

Određivanje uspješnosti genskog ciljanja u kvascu *Kluyveromyces marxianus*

Johman, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:010295>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Karla Johman

1004/MB

**ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI
GENSKOG CILJANJA U KVASCU**
Kluyveromyces marxianus

Diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivana-Krešimira Sveteca, uz pomoć doc. dr. sc. Anamarije Štafa u sklopu projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-IP-2018-01-9717).

Želim zahvaliti mentoru prof. dr. sc. Ivanu-Krešimiru Svetecu što mi je omogućio izradu diplomskog rada u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama.

Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Anamariji Štafa na velikoj pomoći prilikom izrade i pisanja rada, na neizmjernom strpljenju i savjetima, na velikoj podršci i razumijevanju. Hvala na Vašem optimizmu te na prijateljskoj atmosferi zbog koje sam uvijek s veseljem i motivacijom pristupala svakom eksperimentu.

Također, zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima, koji su uvijek vjerovali u mene tijekom svih ovih godina studija te bez čije podrške i ljubavi moj uspjeh ne bi bio potpun.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI GENSKOG CILJANJA U KVASCU *Kluyveromyces marxianus* Karla Johman, 1004/MB

Sažetak: Kvasac *Kluyveromyces marxianus* termotolerantni je kvasac zanimljivih fizioloških svojstva zbog čega je interesantan i kao radni mikroorganizam za brojne biotehnološke procese. U ovome radu, određena je uspješnost genskog ciljanja u konstruiranom soju kvasca *K. marxianus*. U prvom koraku ovaj kvasac transformiran je linearnim fragmentom NatBAV koji sadrži selektivni biljeg *coNat* odgovoran za rezistenciju na antibiotik nurserotricin, a čija je integracija u genom potvrđena hibridizacijom po Southern-u. U drugom koraku soj koji je u genomu sadržavao fragment NatBAV, transformiran je linearnim fragmentom HygBAV koji sadrži gen *coHyg* odgovoran za rezistenciju na antibiotik higromicin, a s obje strane selektivnog biljega nalazile su se regije homologne fragmentu NatBAV. Kao rezultat uspješnog genskog ciljanja dolazi do zamjene genomske regije sekvencom na transformirajućoj DNA procesom homologne rekombinacije. Nakon selekcije na podlozi s antibiotikom higromicinom, dobiveni transformanti replicirani su na podlogu s nurserotricinom te je u 70 % transformanata utvrđena zamjena gena *coNat* genom *coHyg*. Ova uspješnost je postignuta s relativno dugim bočnim homologijama (1,4 i 2,5 kb), a na temelju rezultata je ustanovljeno da je gensko ciljanje u kvascu *K. marxianus* znatno uspješnije nego u većini drugih vrsta nekonvencionalnih kvasaca.

Glavne riječi: *Kluyveromyces marxianus*, gensko ciljanje, transformacija, homologna rekombinacija

Rad sadrži: 44 stranica, 13 slika, 3 tablice, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Anamarija Štafa

Stručno povjerenstvo:

1. doc. dr. sc. Igor Stuparević
2. prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec
3. doc. dr. sc. Anamarija Štafa
4. izv. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

DETERMINATION OF GENE TARGETING FIDELITY IN YEAST *Kluyveromyces marxianus*

Karla Johman, 1004/MB

Abstract: The yeast *Kluyveromyces marxianus* is a thermotolerant yeast with interesting physiological properties that make it interesting producer microorganism for different biotechnical processes. In this work, gene targeting fidelity in the constructed strain of yeast *K. marxianus* was determined. In the first step, this yeast has been transformed with the linear NatBAV DNA fragment containing a selectable *coNat* marker responsible for resistance to the antibiotic nourseothricin, whose random integration in the genome was confirmed by Southern blotting. In the second step, strain that contained integrated NatBAV fragment in the genome has been transformed with the linear HygBAV fragment containing *coHyg* gene responsible for antibiotic resistance to hygromycin, with flanking regions homologous to the NatBAV fragment on either side of the selective marker. As a result of successful gene targeting, the genomic region is replaced with the sequence on the transforming DNA by homologous recombination. After selection on a medium with the antibiotic hygromycin, the obtained transformants have been replicated to the medium with nourseothricin and in 70 % of the transformants the *coNat* gene was replaced with the *coHyg* gene. This fidelity was achieved with relatively long lateral homologies (1,4 and 2,5 kb) and based on the results it was found that gene targeting in *K. marxianus* was significantly more successful than in most other nonconventional yeast species.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, gene targeting, transformation, homologous recombination

Thesis contains: 44 pages, 13 figures, 3 tables, 49 references

Original in: Croatian

Graduate thesis in printed form and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD. Ivan-Krešimir Svetec, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Anamarija Štafa, Assistant Professor

Reviewers:

1. Igor Stuparević, PhD, Assistant profesor
2. Ivan-Krešimir Svetec, PhD, Full professor
3. Anamarija Štafa, PhD, Assistant professor
4. Igor Slivac, PhD, Associate professor

Thesis defended: 29. rujna 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KONVENCIONALNI KVASCI	2
2.2. HOMOLOGNA GENETIČKA REKOMBINACIJA	3
2.2.1. Primjena homologne genetičke rekombinacije	4
2.2.1.1. Modifikacija gena u dva koraka	4
2.2.1.2. Modifikacija gena u jednom koraku	5
2.3. NEKONVENCIONALNI KVASCI	6
2.3.1. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	7
2.3.2. Gensko ciljanje u nekonvencionalnim kvascima	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJAL	11
3.1.1. Plazmidi	11
3.1.1.1. Plazmid pBAV1Ke	11
3.1.1.2. Plazmidi pRS40coNat i pRS40coHyg	12
3.1.1.3. Plazmidi pNatBAV i pHygBAV	12
3.1.2. Mikroorganizmi	14
3.1.2.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	15
3.1.2.2. Kvasac <i>Kluyveromyces marxianus</i>	14
3.1.3. Hranjive podloge i otopine	14
3.1.3.1. Podloge za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i>	14
3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i>	14
3.1.3.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA	15
3.1.3.4. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica	17
3.1.3.5. Otopine za gel elektroforezu	18
3.1.3.6. Otopine za hibridizaciju DNA po Southern-u	18
3.1.4. Kemikalije, enzimi i membrane	21
3.2. METODE	21
3.2.1. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA	21
3.2.1.1. Taloženje DNA amonij acetatom i etanolom	21
3.2.1.2. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol	22

