	25 g

*Ovisno o soju dodati izoleucin u podlogu jer ga drop-out ne sadrži, a bitan je za rast soja D7.
Regeneracijski agar se sterilizira 13 minuta pri 121°C.

<u>Minimalna podloga (MM)</u>	1000 mL
Yeast nitrogen base (YNB-soli, Bojan)	0,2 g
Stock vitamina	100 µL
Amonijev-sulfat	5,0 g
Kalijevdihidrogen fosfat	1,0 g
Magnezijev sulfat (heptahidrat)	1,0 g
Glukoza	20 g
H ₂ O	do 1000 mL nadopuniti
Agar	25 g

*Zavisno o selektivnim markerima dodati dodatno adenin, triptofan, izoleucin, uracil ili leucin.

<u>Smjesa aminokiselina ("drop-out powder")</u>	1,3g/L
L-arginin	1,2 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g
L-fenilalanin	3,0 g
L-glutaminska kiselina	6,0 g
L-histidin	1,2 g
L-leucin	3,6 g
L-lizin	1,8 g
L-metionin	1,2 g
L-serin	22,5 g
L-tirozin	1,8 g
L-treonin	12,0 g
L-triptofan	2,4 g
L-valin	9,0g

*U ovom su radu korištene podloge bez uracila, bez leucina, bez adenina, bez triptofana, bez izoleucina, bez uracila i histidina te bez leucina i histidina. Hranjiva podloga se kompletira s otopinom aminokiselina zavisno o selektivnim markerima.

3.1.3.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

Amonijev acetat (8 M)

Otopina se priprema otapanjem 61,66 g amonijevog acetata u 100mL destilirane vode.

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

Ampicilin (20 mg/mL)

Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C

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

18,61 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ 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.

Kalijev acetat (3 M; pH 4,8)

Otopina je 3 M u odnosu na kalij i 5 M u odnosu na acetat. 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.

Natrijev acetat (3 M; 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.

RNaza (10 mg/mL)

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.

Tris-HCl (1 M)

12,1 g Tris otopi se u 80 mL deionizirane vode, pH se do željene vrijednosti podesei 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.

Sorbitol (1 M)

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.

Zimoliaza 20-T

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

3.1.3.4. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica

Nespecifična DNA (DNA-nosač)

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

*Korištena za sve tri metode transformacije soja D7.

3.1.3.4.1. Otopine za transformaciju pomoću litijevog-acetata

Smjesa za transformaciju (Trafo-Mix)

100 mL otopine se priprema dodatkom 64 mL PEG₄₀₀₀ 50%, 20 mL 1 M litij acetata pH 7,0 – 7,1; 0,8 mL 1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,16 mL 0,5 M EDTA pH 8,0 te nadopuniti deioniziranom vodom do 100 mL.

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.

3.1.3.4.2. Otopine za transformaciju elektroporacijom

SOC otopina (nakon elektroporacije)

Smjesa YPD-a i 1M sorbitola u volumnom omjeru 1:1. Otopina se priprema neposredno prije upotrebe.

3.1.3.4.3. Otopine za transformaciju protoplastiranjem

PEG₆₀₀₀

100 mL otopine se priprema dodatkom 20 g PEG₆₀₀₀, 1 mL 1 M kalcijeva klorida i 1 M Tris-HCl pH 7,4. Deioniziranom vodom se nadopuni do 100 mL.

TPC

100 mL otopine se priprema dodatkom 98 mL 1 M sorbitola te dodatkom 1 mL kalcijeva klorida i Tris-HCl pH 7,4.

Zimoliaza 60-T

15 mg enzima zimolijaze (Zymolyase 60-T) iz bakterije *Arthrobacter luteus* otopi se u 3 mL sterilnog glicerola koncentracije 400 mg/mL i čuva pri -20 °C.

3.1.3.5. Otopine za gel-elektroforezu

Agarozni gel

Priprema se otapanjem agaroze u TBE puferu (1 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

3.1.3.6. Otopine za metodu po Southern-u

1 M amonijev acetat

Priprema se razrjeđivanjem 8 M amonijevog acetata.

0,25 M HCl

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

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

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-nosač).

Pufer 1

0,1 M Tris-HCl pH 7,5

0,15 M natrijev klorid.

Pufer 2

Priprema se otapanjem smjese za sprečavanje 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 podesi dodatkom HCl i dopuni deioniziranom vodom do 500 mL.

SSC (20 x)

3 M natrijev klorid

0,3 M natrijev citrat.

3.1.3.7. Kemikalije, enzimi i membrane

Agaroz	<i>Appligene</i> , Illkirch, Francuska
Apsolutni etanol	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Nespecifična DNA (DNA-nosač)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
DNA bakteriofaga λ	<i>Fermentas International Inc.</i> , Ontario, Kanada
EDTA	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA, te odgovarajući puferi	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, SAD, <i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, IN, SAD, <i>Pharmacia Biotech</i> , San Francisco, SAD, <i>Fermentas International Inc.</i> , Ontario, Kanada
Etidij-bromid	<i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, IN, SAD
Izopropanol	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Kemikalije za pripremu hranjivih podloga	<i>Difco</i> , Detroit, SAD <i>Merck</i> , Darmstadt, Njemačka

Kemikalije za pripremu ostalih otopina	<i>Fluka</i> , Buchs, Švicarska, <i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska <i>Alkaloid</i> , Skoplje, Makedonija
Komplet kemikalija za izolaciju DNA iz gela	<i>QIAGEN</i> , Hilden
Membrane (najlonske, pozitivno nabijene) i komplet kemikalija za hibridizacije DNA po Southern-u	<i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, SAD
PEG	<i>Fluka</i> , Buchs, Švicarska
Ribonukleaza A	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
Sorbitol	<i>Barr</i> , Zagreb, Hrvatska
Tris	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
Zimoliaza (Zymolyaze 20-T)	<i>Seikugaku Kogyo Co.</i> , Tokyo, Japan
Zimoliaza (Zymolyaze 60-T)	<i>Seikugaku Kogyo Co.</i> , Tokyo, Japan

3.2. METODE

3.2.1. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA

3.2.1.1. Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena

Za izolaciju dvolančanog plazmida korištena je standardna metoda alkalne lize (Sambrook i Russel, 2001), uz manje modifikacije. 1000 mL prekončne kulture bakterije *Escherichia coli* centrifugirano je deset minuta na 5000 okretaja u minuti te se talog resuspendirao u 20 mL TE-pufere i ostavio 5 minuta na ledu. Suspenziji je dodano 10 mL otopine natrijev hidroksid/SDS i blago je promiješano te je ponovno ostavljeno 5 minuta na ledu. Zatim je dodano 3 volumena (15 mL) 3 M natrijevog acetata i inkubirano 20 minuta pri -20 °C. Nakon inkubacije, centrifugirano je 20 minuta na 6000 okretaja u minuti. Supernatant je prebačen u novu kivetu i ponovo centrifugiran pri istim uvjetima. Bistri supernatant prelijevan je u novu kivetu, određen mu je volumen, pomiješan s 0,6 volumena izopropanola i ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzija je centrifugirana 30 minuta na 6000 okretaja u minuti te je supernatant bačen, a talog sušen u laminaru. Kad je talog posušen,

otopljen je u 300 μ L TE-puferu i 10 μ L RNaze. Ako je DNA dobro otopljena u TE-puferu slijedi fenolizacija (poglavlje 3.2.1.3.). Plazmidna DNA taložena je amonijevim acetatom i apsolutnim etanolom (poglavlje 3.2.1.4.) i otopljena u 300 μ L TE-puferu pH 8,0. DNA se može još jednom pretaložiti amonijevim acetatom i etanolom te kao i u prethodnom koraku otopiti u 300 μ L TE-puferu pH 8,0.

3.2.1.2. Izolacija kvaščeve DNA iz stanica uzgojenih u tekućoj podlozi

Za izolaciju kvaščeve DNA uzgajano je 4 mL kulture kvasca do stacionarne faze. Kultura je centrifugirana 5 minuta na 5000 okretaja u minuti te je talog stanica ispran s 3 mL deionizirane vode, zatim s 3 mL SCE i na kraju otopljen u 200 μ L SCE. Nakon dodatka 20 μ L zimolijaze 20-T stanice su inkubirane 1 sat na 37 °C te im je dodano 800 μ L STE i inkubirano 20 minuta pri 70 °C. Uzorci su ohlađeni u ledu te im je dodano 200 μ L 3 M kalijevog acetata i ostavljeno u ledu (pri 4 °C) još najmanje 90 minuta. Nakon centrifugiranja 30 minuta na 15000 okretaja u minuti, 970 μ L supernatanta je preneseno u novu kivetu uz dodatak 630 μ L izopropanola. Nakon centrifugiranja 20 minuta na 14000 okretaja u minuti pri 4 °C talog DNA je osušen vakuum sisaljkom i otopljen u 300 μ L TE-puferu pH 8,0 te pretaložen amonijevim acetatom i etanolom.

3.2.1.3. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol

Otopini DNA dodan je jednaki volumen smjese fenol/kloroform/izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1. Potrebno je snažno promiješati i zatim centrifugirati 2 minute na 11000 okretaja u minuti. Gornja faza oprezno je prenesena u novu kivetu.

Postupak je ponovljen sve dok se nakon centrifugiranja nije prestao pojavljivati proteinski talog (između gornje i donje faze). Ako je proteinski talog uklonjen, gornja faza prenesena je u novu kivetu i dodan je jednaki volumen smjese kloroform/izoamilni alkohol da bi se uklonio zaostali fenol, snažno je promiješano i nakon centrifugiranja (2 minute na 11000 okretaja u minuti) gornja faza prenesena je u novu kivetu.

3.2.1.4. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom

Najčešće se DNA taloži smjesom amonijeva acetata i etanola. Volumenu DNA dodano je 1/3 volumena 8 M amonijevog acetata i 8/3 volumena apsolutnog etanola. Uzorak je čuvan najmanje 2 sata pri temperaturi od -20 °C. Talog DNA dobiven je centrifugiranjem 20 minuta na 11000 okretaja u minuti pri 4 °C.

3.2.1.5. Cijepanje i modifikacija DNA

Cijepanje i modifikacija DNA provedeni su prema uputama proizvođača restrikcijskih 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).