3.2.1.3. Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena	22
3.2.1.4. Izolacija kvaščeve DNA iz stanica uzgojenih u tekućoj podlozi	23
3.2.2. Cijepanje i modifikacija DNA	23
3.2.3. Transformacija bakterije <i>Escherichia coli</i> elektroporacijom	23
3.2.4. Transformacija kvaščevih stanica	25
3.2.4.1. Transformacija kvaščevih stanica elektroporacijom	25
3.2.4.2. Transformacija kvaščevih stanica litij acetatom	26
3.2.5. Gel elektroforeza	26
3.2.6. Metoda hibridizacije DNA po Southern-u	27
3.2.6.1. Priprema DNA sonde	27
3.2.6.2. Prijenos DNA na membranu	28
3.2.6.3. Predhibridizacija i hibridizacija	28
3.2.6.4. Detekcija	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. KONSTRUKCIJA PLAZMIDA pNatBAV i pHygBAV	30
4.2. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI GENSKOG CILJANJA U <i>K. marxianus</i>	33
4.2.1. Konstrukcija soja <i>K. marxianus</i> NatBAV koji sadrži ciljani lokus	34
4.2.2. Određivanje uspješnosti genskog ciljanja	35
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Gensko ciljanje je niz postupaka koji omogućavaju uvođenje preciznih genetičkih promjena u genomu, a osniva se na homolognoj rekombinaciji između linearnih fragmenata transformirajuće DNA i genomske DNA. U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* gensko ciljanje iznimno je uspješno jer se dvolančani lomovi u molekuli DNA, u mitotičkim stanicama popravljaju homolognom rekombinacijom pa stoga i transformirajuća DNA koja se unese u stanicu kvasca podliježe homolognoj rekombinaciji. Međutim, u većini drugih organizama, pa tako i u većini nekonvencionalnih vrsta kvasaca, transformirajuća DNA češće podliježe ilegitimnoj (nehomolognoj), nego homolognoj rekombinaciji. Stoga i uspješnost genskog ciljanja u ovim organizmima može biti iznimno niska.

S obzirom da posljednjih godina raste interes za primjenom drugih, nekonvencionalnih vrsta kvasaca u različitim biotehnološkim procesima, poglavito zbog njihovih industrijski poželjnih karakteristika, cilj ovog rada bio je istražiti uspješnost genskog ciljanja u odabranom soju nekonvencionalnog kvasca *Kluyveromyces marxianus*. Osim što je termotolerantan te može rasti na visokim temperaturama, kvasac *K. marxianus* odlikuje brzi rast i sposobnost korištenja širokog raspona supstrata što ga čini ekonomski vrlo poželjnom vrstom za komercijalne fermentacijske procese.

U svrhu određivanja uspješnosti ciljanja gena u kvascu *K. marxianus* u ovom radu bit će korištene dvije različite metode za transformaciju, elektroporacija i metoda pomoću litijeveg acetata i bit će konstruiran sustav za gensko ciljanje koji uključuje dva integrativna plazmida pNatBAV i pHygBAV koji u središnjem dijelu nose gene odgovorne za rezistenciju na antibiotike nurserotricin (gen *coNat*, sinonim *coNrs*) i higromicin (gen *coHyg*). U prvom koraku, bit će konstruiran soj koji sadrži gen *coNat* integriran u genom u jednoj kopiji, a konstrukcija soja bit će potvrđena hibridizacijom po Southern-u. U drugom koraku, konstruirani soj kvasca bit će transformiran s linearnim fragmentom DNA koji sadrži gen *coHyg* te će na temelju fenotipa biti određena uspješnost zamjene gena *coNat* s genom *coHyg* tj. uspješnost genskog ciljanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KONVENCIONALNI KVASCI

Kvasci su jednostanični, eukariotski mikroorganizmi koji imaju široku primjenu u tradicionalnoj i modernoj biotehnologiji u proizvodnji hrane, pića, enzima, finih kemikalija i farmaceutskih reagenasa. Osim toga, ovi organizmi važni su u istraživanjima moderne genetike, molekularne i stanične biologije te je većina istraživanja usredotočena na dvije vrste, *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* (Lane i Morrissey, 2010) i ove vrste poznate su i kao konvencionalni kvasci.

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* nepatogena je jednostanična gljiva iz razreda *Ascomycetes*, a poznat je također kao pivski, pekarski ili prehrambeni kvasac. Može postojati u haploidnom ili diploidnom obliku, a razmnožava se vegetativno pupanjem pri čemu se razlikuju stanica majka i kćer. Diploidne stanice se u nepovoljnim okolišnim uvjetima mogu razmnožavati i spolno - mejozom, pri čemu iz jedne diploidne stanice nastanu 4 haploidne spore koje se nalaze unutar askusa. Genom haploidne stanice kvasca sastoji se od 16 kromosoma veličine 200 do 2200 kb, prvi je potpuno sekvencionirani eukariotski genom (Goffeau i sur., 1996) i jednostavno se genetički modificira. Kvasac *S. cerevisiae* zbog svojih fizioloških karakteristika, najpogodniji je i najviše korišten radni mikroorganizam za industrijsku proizvodnju etanola i kvaščeve biomase.

Kao glavni izvor ugljika i energije *S. cerevisiae* koristi ugljikohidrate među kojima metabolizira monosaharide (D-glukoza, D-fruktoza, D-manoza, D-galaktoza), disaharide (saharoza, maltoza) i trisaharide (maltotrioza). Ostale monosaharide kao i sve monosaharide L-konfiguracije te pentoze ne može fermentirati. Metabolizam šećera, proizvodnja energije i međuproizvoda metabolizma u kvascu vezana je uz cikluse glikolize, pentoznog i Krebsovog ciklusa. Osim široke primjene u industriji, *S. cerevisiae* važan je kao modelni organizam u fundamentalnim istraživanjima molekularno-bioloških procesa u eukariotskim stanicama zbog toga što se jednostavno uzgaja, ima kratko generacijsko vrijeme, brzo raste, dobro je okarakteriziran i nepatogen, jeftin, pogodan za genetičke modifikacije, a sojevi kvasca *S. cerevisiae* stabilni su u haploidnom i diploidnom obliku te vijabilni s velikim brojem genetičkih markera (Sherman, 2002).

Budući da transformacijom stanica kvasca *S. cerevisiae* strana (egzogena) DNA podliježe homolognoj rekombinaciji koja je odgovorna za integraciju transformirajuće DNA u genom

(Hinnen i sur., 1978), pogodan je za uvođenje ciljanih i preciznih promjena u genomu te za primjenu genetičkih metoda u poboljšanju industrijskih sojeva kvasca radi jednostavnijeg i jeftinijeg procesa proizvodnje sirovina. Također, klasificiran je kao kvasac koji ima GRAS status (*engl.* Generally Recognized As Safe) prema Američkoj Agenciji za hranu i lijekove (*engl.* U.S. Food and Drug Administration, FDA) što znači da se smatra bezopasnim za ljudsko zdravlje (Nevoigt, 2008).

Kvasac *S. pombe* ne dijeli se pupanjem, već poprečnom diobom pa služi za proučavanje staničnog ciklusa i temeljnih procesa eukariotske stanice (Hoffman i sur., 2015).

2.2. HOMOLOGNA GENETIČKA REKOMBINACIJA

Homologna rekombinacija podrazumijeva izmjenu genetičke informacije između sekvenci DNA koje su potpuno ili gotovo potpuno homologne, a čija je duljina veća od nekoliko stotina parova baza. Ovaj proces ima esencijalne uloge u staničnim ciklusima mejoze i mitoze u većini eukariotskih organizama (Symington, 2002). U mejozi, homologna rekombinacija posreduje u izmjeni informacije između maternalnih i paternalnih alela u stanicama prekursorima gameta te tako generira raznolikost među potomstvom koje ima zajedničke roditelje. Druga važna funkcija homologne rekombinacije je da osigurava pravilnu segregaciju homolognih parova kromosoma u prvoj mejotičkoj diobi, što rezultira nastankom gameta s točnim brojem kromosoma (San Filippo i sur., 2008).

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* glavni je modelni organizam korišten za istraživanje genetičke rekombinacije u eukariotima. Istraživanja su pokazala da rekombinacija u mejozi i vjerojatno većina mitotičke rekombinacije proizlazi iz popravka dvolančanih lomova u DNA (Pâques i Haber, 1999).

U mitotičkim stanicama, homologna rekombinacija osigurava stabilnost genoma kroz precizan popravak dvolančanih lomova i drugih lezija do kojih dolazi tijekom normalnog staničnog metabolizma te zbog određenih egzogenih faktora (npr. ionizirajuće zračenje). Popravak homolognom rekombinacijom esencijalan je tijekom proliferativnih faza u razvoju i tijekom obnove somatskih stanica kod odraslih da bi se zaštitile od smrti i mutacija nastalih kao posljedica oštećenja u DNA (Moynahan i Jasin, 2010).

Dvolančani lom (*engl.* double strand break, DSB) je potencijalno letalno oštećenje DNA za stanicu. Osnovni mehanizmi popravka dvolančanog loma su: homologna rekombinacija (HR), koja zahtjeva neoštećenu homolognu sekvencu DNA koja služi kao kalup za popravak oba oštećena lanca i ilegitimna rekombinacija (*engl.* non-homologous end joining, NHEJ) koja uključuje direktnu ligaciju krajeva DNA te nije potreban lanac kalup. Stanica odabire kojim mehanizmom će se popravak odvijati ovisno o fazi staničnog ciklusa u kojoj se nalazi, a osim toga odabir ovisi i o tipu i ploiditetu stanice te je sam mehanizam popravka strogo kontroliran (Symington i Gautier, 2011).

U somatskim stanicama viših eukariota, dvolančani lomovi najčešće se popravljaju nehomolognom (ilegitimnom) rekombinacijom, dok u kvascu *S. cerevisiae* prevladava homologna rekombinacija (Heslot i Gaillardin, 1992).

2.2.1. Primjena homologne genetičke rekombinacije

Velika efikasnost homologne rekombinacije i napredak tehnologije rekombinantne DNA, omogućili su uvođenje preciznih ciljanih genetičkih promjena pomoću integrativnih fragmenata DNA u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, ali i u drugim vrstama. Obično se primjenjuju dva pristupa za gensko ciljanje: modifikacija gena u dva koraka (poglavlje 2.2.1.1.) i modifikacija gena u jednom koraku (poglavlje 2.2.1.2.).

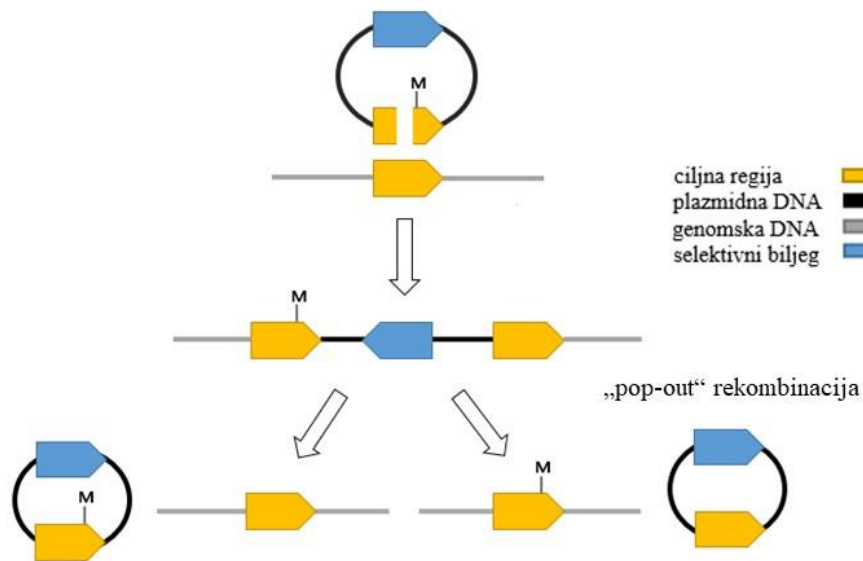
2.2.1.1. Modifikacija gena u dva koraka

Osnovna strategija modifikacije gena u dva koraka je uvođenje željene modifikacije u određenu regiju integrativnog plazmida koja je homologna ciljnoj sekvenci u genomu.

Plazmid se linearizira uvođenjem dvolančanog loma u modificiranu regiju kako bi se postigla usmjerena integracija plazmida u homolognu regiju u genomu. Integrativni plazmid sadrži i selektivni marker koji omogućava selekciju transformanata (Slika 1). Popravak dvolančanog loma gotovo se uvijek odvija homolognom rekombinacijom koja rezultira ciljanom integracijom plazmida, dok je procjena frekvencije nasumične (neciljane) integracije uslijed ilegitimne integracije 0,1 % (Svetec i sur., 2007).

Prilikom transformacije stanica kvasca linearnim fragmentom DNA, čiji su krajevi nakon komplementarnog sparivanja s homolognom regijom u genomu okrenuti jedan prema drugome dolazi do integracije transformirajuće DNA tipom homologne rekombinacije koji se naziva rekombinacija „krajevi-unutra“ (*engl.* „ends-in“). Kao rezultat integracije, u genomu kvasca se

duplicira ciljna regija pri čemu jedna od dvije kopije sadrži željenu modifikaciju, a između se nalazi cjelokupna plazmidna DNA. Budući da su ciljne regije homologne, ako se između njih dogodi rekombinacija uz recipročnu izmjenu (*engl.* crossing-over), dolazi do gubitka modificirane ili nemodificirane ciljne regije i plazmida sa selektivnim markerom („pop-out“ rekombinacija). Molekularnom analizom transformanata može se utvrditi prisutnost željene modifikacije u genomu.