3.2.2. Metode za transformaciju kvašćevih stanica

3.2.2.1. Transformacija kvašćevih stanica pomoću litijevog acetata

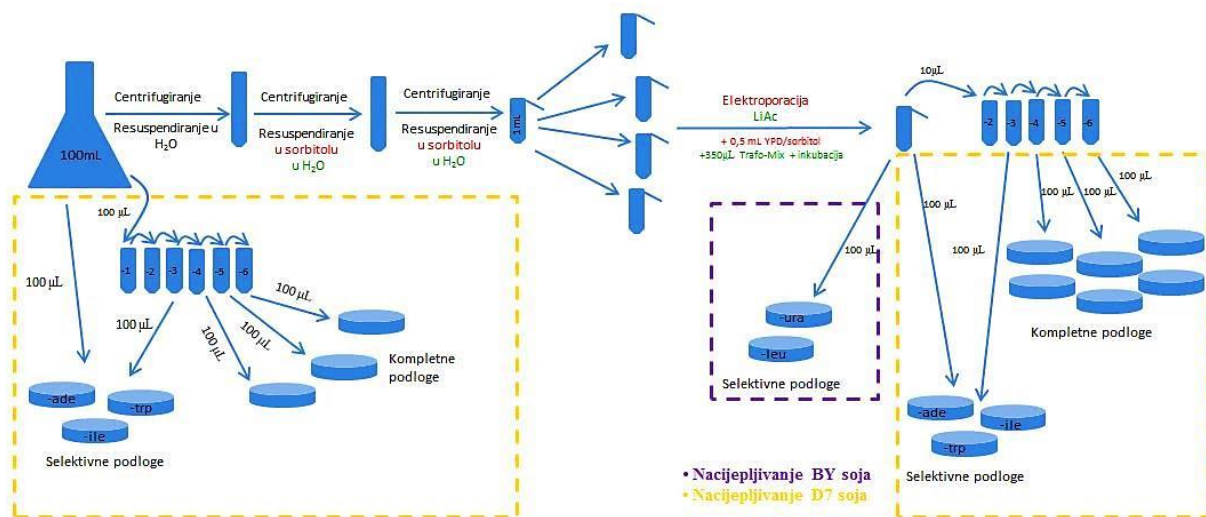
Jedna kolonija kvasca s krute kompletne podloge prenesena je u 100 mL tekuće kompletne podloge (slika 3) i preko noći uz aeraciju inkubirana pri 28 do 30 °C do koncentracije stanica od 2 do 5 x 10⁷ st/mL. Brojanjem stanica u Thoma-ovoj komorici određen je točan broj.

Stanice su izdvojene centrifugiranjem 5 minuta pri 4000 okretaja u minuti pri sobnoj temperaturi i isprane s 30 mL sterilne deionizirane vode. Centrifugirano je pri istim uvjetima kao prethodno navedeno i ponovo isprano sa 850 µL sterilne deionizirane vode. Nakon ponovnog centrifugiranja, stanice su resuspendirane u 900 µL sterilne deionizirane vode te je po 100 µL suspenzije stanica podijeljeno u Eppendorf kivete. Stanice su ponovno centrifugirane 5 minuta pri 4000 okretaja u minuti i iz svake kivete je uklonjeno 80 µL supernatanta.

Talog stanica pomiješan je sa 10 µL otopine DNA i 350 µL smjese za transformaciju i ostavljen 40 minuta na 28 °C. Stanice su nakon toga podvrgnute toplinskom šoku pri 42 °C tijekom 40 min. Nakon toplinskog šoka, uzorci su centrifugirani 5 minuta pri 3000 okretaja u minuti i uklonjeno je 350 µL supernatanta.

Stanice su resuspendirane u 180 μ L podloge YPD i stavljene na 28°C. Centrifugirane su 5 minuta na 3000 okretaja u minuti i resuspendirane u 180 μ L sterilne deionizirane vode te naciepljene na selektivne podloge. Rezultati transformacije vidljivi su nakon 3 do 5 dana inkubacije pri 28 do 30 °C.

Prilikom provedbe eksperimenta sa sojem BY, kvasci su nakon provedene transformacije naciepljivani samo na krute selektivne podloge (-ura i -leu; na dvije ploče jedan uzorak). U eksperimentima sa sojem D7, u različitim koracima tijekom transformacije, naciepljivani su alikvoti i decimalna razrjeđenja da bi se odredio broj stanica s kojima se kreće u proces transformacije za kasniji izračun preživljenja i frekvencije mutacije (slika 3).



Slika 3. Prikaz procesa transformacije kvaščevih stanica elektroporacijom (crveno) i pomoću litijevog acetata (zeleno) te naciepljivanje na podloge ovisno o soju (BY ljubičasto, D7 žuto).

3.2.2.2. Transformacija kvaščevih stanica elektroporacijom

Jedna kolonija kvasca s krute kompletne podloge prenesena je u 100 mL tekuće kompletne podloge (slika 3) i preko noći uz aeraciju inkubirana pri 28 do 30 °C do koncentracije stanica od $9,5 \times 10^7$ st/mL. Brojanjem stanica u Thoma-ovoj komorici određen je točan broj. Stanice su prvo ohlađene 15 minuta na ledu u već prethodno ohlađenim kivetama i izdvojene centrifugiranjem 5 minuta pri 3000 okretaja u minuti pri temperaturi od 4°C te isprane s 100 mL sterilne deionizirane vode. Zatim su centrifugirane pri istim uvjetima kao što je prethodno navedeno i resuspendirane u 20 mL hladnog 1 M sorbitola.

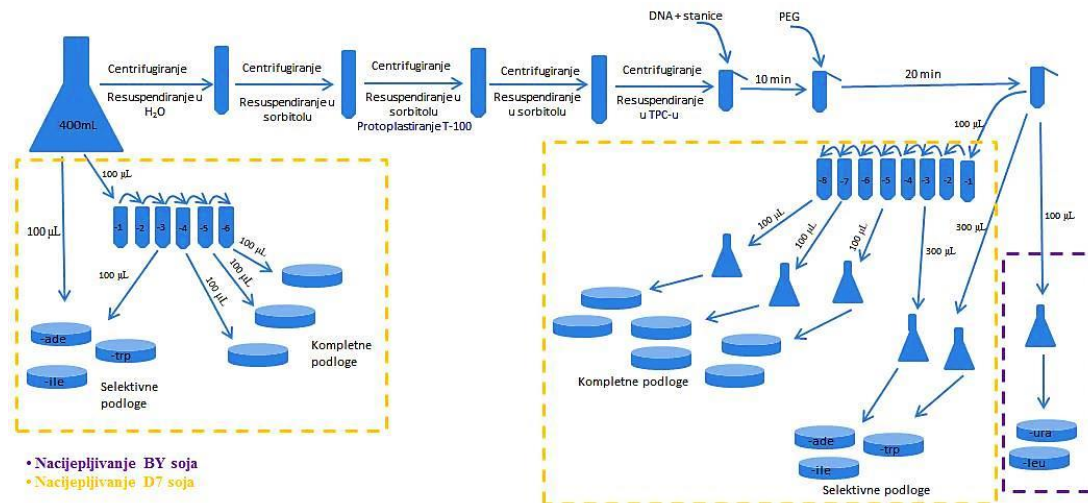
Nakon ponovnog centrifugiranja stanice su resuspendirane u 0,2 mL hladnog 1 M sorbitola i prebačene u hladnu Eppendorf kivetu (epicu) te ostavljene 15 minuta u ledu. Dodano je manje od 100 ng DNA u hladnu epicu i pomiješano s 40 μ L stanica. Prebačen je sadržaj hladne epice u također ohlađenu 0,2 kivetu za elektroporaciju. Na uređaju za elektroporaciju namješten je program Sc2 i stavljena je kiveta na predviđeno mjesto. Stanice kvasaca su podvrgnute pulsu struje od 1,5 kV oko 5 ms. Brzo nakon pulsa dodano je 0,5 mL otopine za oporavak (YPD:sorbitol = 1:1), homogenizirano i nacijepljeno na hranjive podloge. Rezultati transformacije vidljivi su nakon 3 do 5 dana inkubacije pri 28 do 30 °C.

Prilikom provedbe eksperimenta sa sojem BY, kvasci su nakon provedene transformacije nacijepljivani samo na krute selektivne podloge (-ura i -leu; na dvije ploče jedan uzorak). U eksperimentima sa sojem D7, u različitim koracima tijekom transformacije, nacijepljivani su alikvoti i decimalna razrjeđenja da bi se odredio broj stanica s kojima se kreće u proces transformacije za kasniji izračun preživljenja i frekvencije mutacija (slika 3).

3.2.2.3. Transformacija kvašćevih stanica protoplastiranjem

Jedna kolonija kvasca s krute kompletne podloge prenesena je u 400 mL tekuće kompletne podloge (slika 4) i preko noći uz aeraciju inkubirana pri 28 do 30 °C do koncentracije stanica od 1 do $2,5 \times 10^7$ st/mL. Brojanjem stanica u Thoma-ovoj komorici određen je točan broj. Stanice su izdvojene centrifugiranjem 5 minuta pri 4000 okretaja u minuti pri sobnoj temperaturi i isprane s 25 mL sterilne deionizirane vode. Centrifugirane su pri istim uvjetima kao što je prethodno navedeno i resuspendirane u sorbitolu. Za vrijeme centrifugiranja, bitno je pripremiti 6 tankih kiveta s 500 μ L 1% SDS-a. Nakon centrifugiranja stanice su resuspendirane u 25 mL sorbitola i u prvu tanku kivetu dodano je samo 100 μ L stanica, a u kivetu gdje se nalaze stanice resuspendirane u sorbitolu dodano je 100 μ L zimolijaze T-60. Uključena je štoperica i uzimani su uzorci u pravilnim vremenskim razmacima da bi se pratio tijek protoplastiranja. Protoplastiranje je gotovo kad dodatkom 100 μ L otopine stanica i zimolijaze, otopina SDS-a postane bistra. Stanice su centrifugirane nakon toga, ali 10 minuta pri 2000 okretaja u minuti na sobnoj temperaturi da stanice ne bi popucale. Resuspendirane su u 25 mL sorbitola i dalje centrifugirane pri istim uvjetima.

Idući korak je bilo resuspendiranje u TPC-u i centrifugirano je pri istim uvjetima. Nakon što je zadnji put centrifugirano, stanice su resuspendirane u TPC-u i prebačene u Eppendorf kivetu. Pomiješano je 100 μ L stanica sa 10 μ L DNA i inkubirano 10 minuta. Nakon 10 minuta pomiješane su stanice i DNA s PEG-om i inkubirane 20 minuta. Nakon isteka vremena sve je prebačeno u regeneracijski agar i izliveno u Petrijeve zdjelice. Rezultati transformacije vidljivi su nakon 3 do 5 dana inkubacije pri 28 do 30 $^{\circ}$ C.



Slika 4. Prikaz procesa transformacije kvašćevih stanica metodom protoplastiranja te nacijepljivanje na podloge ovisno o soju (BY ljubičasto, D7 žuto).

Prilikom provedbe eksperimenta sa sojem BY, kvasci su nakon provedene transformacije nacijepljivani samo na krute selektivne podloge (-ura i -leu; na dvije ploče jedan uzorak). U eksperimentima sa sojem D7, u različitim koracima tijekom transformacije, nacijepljivani su alikvoti i decimalna razrjeđenja da bi se odredio broj stanica s kojima se kreće u proces transformacije za kasniji izračun preživljenja i frekvencije mutacije (slika 4).

Nakon provedene transformacije, stanice su nacijepljene u tekući regeneracijski agar (kompletna i selektivne podloge) te su izliveno u Petrijeve zdjelice. Stanice ovdje rastu u hranjivoj podlozi za razliku od prethodnih metoda.