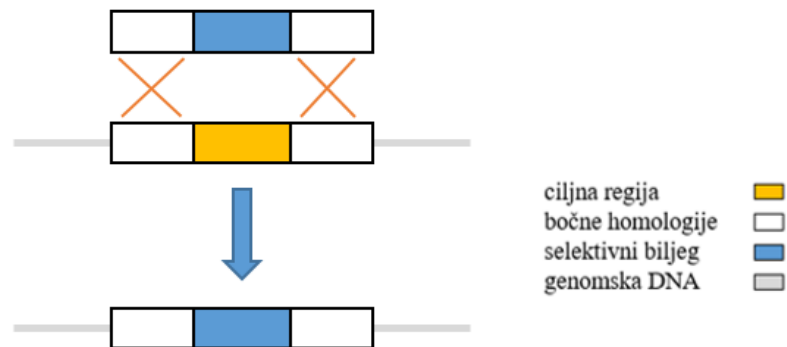
Slika 1. Shematski prikaz modifikacije gena u dva koraka. Dvolančani lom u ciljnoj regiji usmjerava integraciju plazmida u homolognu regiju u genomu. „Pop-out“ rekombinacijom dolazi do gubitka selektivnog markera te u genomu može ostati modificirani ili nemodificirani alel. M - modifikacija

2.2.1.2. Modifikacija gena u jednom koraku

Pri modifikaciji gena u jednom koraku, nakon transformacije dolazi do zamjene ciljne regije u genomu s transformirajućom DNA, pri čemu su krajevi linearnog fragmenta DNA nakon komplementarnog sparivanja s homolognom regijom u genomu okrenuti jedan od drugoga (Rothstein, 1983). Zbog toga se ovaj tip homologne rekombinacije naziva rekombinacija „krajevi-van“ (*engl.* „ends-out“) ili zamjena gena.

Linearni fragment DNA u središnjem dijelu sadrži selektivni marker koji omeđuju kraće regije DNA homologne regijama koje okružuju ciljni gen u genomu kvasca (tzv. bočne homologije, Slika 2), a posljedica zamjene ciljnog gena sa selektivnim markerom je inaktivacija tog gena. Modelni kvasac *S. cerevisiae* ima vrlo efikasan mehanizam homologne rekombinacije i omogućena je visoka efikasnost genskog ciljanja (blizu 100 %), a već samo 40 pb bočnih homologija na svakoj strani selektivnog markera omogućuje oko 10 % uspješnog genskog

ciljanja (Baudin i sur., 1993; Pâques i Haber, 1999). Međutim, zamjena gena može biti popraćena različitim neželjenim događajima kao što su ilegitalna integracija, integracija transformirajućeg fragmenta pored ciljne sekvence ili čak duplikacija ciljnog kromosoma (Svetec i sur., 2007; Štafa i sur., 2014).



Slika 2. Shematski prikaz rekombinacije „krajevi-van“. Krajevi transformirajuće DNA homologni su ciljnoj regiji u genomu, a selektivni marker omogućava selekciju transformanata.

2.3. NEKONVENCIONALNI KVASCI

Osim kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, u biotehnoškim procesima već godinama je od velikog interesa primjena i drugih vrsta kvasaca koje nazivamo nekonvencionalnim kvascima (Spencer i sur., 2002). Među ovim kvascima mogu se pronaći vrste koje imaju neke vrlo poželjne karakteristike, poput osmotolerantnosti, halotolerantnosti, termotolerantnosti, sposobnosti iskorištavanja različitih izvora ugljika, proizvodnje različitih spojeva itd.

Ovoj skupini kvasaca pripadaju određene vrste koje već imaju ulogu u proizvodnji cjepiva, terapijskih proteina, prehrambenih aditiva i bioobnovljivih kemikalija, kao što su *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* i *Yarrowia lipolytica* (Wagner i Alper, 2015). U usporedbi s kvascem *S. cerevisiae*, ovi organizmi imaju određene prednosti pa je tako primjerice *H. polymorpha* visoko termotolerantan kvasac sposoban prevoditi glukozu i ksilozu do etanola na temperaturama do 45-50 °C (Suwannarangsee i sur., 2010). Međutim, kod nekonvencionalnih kvasaca veliki nedostatak predstavlja niska efikasnost pri uvođenju ciljanih genetičkih promjena. Kada se u stanice uvede egzogena DNA, u ovim sustavima više je preferirana ilegitalna rekombinacija, koja rezultira nasumičnom integracijom disruptivske kazete ili vektora u genom, za razliku od precizne integracije kod kvasca *S. cerevisiae* koji

preferira homolognu rekombinaciju i pokazuje visoku efikasnost genskog ciljanja (Vogl i sur., 2013).

Poboljšanje metoda genskog ciljanja koje omogućavaju ciljanu integraciju omogućava istraživačima da otklone nedostatke povezane s ilegitimnom integracijom kao dominantnim mehanizmom popravka DNA u nekonvencionalnim kvascima. Horwitz i suradnici (2015) su tako primjenom CRISPR-Cas9 sustava u genomu industrijski značajnog soja kvasca *K. lactis* uspjeli postići integraciju šest gena u tri ciljana lokusa, čime je omogućena konstrukcija metaboličkog puta za prekursor biopolimera, mukonsku kiselinu.

2.3.1. *Kluyveromyces marxianus*

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* prvi je opisao danski mikolog E. C. Hansen 1888. godine i u to vrijeme bio je poznat pod nazivom *Saccharomyces marxianus* po Marxu koji je izvorno izolirao ovaj kvasac iz grožđa (Lodder i Kreger-van Rij, 1952). Opisan je kao homotalični kvasac, podklase *Hemiascomycetes*, filogenetski je srodan kvascu *Saccharomyces cerevisiae* i sestrinska vrsta bolje poznatom *Kluyveromyces lactis* (Lachance, 1998; Llorente i sur., 2000). Glavna zajednička značajka vrsta *K. marxianus* i *K. lactis* je sposobnost asimilacije laktoze i korištenja ovog šećera kao izvora ugljika. Ova karakteristika nije prisutna kod kvasca *S. cerevisiae*, pa se ove dvije vrste često izoliraju iz mliječnih izvora, kao što su fermentirana mlijeka, jogurt i sirevi (Lane i Morrissey, 2010).