3.2.3. Metode za vizualizaciju i detekciju DNA

3.2.3.1. Gel-elektroforeza

Otopljeni agarozni gel (poglavlje 3.1.3.5.) ohlađen je na oko 60 °C i izliven u nosač gela na koji je postavljen češalj za formiranje jažica. Kad je gel skrnut, izvađen je češalj i nosač gela postavljen je u kadicu za elektroforezu u koju je uliven TBE-pufer (1 x) tako da sloj pufera iznad gela bude debeo oko 1 mm. Uzorci DNA pomiješani su s bojom za nanošenje uzoraka u odnosu 6:1 i uneseni mikropipetom u jažice na gelu. Elektroforeza je u kadicama GNA 100 provedena 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 je vizualizirana namakanjem gela u otopini etidij-bromida (15 do 20 minuta) te izložena ultraljubičastom svjetlu. Gel je fotografiran kroz crveni filter.

3.2.3.2. Metoda hibridizacije po Southern-u

Hibridizacija DNA po Southern-u provedena je pomoću kompleta kemikalija za neradioaktivno obilježavanje i otkrivanje homologne DNA ("Roche Applied Science") prema uputama proizvođača, uz manje modifikacije.

Prvo je izolirana genomska DNA iz stanica uzgojenih do stacionarne faze rasta (poglavlje 3.2.1.2.) te je pocijepana odgovarajućim restrikcijskim enzimom. Nakon toga provedena je gel-elektroforeza (poglavlje 3.2.3.1.), a nakon završetka gel je ispiran u alkalnoj otopini koja uzrokuje depurinaciju DNA (fragmentiranje) te slijedi prijenos DNA s gela na membranu. Prijenos je proveden 90 minuta pomoću uređaja za prijenos vakuumom uz podtlak od 15 kPa. Najlonska membrana je pozitivno nabijena te fragmenti DNA ostaju fiksirani na membrani na poziciji koja odgovara onoj na gelu. Zatim je membrana ispirana i inkubirana u predhibridizacijskoj otopini (poglavlje 3.1.3.6.) koja je zasitila membranu i spriječila nespecifično vezanje probe na membranu. Nakon toga, membrana je ispirana u hibridizacijskoj otopini koja je istog sastava kao i predhibridizacijska otopina, ali još k tome sadržavala je sondu sa dioksigeninom obilježenim deoksiuridin-trifosfatom (DIG-dUTP).

Nakon hibridizacije, slijedi detekcija tako što je na sondu vezano antitijelo antiDIG-fosfataza te inducirana reakcija dodatkom supstrata (5-bromo-4-kloro-3'-indolil fosfat) i indikatora (NBT) koji daje ljubičasto obojenje. Navedene količine pufera, za posthibridizacijsko ispiranje i imunološko otkrivanje (detekciju), potrebne su za membranu površine 100 cm², a sva ispiranja (ako nije drugačije naglašeno) odvijala su se pri sobnoj temperaturi uz blago potresanje.

3.2.3.2.1. Priprema DNA sonde metodom nasumične početnice

DNA bakteriofaga λ korištena je 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 pripremljena je tako da je 13 μ L otopine koja sadrži 100 ng DNA-kalupa (DNA bakteriofaga λ) denaturirana (5 minuta pri 95 °C), a zatim naglo ohlađena u ledu te joj je dodano 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 je zaustavljena dodatkom 1 μ L 0,5 M EDTA pH 8,0, a DNA je istaložena dodatkom 2 μ L 5 M litijevog klorida i 75 μ L ledenog apsolutnog etanola i inkubacijom najmanje 2 sata pri -20 °C. Talog dobiven centrifugiranjem otopljen je u 200 μ L TE pufera pH 8,0.

3.2.3.2.2. Priprema DNA sonde lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom (Mullis i sur., 1986) provedeno je radi sinteze digoksigeninom (DIG) obilježene sonde za hibridizaciju s genom *URA3* 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 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 ju je potrebno denaturirati (5 minuta pri 95 °C) neposredno prije svake nove upotrebe.

3.2.3.2.2. Prijenos DNA na membranu

Nakon provedene gel-elektroforeze i vizualizacije DNA (poglavlje 3.2.3.1.) agarozni gel je 20 minuta inkubiran u 0,25 M kloridnoj kiselini te je nakon kratkog ispiranja u destiliranoj vodi inkubiran 20 do 25 minuta u otopini natrijev hidroksid/amonijev acetat. Prijenos DNA na membranu traje 1,5 sat, a provođen je 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 je isprana u 1 M amonijevom acetatu, sušena 15 minuta pri 37 °C, te 20 minuta inkubirana pri 120 °C.

3.2.3.2.3. Predhibridizacija, hibridizacija i detekcija

Predhibridizacija je provođena 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 (poglavlje 3.1.3.6.) zamijenjena je s oko 5 do 10 puta manjim volumenom otopine za hibridizaciju i provođena preko noći (18 h) u istim uvjetima kao i predhibridizacija. Po završenoj hibridizaciji membrana je, uz blago potresanje dva puta po 5 minuta, isprana 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.

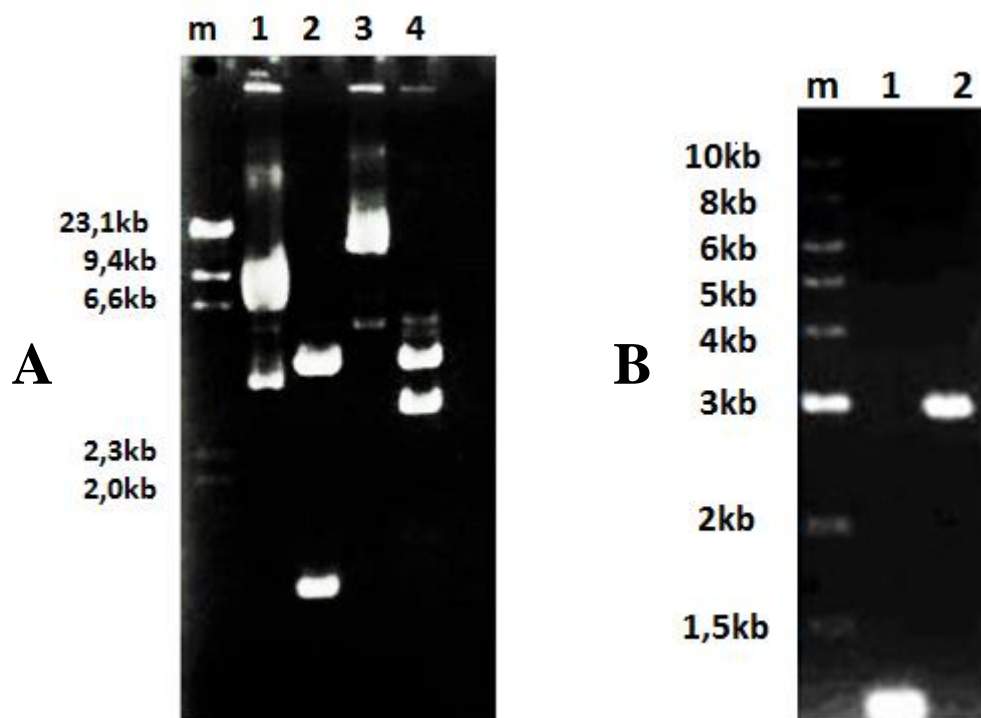
U svrhu detekcije, membrana je kratko isprana u 100 mL pufera 1, zatim je 1 sat ispirana u 100 mL pufera 2, a onda 30 minuta u zataljenoj plastičnoj vrećici sa 20 mL pufera 2 u kojem je 4 µL kompleksa antitijela i alkalne fosfataze. Nakon ispiranja dva puta po 15 minuta u 100 mL pufera 1, membrana je kratko isprana u puferu 3 te zataljena 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 inkubirana u mraku pri 37 °C do pojave tamno obojenih vrpca (20 minuta do 24 sata). Reakcija je zaustavljena ispiranjem velikom količinom deionizirane vode nakon čega je membrana osušena na zraku.

4. REZULTATI

Cilj ovog rada bio je zabilježiti molekularne događaje koji se pojavljuju prilikom transformacije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i ispitati utjecaj tri različite metode: transformacije pomoću litijeveg acetata, elektroporacije i protoplastiranja na udio zamjene gena i na pojavu aberantnih genetičkih događaja. Ovisno o metodi uspoređena je efikasnost transformacije i preživljenje stanica kvasca te utjecaj različite duljine transformirajućih fragmenata. Nakon toga, provedena je detaljna molekularna analiza hibridizacijom po Southern-u nasumično izabranih transformanata koji su imali aberantni fenotip. Ujedno dodatnim eksperimentima sa sojem kvasca D7 željelo se utvrditi uzrokuju li različite transformacijske metodama promjene u frekvenciji rekombinacijskih događaja.

4.1. Provjera plazmida i fragmenata za transformaciju

Plazmidi pAGU2 i pAULI (poglavlje 3.1.1.) izolirani iz velikog volumena bakterijske kulture (poglavlje 3.2.1.1.) pocijepani su restriktivnim enzimom *HindIII* (slika 1). Dobiveni transformirajući fragmenti provjereni su gel elektroforezom zajedno s nepocijepanim kružnim plazmidima (slika 5).



Slika 5. Provjera strukture fragmenata DNA za transformaciju. (A) Rezultati gel-elektroforeze prikazuju kružni plazmid pAGU2 (jažica 1), plazmid pAGU2 pocijepan endonukleazom *HindIII* (jažica 2), kružni plazmid pAULI (jažica 3), plazmid pAULI pocijepan endonukleazom *HindIII* (jažica 4). (B) Rezultati gel elektroforeze prikazuju fragmente izolirane iz gela korištene pri transformacijama: *URA3* (jažica 1) i *ura3::LEU2* (jažica 2).

Iz rezultata elektroforeze može se utvrditi da su veličine transformirajućih fragmenata u skladu s očekivanima (slika 5). Naime, veličina plazmida pAGU2 je 5145 pb te plazmida pAULI 6961 pb, a transformirajući fragment *URA3* je veličine 1162 pb i fragment *ura3::LEU2* 2978 pb.

4.2. Provjera sojeva

Prije provedbe eksperimenata provjereni su fenotipovi sojeva BY i D7 (poglavlje 3.1.2.2.), korištenih prilikom izrade ovog rada, repliciranjem na kompletnu i selektivne krute hranjive podloge navedene u tablici 2.

Tablica 2. Provjera fenotipa soja BYauH korištenog u ovom radu

Soj	YPD	MM	-ura	-ura -his	MM+his+leu +ura+met (-lys)	MM+his+leu +ura+lys (-met)	MM+his+leu +ura+ lys+met
BYauH (<i>ura3::HIS</i>)	+	-	-	-	+	-	+
BY4741	+	-	-	-	+	-	+
BY4742	+	-	-	-	-	+	+
BY4743	+	-	-	-	+	+	+

Potvrđeno je da soj BYauH potječe od soja BY4741, jer kao i soj BY4741 ovisi o metioninu (tablica 2). U skladu s očekivanim, soj BYauH prije transformacije nema fenotip Ura^+His^+ , što je bilo bitno potvrditi, jer se u radu prate aberantni fenotipovi nakon transformacije: Ura^+His^+ i Leu^+His^+ . Budući da su BY4741 i BY4742 suprotnog tipa parenja, mogu konjugirati, a diploid koji se dobije parenjem je soj BY4743 ovisan o uracilu, histidinu i leucinu, jer dolazi do komplementacije gena *met15Δ0* i *lys2Δ0*.

Tablica 3. Provjera fenotipa kvasca D7

Soj	MM	MM +ade +trp	MM +ade +trp +ile	-ura	-ade	-trp
Prototrof	+	+	+	+	+	+
D7	-	-	+	-	-	-

Auksonografskom analizom potvrđeno je da soj D7 ovisi o adeninu, triptofanu i izoleucinu što je u skladu s genotipom (tablica 1).

4.3. Transformacija kvasca

U ovom radu transformirana su dva soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: BY i D7. Pomoću soja D7 moguće je efikasno detektirati mitotičku konverziju gena, mitotičku recipročnu rekombinaciju (*engl.* crossing over), konverziju gena i ciljane točkaste mutacije. Uz to, D7 se koristio za praćenje frekvencije odgovarajućih genetičkih događaja koji bi mogli objasniti i promjene u postotku zamjene gena i aberantnih genetičkih događaja uzrokovanih različitim transformacijskim metodama.

Za detekciju i karakterizaciju aberantnih događaja koristio se soj BYauH, auktrotrofni mutant koji je imao inaktivan gen *URA3*, prekinut genom *HIS3* (alel *ura3::HIS3*). U ovim eksperimentima kvasac je transformiran s fragmentom DNA čiji krajevi su nakon sparivanja s homolognom regijom u genomu okrenuti jedan od drugoga, pa se ovakav tip rekombinacije zove rekombinacija „krajevi van“ (*engl.* ends-out gene targeting). Prilikom transformacije korištena su dva transformirajuća fragmenta različite duljine: *URA3* (1162 pb) i *ura3::LEU2* (2978 pb) kako bi se ispitalo utjecaj duljine transformirajućih fragmenata na pojavu aberantnih događaja. Uz zamjenu ciljnog gena (*engl.* gene replacement) mogu se pojaviti neželjeni, aberantni događaji kao što su ilegitalna rekombinacija, integracija transformirajuće DNA do ciljane regije ili duplikacija ciljnog kromosoma (*engl.* targeted chromosome duplication, TCD). Do sad prilikom istraživanja, najčešći aberantni događaj koji se pojavljivao prilikom genskog ciljanja „krajevi van“ je duplikacija ciljnog kromosoma (Štafa, 2014). Zbog toga je nakon transformacije provedena detaljna molekularna analiza transformanata hibridizacijom po Southern-u.

4.3.1. Utjecaj metode transformacije na preživljenje i frekvenciju rekombinacijskih događaja

Soj D7 (Freeman i Hoffman, 2007) korišten je kao kontrola budući da je pomoću njega moguće pratiti rekombinaciju, konverziju gena i reverziju zato jer sadrži specifične alele unutar svog genoma (aleli *ade2-40* i *ade2-119*; *trp5-12* i *trp5-27*; *ilv1-92*).

Naime, fenotip Ade⁺ ukazuje na mitotičku recipročnu rekombinaciju (*engl.* crossing over), fenotip Trp⁺ ukazuje na konverziju gena te fenotip Ilv⁺ na reverziju. Soj D7 podvrgnut je istim metodama transformacije, sa i bez DNA, da bi se uvidio utjecaj same metode na uspješnost transformacije, preživljenje stanica i frekvenciju rekombinacijskih događaja. DNA koja je korištena pri transformaciji ovog soja je nespecifična DNA (DNA-nosač), a svaka metoda transformacije soja D7 je provedena barem dva puta (tablica 4).

Tablica 4. Postotak preživljenja kontrolnog soja D7 nakon tri različite metode transformacije

	Litij acetat		Elektroporacija			Protoplastiranje		
	Eksperiment		Eksperiment			Eksperiment		
	1	2	1	2	3	1	2	3
bez DNA	43,77 %	34,19 %	3,36 %	8,78 %	3,81 %	0,21 %	1,79 %	1,62 %
s DNA nosačem	62,83 %*	50,45 %*	4,15 %	10,57 %	3,28 %	1,07 %	1,49 %	1,06 %

*Vrijednosti koje su se pokazale statističkim značajnima ($p < 0,05$) prilikom preživljenja stanica nakon provedene transformacijske metode

Pokazalo se da je preživljenje veće u eksperimentima gdje je korištena nespecifična DNA (DNA-nosač) nego u slučaju kad se nije koristila DNA. Rezultati su se pokazali statistički značajnim samo za transformaciju pomoću litijevog acetata ($p < 0,0173$), dok su kod elektroporacije i protoplastiranja rezultati bili iznad granice statističke značajnosti ($p < 0,17$ i $p < 0,12$).

U tablici 5 vidljiv je broj poraslih rekombinanata, konvertanata i revertanata soja D7 u odnosu na ukupne porasle stanice nakon provedbe pojedine metode. Broj se povećava i razlikuje se ovisno o metodi i ovisno da li je korištena DNA ili nije. Jedina metoda kod koje nije zapažen porast broja revertanata (fenotip Ilv⁺) je protoplastiranje.

Tablica 5. Broj poraslih rekombinanata, konvertanata i revertanata prije i nakon transformacije

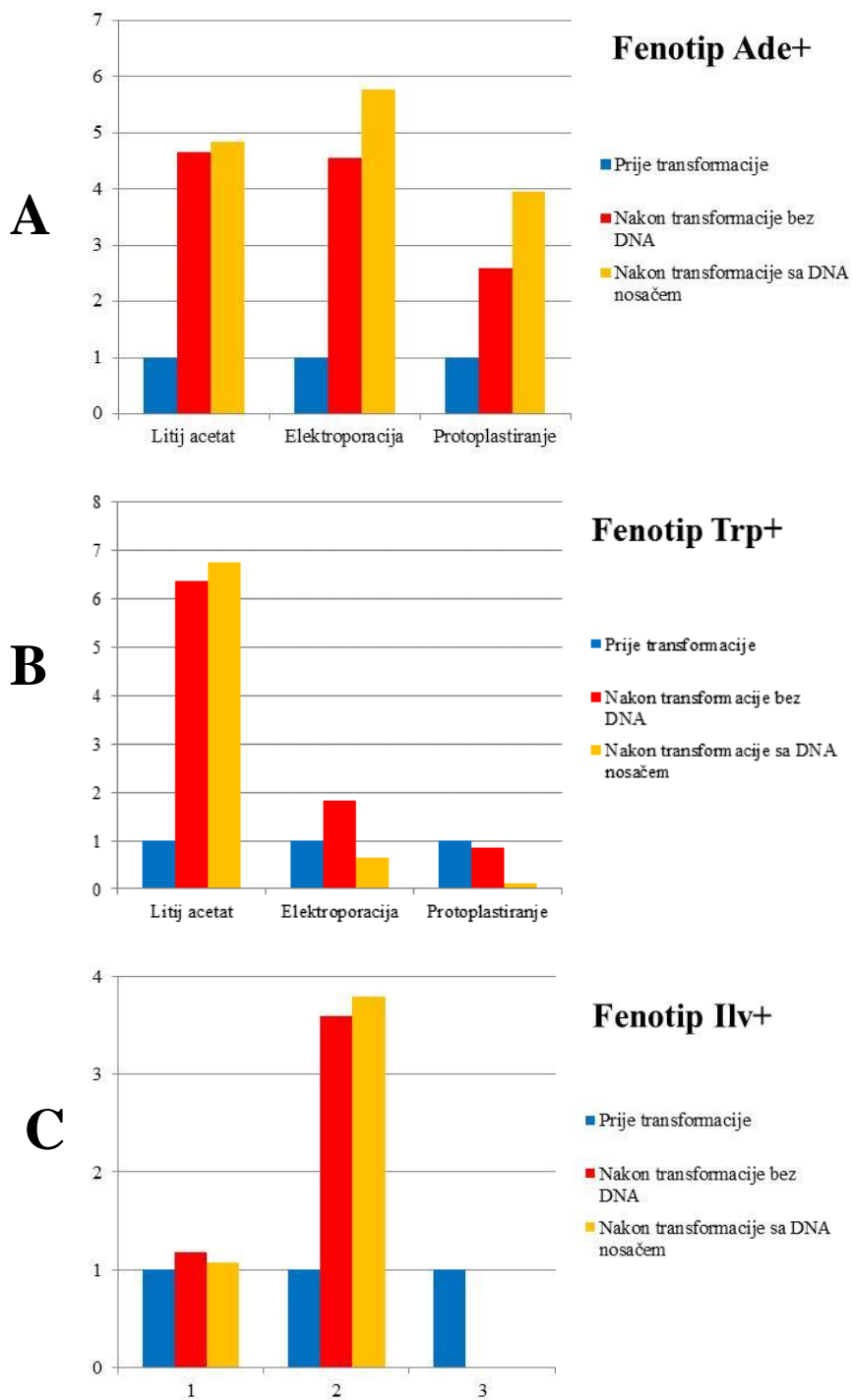
		Litij acetat		Elektroporacija		Protoplastiranje		
		Eksperiment		Eksperiment		Eksperiment		
		1	2	1	2	1	2	
Ade⁺	Broj rekombinanata / ukupni broj prije transformacije	$\frac{25000}{20000000}$	$\frac{7000}{2665000}$	$\frac{1000}{7822000}$	$\frac{24000}{4782000}$	$\frac{62000}{2240000}$	$\frac{109000}{2592000}$	
	Broj rekombinanata / ukupni broj nakon transformacije	Bez DNA	$\frac{1182000}{19450000}$	$\frac{1894000}{27295000}$	$\frac{15000}{4375000}$	$\frac{103000}{6975000}$	$\frac{23000}{200000}$	$\frac{33500}{500000}$
		S DNA nosačem	$\frac{285000}{21725000}$	$\frac{288000}{23800000}$	$\frac{12000}{5400000}$	$\frac{327000}{8425000}$	$\frac{113000}{1000000}$	$\frac{82500}{500000}$
Trp⁺	Broj rekombinanata / ukupni broj prije transformacije	$\frac{10}{2000000}$	$\frac{5}{2665000}$	$\frac{45}{7822000}$	$\frac{6}{4782000}$	$\frac{46}{2240000}$	$\frac{88}{2592000}$	
	Broj konvertanata / ukupni broj nakon transformacije	Bez DNA	$\frac{912}{19450000}$	$\frac{922}{27295000}$	$\frac{167}{4375000}$	$\frac{14,5}{6975000}$	$\frac{10}{200000}$	$\frac{12,5}{500000}$
		S DNA nosačem	$\frac{270}{21725000}$	$\frac{283}{23800000}$	$\frac{122}{5400000}$	$\frac{9}{8425000}$	$\frac{0}{1000000}$	$\frac{3,5}{500000}$
Ilv⁺	Broj rekombinanata / ukupni broj prije transformacije	$\frac{1}{2000000}$	$\frac{1}{2665000}$	$\frac{1}{7822000}$	$\frac{3}{4782000}$	$\frac{0}{2240000}$	$\frac{15}{2592000}$	
	Broj revertanata / ukupni broj nakon transformacije	Bez DNA	$\frac{6}{19450000}$	$\frac{4}{27295000}$	$\frac{3,5}{4375000}$	$\frac{23}{6975000}$	$\frac{0}{200000}$	$\frac{0}{500000}$
		S DNA nosačem	$\frac{16}{21725000}$	$\frac{18}{23800000}$	$\frac{7}{5400000}$	$\frac{25}{8425000}$	$\frac{0}{1000000}$	$\frac{0}{500000}$