Metabolizam laktoze omogućuju dva gena, *LAC12*, koji kodira za laktoza permeazu nužnu za unos laktoze u stanicu i *LAC4*, koji kodira za β -galaktozidazu koja hidrolizira laktozu na monomere glukozu i galaktozu. Kao u kvascu *S. cerevisiae*, galaktoza se dalje metabolizira do glukoze-6-fosfata Leloir-ovim putem (Rubio-Teixeira, 2005).

K. marxianus, kao i *S. cerevisiae*, ima respiro-fermentativni metabolizam te proizvodi energiju oksidativnom fosforilacijom u TCA ciklusu ili fermentacijom u etanol. Iako se *K. lactis* i *K. marxianus* obično klasificiraju kao Crabtree-negativni kvasci te preferabilno usmjeravaju metabolizam prema TCA ciklusu i optimalnoj proizvodnji energije, obje vrste imaju gene nužne za proizvodnju etanola te pod određenim uvjetima provode fermentaciju. Štoviše, *K. marxianus* sposoban je provoditi simultanu fermentaciju i respiraciju, a precizna ravnoteža između ovih metaboličkih puteva je specifična za soj (Merico i sur., 2007).

U tehnološkoj primjeni u kojoj je važna proizvodnja biomase, razlika između vrsta i sojeva kvasaca je svakako relevantan podatak. Naime, razlika u snazi Crabtree efekta očituje se čak i unutar vrsta, što objašnjava zašto su neki, ali ne i svi, sojevi *K. marxianus* vrlo uspješni u proizvodnji etanola (Hong i sur., 2007).

K. marxianus ima najveću brzinu rasta od bilo kojih drugih eukariotskih mikroba. Primjerice, u jednom istraživanju u kemostatu zabilježena je specifična brzina rasta (μ_{\max}) *K. marxianus* CBS 6566 od $0,6 \text{ h}^{-1}$ ($t_g \sim 70 \text{ min}$), a mogu se selekcionirati i sojevi s μ_{\max} od $0,8 \text{ h}^{-1}$ (Groeneveld i sur., 2008). U usporedbi sa srodnom vrstom kvasca *Kluyveromyces lactis*, o kvascu *K. marxianus* je mnogo manje poznato. Međutim, *K. marxianus* je široko primjenjivan u industriji (Tablica 1), prvenstveno zbog osobina koje su poželjne za biotehnološku primjenu. Karakteristike koje ga čine iznimno pogodnim su: sposobnost korištenja širokog raspona supstrata (laktoza, ksiloza, arabinoza, inulin), visoka brzina rasta s tipičnim generacijskim vremenom od ~ 70 minuta, termotolerantnost (rast na visokim temperaturama do $52 \text{ }^\circ\text{C}$), odsutnost fermentativnog metabolizma kod suviška šećera, visoka sposobnost sekrecije enzima, proizvodnja etanola fermentacijom (Fonseca i sur., 2008).

K. marxianus ima prirodnu sposobnost izlučivanja enzima, npr. poligalakturonaze (pektolitički enzim). Ovo svojstvo je vrlo poželjno za ekonomičnu downstream obradu enzima niže i srednje vrijednosti (Hensing i sur., 1994). Osim toga, u ovoj vrsti kvasca istraživana je i proizvodnja enzima inulinaze, koji cijepanjem veza između molekula fruktoze uzrokuje hidrolizu inulina. Ekspresija inulinaze inducirana je inulinom ili saharozom, a proizvedeni enzim može biti izlučen u medij ili ostati vezan uz stanični zid (Rouwenhorst i sur., 1988).

Također, kvasac *K. marxianus* potencijalan je domaćin za ekspresiju heterolognih proteina. Pecota i sur. (2007) uspješno su eksprimirali enzim laktat dehidrogenazu u kvascu *K. marxianus* metodom sekvencijalne integracije preciznog broja kopija heterolognog *LDH* gena (iz *B. megaterium*), što je rezultiralo proizvodnjom laktata. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su da bi se sekvencijalna tehnika integracije mogla primijeniti za prekomjernu ekspresiju jednog gena ili uvođenje više različitih gena u metaboličkom inženjerstvu kvasca *K. marxianus*.

Tablica 1. Pregled biotehnoške primjene sojeva kvasca *Kluyveromyces marxianus* u industriji (Fonseca i sur., 2008)

BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA	PROIZVOD / PRIMJENA
proizvodnja etanola iz laktoze	
proizvodnja biomase ili proteina	
proizvodnja endogenih enzima	β -galaktozidaza β -glukozidaza β -ksilozidaza inulinaza
heterologna ekspresija enzima	termostabilne celulaze laktat dehidrogenaze α -galaktozidaze endopoligalakturonaze
prehrambena industrija	prirodni emulgator – manoprotein spojevi arome (esteri, ketoni, alkoholi) pekarski kvasac
primjena u okolišu	obrada papirnog otpada i mulja uklanjanje laktoze/drugih šećera iz otpadne vode obnova teških metala iz otpadne vode

Inokuma i sur. (2015) odredili su kompletnu sekvencu genoma soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777 te utvrdili da se genom sastoji od 8 kromosoma i mitohondrijske DNA ukupne duljine 10 895 581 pb i prosječnog sadržaja GC pb od 40,11 %. Provedeno je istraživanje koje je pokazalo da rekombinantni soj kvasca *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777 zbog svoje termotolerantnosti ima potencijalnu primjenu u degradaciji celuloze na povišenoj temperaturi (45 °C). Naime, u ovom kvascu ekspimirali su gene za termostabilnu endo- β -1,4-glukanazu, celobiohidrolazu i β -glukozidazu, također primjenom sustava integracije te je tako konstruiran soj koji ima sposobnost konverzije celuloznih materijala u etanol (Hong i sur., 2007).

Iako ova istraživanja pokazuju kako su heterologni proteini ekspimirani u *K. marxianus* bili funkcionalni, još uvijek je potrebno istraživanje sposobnosti provođenja posttranslacijskih modifikacija proteina kod *K. marxianus* koje su nužne za njihovu optimalnu biološku aktivnost i stabilnost (Fonseca i sur., 2008). Budući razvoj će sigurno uključivati konstrukciju rekombinantnih sojeva koji proizvode različite enzime.

2.3.2. Gensko ciljanje u nekonvencionalnim kvascima

Uspješnost genskog ciljanja u nekonvencionalnim kvascima, u usporedbi s modelnim kvascima *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, obično je niska što vrlo ograničava istraživanje i primjenu ovih organizama (Chen i sur., 2013). Kako bi se riješio ovaj problem, najčešće su korištene dvije strategije: povećanje efikasnosti homologne rekombinacije, obično povećanjem dužine bočnih homologija transformirajućeg fragmenta DNA ili suzbijanje ilegitalne rekombinacije delecijom gena važnih funkcionalnih proteina, kao što su *KU70* i *KU80*, uključenih u NHEJ. Primjerice, delecijom gena *KU70* u kvascu *Kluyveromyces marxianus* ostvaruje se uspješnost genskog ciljanja od 80 % primjenom homolognih sekvenci najmanje duljine od 40 pb (Abdel-Banat i sur., 2009).