Vidljivo je da je veći broj rekombinanata fenotipa Ade⁺ usporedbi sa konvertantima fenotipa Trp⁺ i revertantima fenotipa Ilv⁺ (tablica 6). Najveći postotak rekombinanata (fenotip Ade⁺) je zabilježen nakon transformacije protoplastiranjem, a najmanji nakon transformacije elektroporacijom. Također nakon protoplastiranja primijećeno je više konvertanata (fenotip Trp⁺) u odnosu na transformacije pomoću litijevog acetata i elektroporacije. Broj revertanata (fenotip Ilv⁺) je nakon transformacije pomoću litijevog acetata i elektroporacije podjednak, dok kod protoplastiranja nije zabilježen.

Tablica 6. Broj poraslih rekombinanata, konvertanata i revertanata prije i nakon transformacije izražen u postotku

		Litij acetat		Elektroporacija		Protoplastiranje		
		Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 1	Eksperiment 2	
Ade ⁺	Udio rekombinanata prije transformacije (%)		1,41	0,273	0,012	0,479	3,04	4,14
	Udio rekombinanata nakon transformacije (%)	Bez DNA	6,31	1,32	0,0741	1,41	11,25	6,13
		S DNA nosačem	6,84	1,32	0,0413	3,88	11,3	17,29
Trp ⁺	Udio rekombinanata prije transformacije (%)		$5,65 \cdot 10^{-4}$	$1,95 \cdot 10^{-4}$	$5,42 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,25 \cdot 10^{-3}$	$3,35 \cdot 10^{-3}$
	Udio konvertanata nakon transformacije (%)	Bez DNA	$3,62 \cdot 10^{-3}$	$1,23 \cdot 10^{-3}$	$1,01 \cdot 10^{-3}$	$2,14 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$1,929 \cdot 10^{-3}$
		S DNA nosačem	$3,31 \cdot 10^{-3}$	$1,49 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-4}$	$6,99 \cdot 10^{-5}$	0	$7,5 \cdot 10^{-4}$
Ilv ⁺	Udio rekombinanata prije transformacije (%)		$5,65 \cdot 10^{-5}$	$3,91 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$5,99 \cdot 10^{-5}$	0	$5,7 \cdot 10^{-4}$
	Udio revertanata nakon transformacije (%)	Bez DNA	$2,77 \cdot 10^{-5}$	$7,34 \cdot 10^{-5}$	$1,93 \cdot 10^{-5}$	$3,34 \cdot 10^{-4}$	0	0
		S DNA nosačem	$1,63 \cdot 10^{-5}$	$7,24 \cdot 10^{-5}$	$2,45 \cdot 10^{-5}$	$3,32 \cdot 10^{-4}$	0	0

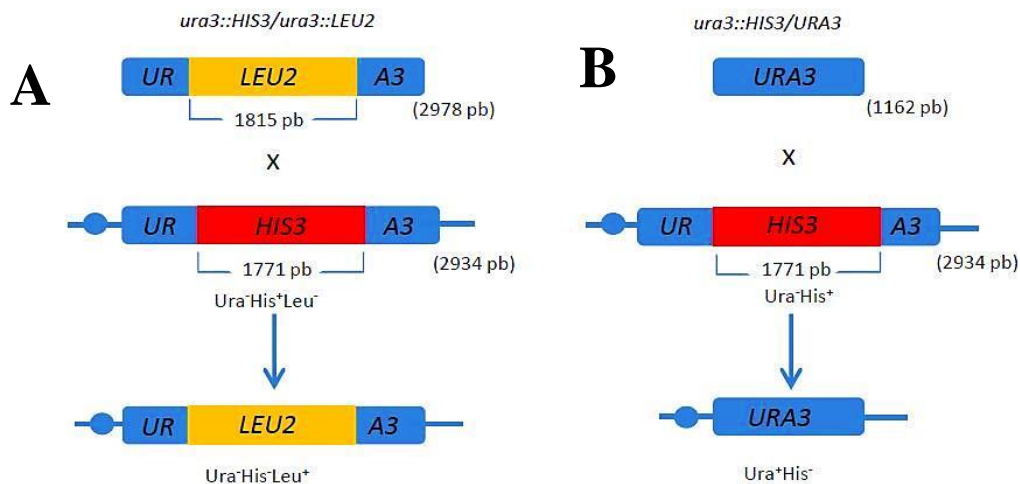
Na slici 6 prikazani su histogrami odnosa broja rekombinanata, konvertanata i revertanata prije transformacije usporedbi s brojem poraslih stanica nakon provedene transformacijske metode bez DNA i sa nespecifičnom DNA (DNA nosačem). Svaki histogram se odnosi na jedan tip promjene koja se koristi kako bi se pratio odgovarajući rekombinacijski događaj te je na apscisi naznačeno o kojoj transformacijskoj metodi se radi. Također vidljiva je razlika u povećanom broju rekombinanata fenotipa Ade⁺ u usporedbi sa brojem konvertanata fenotipa Trp⁺ i revertanata fenotipa Ilv⁺.



Slika 6. Histogrami odnosa (A) broja rekombinanata (fenotip Ade⁺), (B) konvertanata (fenotip Trp⁺) i (C) revertanata (fenotip Ilv⁺) prije i nakon transformacije. Fenotip Ade⁺ ukazuje na mitotičku recipročnu rekombinaciju (*engl.* crossing over), fenotip Trp⁺ ukazuje na konverziju gena te fenotip Ilv⁺ na reverziju.

4.3.2. Utjecaj metode transformacije na udio aberantnih genetičkih događaja

Eksperimenti su provedeni s dvije različite transformirajuće DNA (*URA3* i *ura3::LEU2*, slika 7 i tablica 7) kako bi se utvrdilo utječe li duljina i struktura DNA na spektar i udio pojedinih transformacijskih događaja.



Slika 7. Prikaz genskog ciljanja „krajevi van“ u soju BYaUH transformirajućim fragmentima *ura3::LEU2* i *URA3*. **(A)** Prikazana je zamjena gena fragmentom *ura3::LEU2*, duljine 2978 pb. U tom eksperimentalnom sustavu nastoji se zamijeniti *ura3::HIS3* regija koja se nalazi na kvašćevom kromosomu. Ako dođe do uspješne zamjene gena očekivani fenotip soja je *Ura⁺His⁺Leu⁺*, jer će se transformirajući fragment ugraditi u ciljno mjesto u kvašćevom kromosomu. **(B)** Prikazana je zamjena gena fragmentom *URA3*, duljine 1162 pb. U ovom eksperimentalnom sustavu nastoji se zamijeniti *ura3::HIS3* regija koja se nalazi na kvašćevom kromosomu. Ako dođe do uspješne zamjene gena očekivani fenotip soja je *Ura⁺His⁻*, jer će se transformirajući fragment ugraditi u ciljno mjesto u kvašćevom kromosomu.

Tablica 7. Transformirajući DNA fragmenti

Naziv	Ishodišni plazmid	Veličina(pb)	Opis
<i>URA3</i>	pAGU2	1162	Gen <i>URA3</i>
<i>ura3::LEU2</i>	pAULI	2978	Gen <i>URA3</i> prekinut je genom <i>LEU2</i> u restrikcijskom mjestu <i>StuI</i>

Za transformaciju soja BYaUH, kao što je već navedeno, korištene su tri različite metode transformacije. U ispitivanju efikasnosti transformacije (tablica 8) kao kontrola korišten je plazmid pLS42 (poglavlje 3.1.1.3.).

Tablica 8. Efikasnost transformacije

Metoda transformacije	Litij acetat		Elektroporacija	Protoplastiranje	
	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 1	Eksperiment 1	Eksperiment 2
Efikasnost transformacije (tr/ μ g pLS42)	$5,0 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$5,65 \cdot 10^4$	$3,39 \cdot 10^4$

Svakom metodom dobiven je različit broj poraslih transformanata selekcioniranih na krutim podlogama bez uracila (ukoliko je korišten transformirajući fragment *URA3*) ili bez leucina (ukoliko je korišten transformirajući fragment *ura3::LEU2*). Porasli transformanti selekcionirani na podlozi bez uracila ili bez leucina (fenotip Ura^+His^- ili Leu^+His^-) replicirani su na podlogu bez uracila i histidina ili bez leucina i histidina kako bi se utvrdilo koji od transformanata imaju aberantni fenotip Ura^+His^+ ili Leu^+His^+ . Transformanti koji nisu porasli na podlozi bez uracila i histidina ili bez leucina i histidina imaju fenotip Ura^+His^- ili Leu^+His^- i nastali su zamjenom ciljnog gena transformirajućom DNA, dok su transformanti koji rastu na podlozi bez uracila i histidina ili bez leucina i histidina nastali nekim od aberantnih genetičkih događaja (ilegitimna rekombinacija, integracija transformirajuće DNA do ciljne regije ili duplikacija ciljnog kromosoma). Rezultati transformacije nakon ove analize prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Broj transformanata aberantnog fenotipa nakon elektroporacije i protoplastiranja

Metoda transformacije		Elektroporacija	Protoplastiranje
<i>URA3</i>	Broj poraslih transformanata	75	8
	Broj aberanata / analizirani transformanti (%)	18/75 (24,00%)	3/8 (37,50%)
<i>ura3::LEU2</i>	Broj poraslih transformanata	102	20
	Broj aberanata / analizirani transformanti (%)	80/102 (78,43%)	7/20 (35,00%)

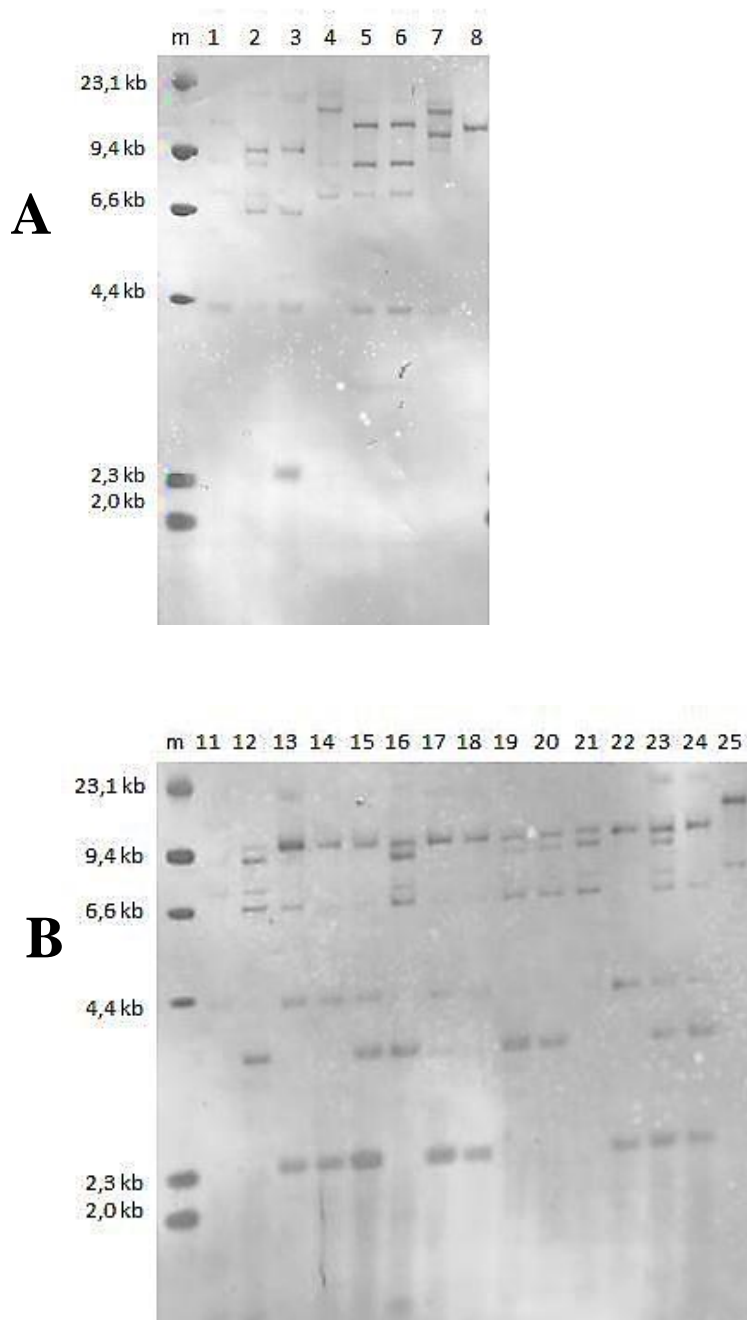
Iz rezultata transformacije vidljivo je da na učestalost aberantnih genetičkih događaja utječu razlike u strukturi transformirajuće DNA i metodi transformacije.

4.3.3. Utjecaj metode transformacije na spektar aberantnih genetičkih događaja

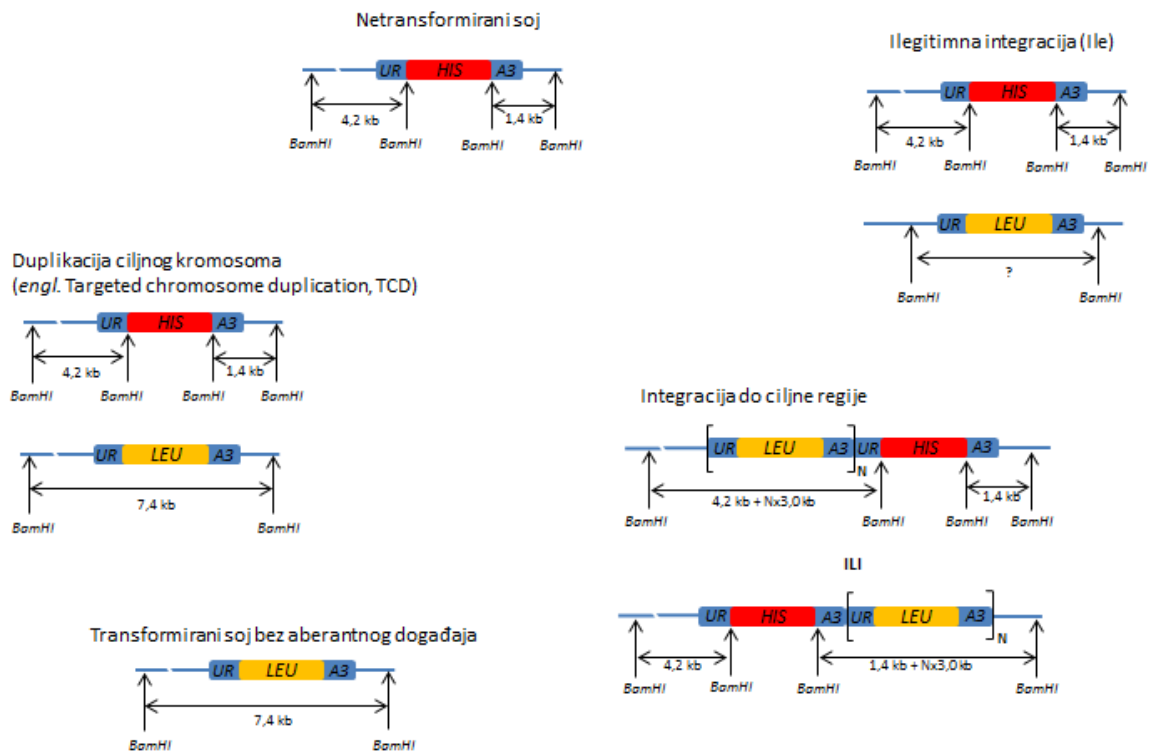
Prilikom transformacije kvasca BYauH transformirajućim DNA *URA3* ili *ura3::LEU2* očekivani genetički događaj je zamjena gena *ura3::HIS3* iz genoma transformirajućom DNA, a ciljna zamjena gena detektirana je auksonografskom analizom na selektivnim podlogama (fenotip Ura⁺His⁻ ili Leu⁺His⁻). Kod aberantnih transformanata, transformirajući fragment nije se integrirao u ciljno, već u neko drugo mjesto u genomu (fenotip Ura⁺His⁺ ili Leu⁺His⁺).

Dobiveni transformanti s aberantnim fenotipom analizirani su hibridizacijom po Southern-u pri čemu je korištena neradioaktivno obilježena DNA proba koja se komplementarno sparuje sa genom *URA3*.

Molekularnom analizom metodom hibridizacije DNA po Southern-u analizirani su nasumično odabrani transformanti s aberantnim fenotipom dobiveni transformacijom s fragmentom *ura3::LEU2* (tablica 13). Analizirano je ukupno 20 transformanata dobivenih pomoću litij acetata, 12 elektroporacijom i 6 protoplastiranjem. Kao kontrola, korištena su 2 nasumično izabrana transformanata fenotipa Leu⁺His⁻ kod kojih je došlo do ciljne zamjene gena. Za molekularnu analizu, genomska DNA transformanata pocijepana je restriksijskom endonukleazom *BamHI* (slika 8). Rezultati molekularne analize transformanata i shematsko objašnjenje rezultata prikazani su na slikama 8 i 9. Na membrani je vidljivo više fragmenata nego što je očekivano nakon restrikcije genoma endonukleazom *BamHI* zbog parcijalnog cijepanja.



Slika 8. Molekularna analiza transformanata metodom po Southern-u dobivenih transformacijom **(A)** protoplastiranjem i **(B)** pomoću litijevog acetata fragmentom *ura3::LEU2*. Genomska DNA rezana je restriksijskom endonukleazom *BamHI* i hibridizirana s obilježenom sondom za hibridizaciju s genom *URA3*. U jažici m nalazi se DNA bakteriofaga λ rezana endonukleazom *HindIII*, u jažicama 1 i 11 netransformirani soj, jažice 8 i 25 zamjena gena (*engl.* gene replacemant) i ostale jažice su aberantni transformanti Leu^+His^+ (jažica 3 – ilegитimna integracija, jažice 5,6,12,16,19,20,23,24 – duplikacija ciljnog kromosoma i jažice 2,4,7,13,14,15,17,18,21,22 – integracija do ciljne regije).



Slika 9. Shematsko objašnjenje rezultata dobivenih metodom po Southern-u dobivenih transformacijom fragmentom *ura3::LEU*. Genomska DNA rezana je restrikcijskom endonukleazom *BamHI* i hibridizirana s obilježenom sondom za hibridizaciju s genom *URA3*. Uz svaki skicirani mogući događaj napisan je i broj jažice u kojoj je zabilježen. Napisane su i veličine bendova koji se očekuju nakon potpunog cijepanja restrikcijskim enzimom genomske DNA nakon transformacije. Događaji koji su zabilježeni: zamjena gena, duplikacija ciljnog kromosoma, ilegitimna integracija i integracija transformirajuće DNA do ciljne regije.

Potvrđeno je da je stvarno došlo do zamjene gena kod transformiranog soja bez aberantnog genetičkog događaja tj. radi se o zamjeni gena čiji je genotip sad Leu^+His^- (jažice 8 i 25). Među najčešćim aberantnim genetičkim događajima transformacijom pomoću litijeovog acetata i protoplastiranjem uz integraciju transformirajuće DNA do ciljne regije je duplikacija petog kromosoma (TCD) na kojem se nalazi ciljni lokus *ura3::HIS3*. Na jednoj kopiji petog kromosoma lokus *ura3::HIS3* je nepromijenjen, a na drugoj kopiji je gen *ura3::HIS3* zamijenjen transformirajućom DNA koja sadrži alel *ura3::LEU2*. Ilegitimna integracija transformirajuće DNA zabilježena je samo nakon transformacije protoplastiranjem, a karakterizira ju ugradnja fragmenta, ne u ciljno mjesto, već u neko drugo mjesto unutar genoma. Spektar svih genetičkih događaja dobivenih transformacijom kvasca soja BYauH fragmentom *ura3::LEU2* prikazan je u tablici 10.

Tablica 10. Genetički događaji nastali nakon tri različite transformacijske metode, fragmentom *ura3::LEU2*

Transformacijska metoda	Broj pojedinih genetičkih događaja analiziranih aberanata (%)				
	Integracija lijevo od ciljane regije	Integracija desno od ciljane regije	Duplikacija ciljnog kromosoma (TCD)	Ilegitimna integracija	Integracija i lijevo i desno od ciljane regije
Litij acetat (%)	4 (20,00%)	9 (45,00%)	6 (30,00%)	0 (0,00%)	1 (5,00%)
Elektroporacija (%)	4 (33,33%)	7 (58,34%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (8,33%)
Protoplastiranje (%)	1 (16,67%)	2 (33,33%)	2 (33,33%)	1 (16,67%)	0 (0,00%)

Iz rezultata molekularne analize vidljivo je da se spektar genetičkih događaja razlikuje ovisno o transformacijskoj metodi. Također je vidljivo da je su među najčešćim aberantnim genetičkim događajima duplikacija ciljnog kromosoma (TCD) i integracija odmah do ciljane regije.