Međutim, mnogi nekonvencionalni kvasci su pretežno haploidi pa delecija funkcionalnih gena često dovodi do inhibicije proliferacije stanica i nastanka kolonija. To se posebno očituje u nepovoljnim (stresnim) uvjetima, kao što je stanična obnova nakon elektroporacije i rast na čvrstom mediju siromašnom nutrijentima (Zeeman i Steensma, 2003). Stoga postoji velika vjerojatnost da je uspješnost genskog ciljanja reducirana uslijed neformiranja kolonija.

Kooistra i sur. (2004) proveli su istraživanje s kvascem *K. lactis* u kojem su ispitivali utjecaj duljine bočne homologije na uspješnost ciljane integracije, odnosno poboljšanje uspješnosti genskog ciljanja. Pokazali su da je povećanje duljine sekvence od 50 pb do 600 pb dovelo do progresivnog povećanja integracije homolognom rekombinacijom s uspješnošću od 0 % do 88 % te da duljina bočnih homologija može biti važan parametar pri genskom ciljanju. Ciljana inaktivacija gena danas je moguća i primjenom tehnologija za precizno uvođenje dvolančanog loma te se u tu svrhu mogu upotrijebiti nukleaze s cinkovim prstima (engl. zinc finger nuclease, ZNF) (Doyon i sur., 2011), nukleaze koje djeluju slično aktivatorima transkripcije (engl. transcription activator-like effector nucleases, TALEN) (Joung i Sander, 2012) ili tehnologija CRISPR/Cas9 (Stovicek i sur., 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

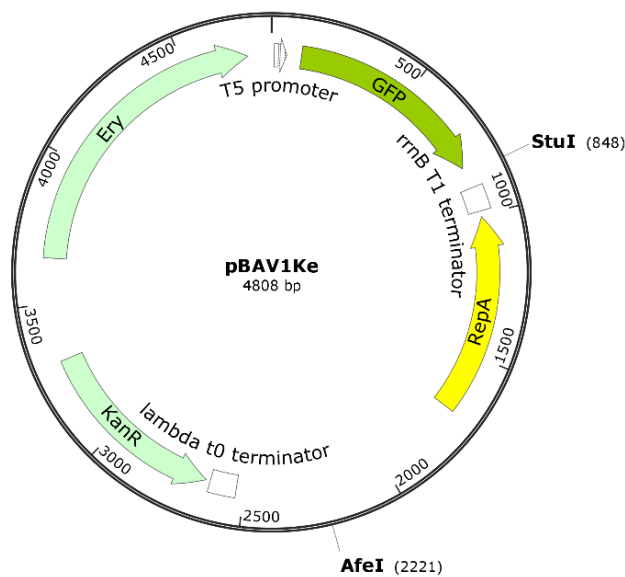
3.1. MATERIJAL

3.1.1. Plazmidi

U radu su korišteni plazmidi koji sadrže bakterijske sekvence *ori* (ishodište replikacije) i *bla* (gen koji kodira za enzim β -laktamazu te je odgovoran za rezistenciju na antibiotik ampicilin) koje omogućavaju replikaciju i održavanje ovih plazmida u bakteriji *Escherichia coli*. Stanice koje sadrže gene *bla* mogu se selekcionirati na podlogama s antibiotikom ampicilinom.

3.1.1.1. Plazmid pBAV1Ke

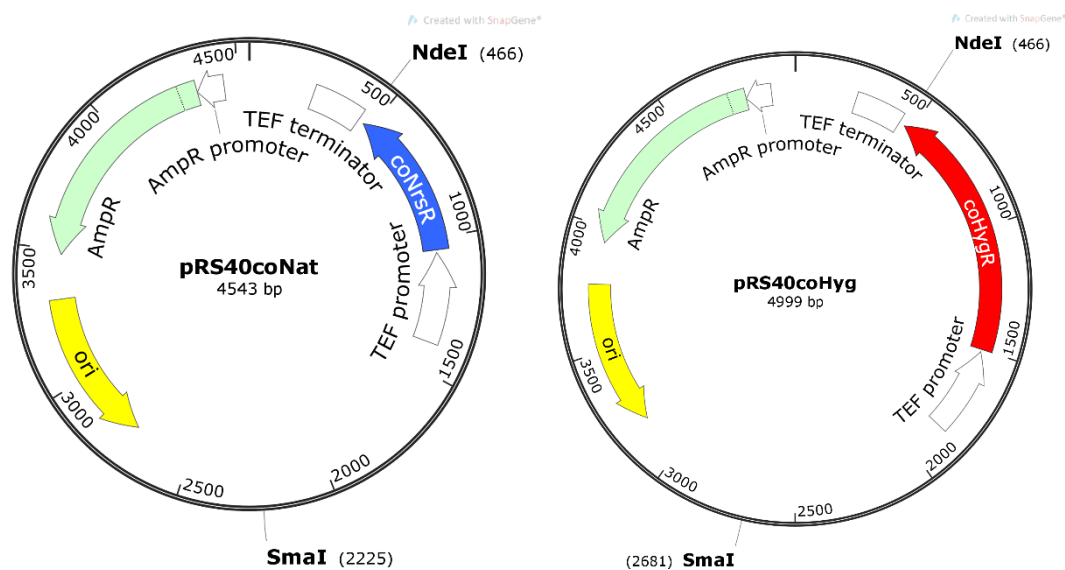
Plazmid pBAV1Ke prikazan na Slici 3 (Svetec Miklenić, usmeno priopćenje) sadrži gen *kanR* koji je odgovoran za rezistenciju na antibiotik kanamicin, gen *ery* koji je omogućuje rezistenciju na antibiotik eritromicin i gen *repA* iz bakterije *Escherichia coli* koji kodira za protein uključen u regulaciju broja kopija plazmida. Ovaj plazmid uzet je iz zbirke Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama PBF-a i korišten je kao polazni plazmidni vektor na početku kloniranja te je njegovom ligacijom s linearnim fragmentom DNA koji je sadržavao gen *coNat* konstruiran plazmid pNatBAV, a ligacijom s linearnim fragmentom DNA koji je sadržavao gen *coHyg* plazmid pHygBAV.



Slika 3. Shematski prikaz plazmida pBAV1Ke. Prikazane su regije i restriksijska mjesta bitna za ovaj rad.