5. RASPRAVA

Do sad su zabilježeni razni molekularni događaji nakon genskog ciljanja „krajevi van“ (Svetec i sur., 2007; Štafa i sur., 2014), no nije uspoređen utjecaj transformacijskih metoda (transformacija pomoću litijevog acetata, elektroporacije i protoplastiranja) na udio ciljne zamjene gena i pojave neželjenih genetičkih događaja ovisno o dizajnu transformirajuće DNA i frekvencije rekombinacijskih događaja u prisutnosti nespecifične DNA (DNA nosača). Također, u ovom radu uspoređeno je i preživljenje stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ovisno o korištenim metodama transformacije. Spektar aberantnih događaja obuhvaća ilegitimnu rekombinaciju, integraciju transformirajuće DNA do ciljane regije i duplikaciju ciljnog kromosoma (*engl.* targeted chromosome duplication, TCD) te je provjeren i potvrđen molekularnom analizom hibridizacijom po Southern-u.

5.1. Utjecaj metode transformacije na preživljenje stanica kvasca

Soj D7 podvrgnut je različitim metodama transformacije ovisno o upotrebi nespecifične DNA (DNA nosača) da bi se uvidio utjecaj same metode na uspješnost transformacije, preživljenje stanica i frekvenciju odgovarajućih rekombinacijskih događaja. Pokazalo se da je preživljenje veće u eksperimentima gdje je korištena nespecifična DNA (DNA-nosač) nego u slučaju kad se nije koristila DNA, gdje je kvasac podvrgnut samo transformacijskoj metodi. Statistički značajnim pokazalo se preživljenje nakon provedene metode pomoću litijevog acetata ($p < 0,0173$), dok su kod elektroporacije i protoplastiranja rezultati bili iznad granice statističke značajnosti. Iz tablica 7 i 11 vidljiva je razlika u preživljenju kvasca ovisno o korištenju nespecifične DNA (DNA nosača).

Tablica 11. Postotak preživljenja soja D7 nakon transformacije pomoću litij acetata

	Eksperiment 1	Eksperiment 2
bez DNA	43,77 %	34,19 %
s DNA nosačem	62,83 %	50,45 %

Preživljenje soja D7 bilo je različito ovisno o korištenoj metodi i tipovima transformirajuće DNA, a najveća razlika uočena je prilikom korištenja transformacije pomoću litijeveg acetata.

5.2. Utjecaj metode transformacije na rekombinacijske događaje

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj pojedine transformacijske metode na frekvenciju i spektar odgovarajućih rekombinacijskih događaja kako bi se mogle objasniti i promjene u postotku zamjene gena i aberantnih genetičkih događaja uzrokovanih različitim transformacijskim metodama. Pomoću soja D7 (Freeman i Hoffman, 2007) koji ima alele *ade2-40* i *ade2-119*; *trp5-12* i *trp5-27*; *ilv1-92*, moguće je efikasno detektirati mitotičku konverziju u genu *trp5*, mitotičku recipročnu rekombinaciju (*engl.* crossing over) i konverziju u genu *ade2* te točkaste mutacije uzrokovane reverzijom u genu *ilv1*. D7 je heteroalelan za *trp5* (*trp5-12/trp5-27*), zahtjeva dodatak triptofana u podlogu, a mitotičkom konverzijom gena nastaju rekombinanti fenotipa Trp⁺. Aleli *ade2-40* i *ade2-119* izloženi su interalelnoj komplementaciji, čineći D7 adenin prototrofom koji producira tipične bijele kolonije fenotipa Ade⁺. Lokus *ilv1-92* je homozigotan i omogućuje detekciju točkastih mutacija selekcijom na podlogama bez izoleucina, prilikom čega su porasle kolonije fenotipa Ilv⁺. Geni *trp5*, *ade2* i *ilv1* nalaze se na različitim kromosomima i spontane frekvencije njihovih rekombinacijskih događaja su najmanje 100 puta veće nego prosječne frekvencije određene mutacije, dok se tretmanom mutagenom ili stresom može povećati frekvencija rekombinacije pa je u ovom sustavu moguća detekcija slučajnih i induciranih genetičkih događaja.

Tablica 12. Omjer broja rekombinanata, konvertanata i revertanata nakon transformacije

		Litij-acetat	Elektroporacija	Protoplastiranje
Ade ⁺	Bez DNA	4,66	4,56	2,59
	S DNA nosačem	4,84	5,77	3,95
Trp ⁺	Bez DNA	6,36	1,82	0,84
	S DNA nosačem	6,75	0,64	0,11
Ilv ⁺	Bez DNA	1,18	3,59	0
	S DNA nosačem	1,07	3,79	0

Rekombinanti su selekcionirani nacjepljivanjem soja kvasca D7 nakon svake metode transformacije na podloge bez adenina, bez triptofana i bez izoleucina (prikazano na slikama 2 i 3). Iz tablice 12 i slike 6 vidljivo je da je povećanje broja rekombinanata (fenotip Ade⁺) podjednako kod sve tri transformacijske metode te ne postoji značajna razlika ovisno o upotrebi nespecifične DNA (DNA nosača). Broj konvertanata (fenotip Trp⁺) značajno je veći nakon transformacije pomoću litijevog acetata, dok kod sve tri metode broj rekombinanata ne ovisi o upotrebi nespecifične DNA (DNA nosača) (slika 6). Broj revertanata (fenotip Ilv⁺) je podjednak neovisno u upotrebi nespecifične DNA prilikom provedbe metode, a najveći je nakon elektroporacije.

Prilikom protoplastiranja nisu zabilježeni revertanti (fenotip Ilv⁺) i jedna mogućnost je da stanice u kojima se dogodila reverzija nisu preživjele budući da je ukupno preživljenje nakon protoplastiranja bilo nisko. Druga mogućnost je da se reverzija ne događa često budući da se pokazalo i kod ostalih metoda da je broj poraslih revertanata jako nizak u odnosu na slučajne mitotičke rekombinante i konvertante (slika 6).

Značajno je povećan broj rekombinanata (fenotip Ade⁺) u odnosu na konvertante i revertante, što bi sugeriralo da ove transformacijske metode potiču mitotičku recipročnu rekombinaciju (*engl.* crossing over) više nego konverziju i reverziju. S druge strane, mitotička konverzija u lokusu *trp5* najveća je nakon provedene metode pomoću litijevog acetata dok je nakon elektroporacije primijećena povećana reverzija u genu *ilv1* (slika 6).

Iz rezultata se vidi kako se povećava broj rekombinanata, konvertanata i revertanata nakon provedene transformacije u odnosu na početni broj tj. povećava se postotak slučajnih mitotičkih rekombinanata, što može sugerirati da je došlo do pojačane rekombinacije nakon izlaganja stanica kvasca stresnim uvjetima. Fabre i Roman (1977) sugerirali su da je većina stanica reprimirana za rekombinaciju, no izlaganjem stanica stresu dolazi do sinteze proteina potrebnih za odgovor na stres i popravak DNA. Pokazalo da je frekvencija mitotičkih rekombinanata, konvertanata i revertanata na nepovezanim lokusima reproducibilna i statistički značajna nakon provedenih eksperimenata transformacije.

5.3. Utjecaj metode transformacije na spektar aberantnih događaja

Tehnologija zamjene gena genskim ciljanjem „krajevi van“ omogućuje uvođenje preciznih promjena u bilo koju ciljnu regiju u genomu te se zbog toga često primjenjuje u genetičkom inženjerstvu. Osim zamjene ciljnog lokusa transformirajućim fragmentima DNA, može se dogoditi i cijeli spektar neželjenih događaja, kao što su ilegitalna integracija, duplikacija ciljnog kromosoma ili integracija transformirajuće DNA odmah do ciljne regije (Svetec i sur., 2007).

U ovom radu određen je i utjecaj tri različite metode (transformacija pomoću litijeveg acetata, elektroporacija i protoplastiranje) na spektar genetičkih događaja koji nastaju kao tijekom rekombinacije „krajevi-van“ u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* soj BYauH.

Eksperimentalni sustav korišten za dobivanje rezultata opisan je u radu Štafe i suradnika (2014). Soj BYuaH koji u ciljnom lokusu na petom kromosomu sadrži nefunkcionalan alel *URA3* (*ura3::HIS3*), transformiran je sa dvije transformirajuće DNA, *URA3* i *ura3::LEU2*. Fragment *ura3::LEU2* sadrži gen *URA3* prekinut funkcionalnim genom *LEU2*. Očekivani genetički događaj je zamjena ciljnog gena *ura3::HIS3* transformirajućom DNA. Spektar svih genetičkih događaja dobivenih transformacijom metodama prikazani su u tablici 10 i na slici 7.

Prema Štafi i suradnicima (2014) prilikom genskog ciljanja „krajevi-van“ transformirajuća DNA može se integrirati u genom do ciljne regije, može izazvati duplikaciju ciljnog kromosoma ili integrirati nasumično ilegitalnom rekombinacijom, što su pokazali i rezultati u ovome radu.

Usporedbom rezultata dobivenih transformacijom pomoću litijeveg acetata, elektroporacije i protoplastiranja uočena je razlika u učestalosti ciljne zamjene gena. Moguće je da razlike u samom postupku transformacije uzrokuju ulazak transformirajućih fragmenata različitim mehanizmima, kao i ulazak različitog broja transformirajućih fragmenata u stanicu. Pri provedbi eksperimenata pokazalo se da je najveće preživljenje i broj transformanata zabilježen nakon transformacije pomoću litijeveg acetata (tablica 13).

Tablica 13. Ukupni broj transformanata poraslih na selektivnim podlogama

Metoda transformacije		Litij acetat	Elektroporacija	Protoplastiranje
<i>URA3</i>	Ukupni broj poraslih transformanata	1391	75	8
<i>ura3::LEU2</i>	Ukupni broj poraslih transformanata	240	102	20

Učestalost zamjene gena ovisi o veličini transformirajuće DNA i korištenoj metodi kao što je prikazano u tablici 6. Osim toga, vidljivo je da je jedino među transformantima dobivenim protoplastiranjem uočena i ilegitalna integracija, dok kod ostale dvije metode nije zapažena. Također kod transformacije pomoću litijevog acetata i transformacije protoplastiranjem, zabilježena je pojava duplikacije ciljnog kromosoma, dok kod elektroporacije nije. Zanimljivo je da metoda transformacije utječe na spektar genetičkih događaja koji su posljedica genskog ciljanja, „krajevi van“, ali je potrebno analizirati puno više transformanata kako bi se moglo zaključiti o dominantnom aberantnom događaju kod svake metode (postotak analiziranih aberantnih transformanata metodom po Southern-u naveden je u tablici 14).