3.1.1.2. Plazmidi pRS40coNat i pRS40coHyg

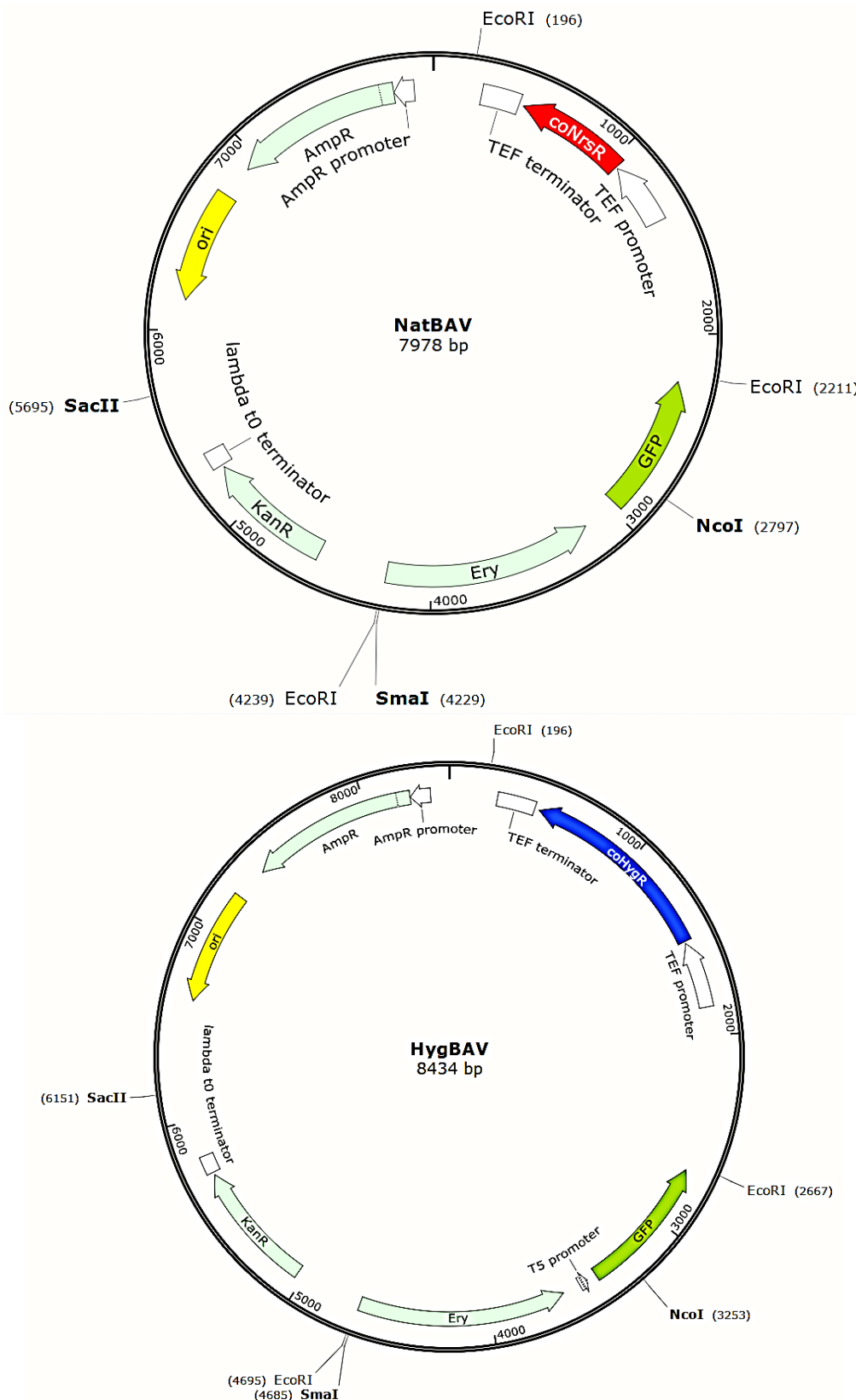
Ovi plazmidi su integrativni (Arambašić, 2017) jer ne sadrže ishodište replikacije iz kvasca te zbog toga transformiraju stanicu ugradnjom u genom. Plazmid pRS40coNat sadrži klonirani gen *coNrsR* koji je odgovoran za otpornost na antibiotik nurserotricin, a plazmid pRS40coHyg nosi klonirani gen *coHygR* koji je odgovoran za otpornost na antibiotik higromicin. Korišteni su za konstrukciju plazmida pNatBAV i pHygBAV.



Slika 4. Shematski prikaz plazmida pRS40coNat i pRS40coHyg. Prikazane su regije i restrikcijska mjesta bitna za ovaj rad.

3.1.1.3. Plazmidi pNatBAV i pHygBAV

Ovi integrativni plazmidi konstruirani su u ovome radu za određivanje uspješnosti genskog ciljanja u kvascu *Kluyveromyces marxianus*. Transformanti koji sadrže plazmid pNatBAV mogu se selekcionirati na podlozi s antibiotikom nurserotricinom, a transformirane stanice kvasca koje sadrže plazmid pHygBAV na podlozi s antibiotikom higromicinom (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz plazmida pNatBAV i pHygBAV. Prikazane su regije i restrikcijska mjesta bitna za ovaj rad.

3.1.2. Mikroorganizmi

U ovom radu korišten je jedan soj bakterije *Escherichia coli* i kvasca *Kluyveromyces marxianus*.

3.1.2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Za umnažanje dvolančanih plazmida korišten je soj bakterije *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).

3.1.2.2. Kvasac *Kluyveromyces marxianus*

U radu je korišten soj NBRC 1777 kvasca *Kluyveromyces marxianus*.

3.1.3. Hranjive podloge i otopine

Sve hranjive 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 dobivaju se iz tekućih dodatkom 15,0 g L⁻¹ agara prije sterilizacije.

3.1.3.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

<u>Kompleksna podloga (LB)</u>	tripton	10,0 g L ⁻¹
	kvašćev ekstrakt	5,0 g L ⁻¹
	natrijev klorid	10,0 g L ⁻¹

Selektivna podloga s ampicilinom: antibiotik ampicilin se dodaje u sterilnu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracije 20 mg mL⁻¹) do konačne koncentracije od 50 μg mL⁻¹ u krutoj i 100 μg mL⁻¹ u tekućoj podlozi.