Tablica 14. Postotak analiziranih transformanata aberantnog fenotipa metodom po Southern-u

Metoda transformacije		Litij acetat	Elektroporacija	Protoplastiranje
Transformirajuća DNA <i>ura3::LEU2</i>	Broj analiziranih aberanata / ukupni broj transformanata(%)	20/208 (9,62%)	12/102 (11,76%)	6/20 (30,00%)

Kao što je već navedeno u uvodu, Gietz i Woods (2001) su opisali razlike u transformacijskim metodama koje mogu doprinijeti spektru genetičkih događaja. Litij acetat permeabilizira stanice za dok PEG taloži transformirajuću DNA na stijenku, iako točan mehanizam djelovanja zapravo nije poznat. Tijekom transformacije stanice se izlažu i toplinskom šoku (*engl.* heat-shock) kako bi se povećala efikasnost transformacije (Gietz i Woods 2001).

Prilikom transformacije elektroporacijom stanice se izlaže kratkom električnom pulsu struje visokog napona koji rezultira stvaranjem pora na membrani i olakšava ulazak transformirajuće DNA.

Tijekom transformacije protoplastiranjem stanicama se u potpunosti ili djelomično uklanja stanična stijenka i olakšan je unos transformirajuće DNA. Ujedno, stanice moraju biti u sorbitolu zbog očuvanja osmotskog tlaka i nacjepljuju se u regeneracijski agar koji omogućuje obnavljanje stanične stijenke. Kao i kod transformacije pomoću litijeveg acetata, stanice su i nakon protoplastiranja izložene kratkom toplinskom šoku dok se agar ne ohladi (Gietz i Woods, 2001). Primjenom ove tri metode transformacije, u stanici nastaju različiti uvjeti koji mogu utjecati na rekombinaciju i rezultirati spektrom različitih genetičkih događaja.

Aberantni transformanti, analizirani u ovom radu, su svi oni transformanti kod kojih rekombinacija „krajevi van“ nije rezultirala ciljnom zamjenom gena nego je uzrokovala neke neželjene genetičke događaje. Već je navedeno da su za transformaciju korištene dvije transformirajuće DNA kako bi se utvrdilo utječe li struktura transformirajuće DNA na spektar molekularnih događaja.

Heteroalelni transformanti su aberantni transformanti koji sadrže dva peta kromosoma, jedan sa nepromijenjenim *ura3::HIS3* alelom, a drugi sa *ura3::LEU2* alelom. Ovakav aberantni genetički događaj može se objasniti na nekoliko načina. Jedna mogućnost je da se svaki kraj transformirajuće DNA komplementarno sparilo sa ciljnom DNA na različitim sestrinskim kromatidama. Interakcija transformirajuće DNA s homolognim regijama sestrinskih kromatida može uzrokovati neodjeljivanje kromatida, pri čemu će nastati jedna nulsomična i jedna disomična stanica, a disomična stanica nakon zamjene gena u jednom alelu postaje heteroalelni transformant koji ima duplikaciju ciljnog kromosoma (TCD) što je i pokazano u rezultatima molekularne analize hibridizacijom po Southern-u (poglavlje 4.3.3.). Druga mogućnost je da je prilikom transformacije došlo do ekstenzivne sinteze DNA, pri čemu je transformirajuća DNA korištena kao klica te je repliciran čitavi kromosom. Budući da su aberanti s duplikacijom ciljnog kromosoma (TCD) primijećeni kod protoplastiranja, moguća je i fuzija stanica. Naime, prilikom transformacije stanicama kvasca uklanja se stanična stijenka i koristi se polietilen-glikol koji je bitan za fuziju stanica kvasca.

Chaustova i suradnici (2008) navode da bi na spektar genetičkih događaja mogle utjecati i faze staničnog ciklusa, jer se pokazalo da je efikasnost transformacije najveća kada su stanice u S fazi, a najmanja u M fazi.

Uzevši u obzir i rezultate Sveteca i suradnika (2007) koji su također dobili heteroalelne transformante u drugom eksperimentalnom sustavu; te rezultate Štafe i suradnika (2014) u istom eksperimentalnom sustavu, može se pretpostaviti da su ovakvi događaji uobičajeni sastavni dio spektra molekularnih događaja koji nastaju kao rezultat genskog ciljanja „krajevi van“. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da je najbolje koristiti metodu transformacije pomoću litijevog acetata jer transformacija ovom metodom rezultira najvećim postotkom transformanata koji su posljedica ciljane zamjene gena.

6. ZAKLJUČCI

1. Zamjena gena može biti popraćena nepoželjnim genetičkim događajima kao što su ilegitimna rekombinacija ili duplikacija kromosoma ili integracija lijevo/desno do ciljne regije, bez obzira da li je za transformaciju korištena transformacija pomoću litijevog acetata, elektroporacija ili protoplastiranje.

2. Transformacija pomoću litijevog acetata sa nespecifičnom DNA ima statistički značajan utjecaj na preživljenje stanica kvasca nakon provedene metode u odnosu na provedenu metodu bez DNA.

3. Udio aberantnih genetičkih događaja ovisi metodi transformacije.

7. ZAHVALE

Ovom prilikom zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Ivanu-Krešimiru Svetecu što mi je omogućio izradu ovog rada, savjetima i pomoći.

Posebne zahvale upućujem višoj asistentici dr. sc. Anamariji Štafa na strpljenju i čeličnim živicama, uloženom vremenu, savjetima kojima me vodila kroz eksperimente i pomoći u savladavanju eksperimentalnih tehnika rada.

Zahvaljujem i asistentu mag. ing. Bojanu Žunaru koji me je uvijek utješio kad su eksperimenti krenuli u neželjenom smjeru.

Također, srdačno zahvaljujem poslijedoktorantici dr.sc. Marini Miklenić, stručnim suradnicima Ani Lončar i Davoru Nestiću što su uvijek bili spremni pomoći i što su održavali ugodnu i prijateljsku radnu atmosferu.

I hvala Beti što je uvijek bila podrška.

8. POPIS LITERATURE

Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* **79**(2), 137-158.

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.

Chaustova, L., Miliukienė, V., Zimkus, A., Razumas, V. (2008) Metabolic state and cell cycle as determinants of facilitated uptake of genetic information by yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Centr Eur J of Biol* **3**(4), 417-421.

EUROSCARF (2014) BY4743 (Y20000) yeast wild type strains <http://www.euroscarf.de/plasmid_details.php?accno=Y20000>, European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis. Pristupljeno 21. veljače 2016.

Fabre, F., Roman, H. (1977) Genetic evidence for inducibility of recombination competence in yeast. *P Natl Acad Sci* **74**, 1667-1671.

Freeman, K.M., Hoffmann, G.R. (2007) Frequencies of mutagen-induced coincident mitotic recombination at unlinked loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **616**, 119-132.

Gietz, R.D., Woods, R.A. (2001) Genetic transformation of Yeast. *BioTechniques* **30**, 816-831.

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**, 563–567.

Grba, S. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Plejada d.o.o, Zagreb.

- Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *J Hyg* **27(2)**, 113-159.
- Haber, J.E. (2012) Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191(1)**, 33-64.
- Hastings, P.J., McGill, C., Shafer B., Strathern, J.N., (1993) *Ends-in* versus *ends-out* recombination in yeast. *Genetics* **135**, 973-980.
- 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. *P Natl Acad Sci U S A* **75**, 1929-1933.
- Kjeldsen, T. (2000) Yeast secretory expression of insulin precursors. *Appl Microbiol Biot* **54**, 277-286.
- 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 (1)**, 263-273.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *P Natl Acad Sci U S A* **78**, 6354-6358.
- Rothstein, R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 202-211.
- Saccharomyces* Genome Database (2016) <<http://www.yeastgenome.org/genomesnapshot>>. Pristupljeno 30. ožujka 2016.
- 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.

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.

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., 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* **22**, 12-23.

Zgaga, Z. (1991) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with UV-irradiated single-stranded plasmid. *Mutat Res* **263**, 211-215.

Zimmermann, F.K., Kern, R., Rasenberger H. (1975) A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation. *Mutat Res* **28**, 381-388.

9. SAŽETAK

Utjecaj metode za unos DNA na spektar rekombinacijskih događaja u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

Egzogena (transformirajuća) DNA u kvasac *Saccharomyces cerevisiae* može se unijeti različitim metodama kao što su transformacija pomoću litijevog acetata, elektroporacija i protoplastiranje. Za razliku od ostalih eukariotskih organizama, transformirajuća DNA u genom kvasca najčešće se integrira homolognom rekombinacijom, što ovu jednostaničnu gljivu čini idealnim modelnim organizmom za istraživanja procesa homologne rekombinacije, ali i genske terapije kod ljudi. Ipak, čak ni u kvascu, transformacija ne rezultira uvijek očekivanim rekombinacijskim događajem nego se mogu pojaviti neželjeni (aberantni) događaji. Neki od prije zabilježenih aberantnih događaja pri rekombinaciji „krajevi van“ su ilegitimna rekombinacija, integracija transformirajuće DNA do ciljne regije ili duplikacija ciljnog kromosoma. U ovom radu analiziran je utjecaj metode transformacije i strukture transformirajuće DNA na preživljenje stanica te udio i spektar aberantnih genetičkih događaja. Transformacijom soja BYauH pomoću litijevog acetata, elektroporacijom i protoplastiranjem unesena su u kvasac dva tipa transformirajuće DNA. Pokazano je da dodatak nespecifične DNA povećava preživljenje stanica kvasca pri transformaciji pomoću litijevog acetata. Dodatno, iako su neželjeni (aberantni) događaji sastavni dio spektra molekularnih događaja nakon genskog ciljanja „krajevi van“, udio pojedinih aberantnih genetičkih događaja ovisi metodi transformacije.

Ključne riječi: gensko ciljanje, rekombinacija „krajevi van“, transformacija, aberantni genetički događaji, kvasac.

10. SUMMARY

Antonio Zandona

Influence of a transformation method on a spectrum of the recombination events in the yeast
Saccharomyces cerevisiae

Exogenous (transforming) DNA can be introduced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by different transformation methods, such as lithium acetate, electroporation and spheroplast transformation. In contrast to other eukaryotic organisms, the transforming DNA fragment usually integrates in yeast's genome by homologous recombination, making this unicellular fungus an ideal model for the research of homologous recombination and even human gene therapy. However, even in yeast, transformation does not always result in the expected recombination event, but unwanted (abberant) events may occur. These, previously described, abberant events during "ends-out" gene targeting include illegitimate recombination, integration of the transforming DNA next to the target region or targeted chromosome duplication. In this research an influence of a transformation method and the design of a transforming DNA fragment on a cell survival and the spectrum of abberant genetic events were analyzed. Yeast strain BYauH was transformed using lithium acetate, electroporation and spheroplast transformation with two different transforming DNA fragments. It was shown that the addition of a carrier DNA increases the survival of yeast cells after lithium acetate transformation. Moreover, while the unwanted (abberant) events frequently occur after "ends-out" gene targeting the percentage of a specific abberant genetic event depends on the transformation method.

Key words: gene targeting, ends-out recombination, transformation, abberant genetic events, yeast