3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Kluyveromyces marxianus*

<u>Kompleksna (kompletna) podloga (YPD)</u>	pepton	20,0 g L ⁻¹
	kvašćev ekstrakt	10,0 g L ⁻¹
	glukoza	20,0 g L ⁻¹

Selektivna podloga s nurserotricinom: sterilna matična otopina antibiotika nurserotricin dodaje se u sterilnu podlogu YPD do konačne koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Selektivna podloga s higromicinom: sterilna matična otopina antibiotika higromicina dodaje se u sterilnu podlogu YPD do konačne koncentracije $200 \mu\text{g mL}^{-1}$

3.1.3.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

Amonijev acetat (8M)

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

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ampicilin (20 mg mL^{-1})

Sterilizira se filtracijom i čuva pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

EDTA (0,5M; 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 $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ i zasićen je jednakim volumenom TE pufera pH 8,0. Ne sterilizira se i čuva se u tamnoj boci pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kloroform/izoamilni alkohol

Smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 24:1. Otopina se ne sterilizira i čuva pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kalijev acetat (3M; 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Natrijev acetat (3M; pH 4,8)

24,6 g bezvodnog natrij 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 g L⁻¹

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

RNaza (10 mg mL⁻¹)

Ribonukleaza A se otopi u 10 mM Tris-Cl pH 7,5 i 15 mM natrij 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-Cl (1M)

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.

Sorbitol (1M)

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 mol L⁻¹ sorbitol

0,1 mol L⁻¹ natrij citrat

0,06 mol L⁻¹ EDTA

Otopina se ne sterilizira.

STE

SDS 5,0 g L⁻¹

0,1 mol L⁻¹ Tris-Cl pH 8,0

0,05 mol L⁻¹ EDTA pH 8,5

Otopina se ne sterilizira.

Zimoliaza 20-T

15 mg enzima zimolijaze (Zymolyase 20-T) iz bakterije *Arthrobacter luteus* otopi se u 3 mL sterilnog glicerola koncentracije 400 mg mL⁻¹ i čuva pri -20 °C.

3.1.3.4. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica

Litij acetat (1 M)

10,2 g litij acetata dihidrata se otopi u 70 mL deionizirane vode i dopuni do 100 mL.

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri sobnoj temperaturi.

Litij acetat/PEG (smjesa za transformaciju)

PEG₄₀₀₀ (50%) 400 g L⁻¹

1 M litij acetat (pH 7,0 – 7,4)

1 M Tris-HCl (pH 7,5)

0,5 M EDTA (pH 8,0)

H₂O

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

3.1.3.5. Otopine za gel elektroforezu

Agarozni gel

Priprema se otapanjem agaroze u TBE puferu (1,0 x) koji se pripremi razrjeđivanjem TBE pufera (10 x). Koncentracija agaroze u gelu može biti od 7 do 20 g L⁻¹, 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 mmol L ⁻¹ 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⁻¹, 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	108,0 g L ⁻¹
borna kiselina	55,0 g L ⁻¹
0,5 M EDTA pH 8,0	40,0 mL L ⁻¹

3.1.3.6. Otopine za hibridizaciju DNA po Southern-u

Navedene otopine ne moraju biti sterilne.

Amonijev acetat (1 M)

Priprema se razrjeđivanjem 8 mol L⁻¹ amonij acetata.

HCl (0,25 M)

Priprema se razrjeđivanjem koncentrirane kloridne kiseline (22 mL L⁻¹).

DNA-nosač (nespecifična DNA)

DNA sperme haringe otopljena u TE-puferu pH 8,0 u koncentraciji od 20 mg mL⁻¹.

Čuva se pri -20 °C.

Natrijev hidroksid (0,4 M)

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

Natrijev hidroksid/amonijev acetat

0,5 mol L⁻¹ natrijev hidroksid

1 mol L⁻¹ amonijev acetat.

Otopina A

SSC (20 x)	10,0 mL
10 % SDS	1,0 mL
deionizirana voda	89,0 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 µL

Otopina za hibridizaciju

Ima isti sastav kao otopina za predhibridizaciju samo što sadrži i 20-50 ng mL⁻¹ obilježene DNA (DNA-sonde) te 0,1 mg mL⁻¹ nespecifične DNA (DNA nosača).

Pufer 1

0,1 mol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,5

0,15 mol L⁻¹ natrijev klorid

Pufer 2

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

Pufer 3

1 mol L⁻¹ Tris pH 9,7 50,0 mL

5 mol L⁻¹ natrijev klorid 10,0 mL

1 mol L⁻¹ magnezijev klorid 25,0 mL

pH 9,5 se podese dodatkom HCl i dopuni deioniziranom vodom do 500,0 mL.

Otopina za detekciju

Pufer 3 10 mL

x-fosfat 35 μL

NBT 45 μL

SSC (20 x)

3 mol L⁻¹ natrijev klorid

0,3 mol L⁻¹ natrijev citrat

3.1.4. Kemikalije, enzimi i membrane

Tablica 2. Kemikalije korištene u ovom radu.

Kemikalije, enzimi i membrane	Proizvođač
Agaroz	<i>Appligene</i> , Illkirch, Francuska
Apsolutni etanol	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Bromtimol plavo (BTP)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
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 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
Membrane (najlonske, pozitivno nabijene) i komplet kemikalija za hibridizaciju DNA po Southern-u	<i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, IN, SAD
Natrijev acetat	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
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
Zimolijaza (Zymolyaze 20-T)	<i>Seikugaku Kogyo Co.</i> , Tokyo, Japan

3.2. METODE

3.2.1. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA

3.2.1.1. Taloženje DNA amonij acetatom i etanolom

DNA se najčešće taloži pomoću amonij acetata i etanola tako da se volumenu DNA doda 1/3 volumena 8 M amonij 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 11000 okretaja u minuti pri 4 °C.

3.2.1.2. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol

Provodi se tako da se otopini DNA doda jednaki volumen smjese fenol/kloroform/izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1. Nakon toga se snažno promiješa i stavi na centrifugiranje 2 minute na 11000 okretaja po minuti. Gornja faza se pažljivo prenese u novu kivetu te se postupak ponavlja sve dok se ne prestane pojavljivati proteinski talog (između gornje i donje faze) nakon centrifugiranja. Kada je proteinski talog uklonjen, gornja faza se prenosi u novu kivetu i doda se jednaki volumen smjese kloroform/izoamilni alkohol da se ukloni zaostali fenol te se snažno promiješa. Nakon centrifugiranja (2 minute na 11000 okretaja u minuti), gornja faza se prenosi u novu kivetu.

3.2.1.3. Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena

Izolacija dvolančanog plazmida provedena je postupkom alkalne lize, uz manje modifikacije. 400 mL prekonoćne kulture bakterije *Escherichia coli* centrifugirano je 10 minuta na 5000 okretaja u minuti da se stanice dobiju u talogu. Talog u kiveti je resuspendiran u 5 mL TE-pufere i ostavljen 5 minuta na ledu. Sterilnim nastavkom dodan je lizozim i suspenzija je promiješana blagim okretanjem te ostavljena 10 minuta na ledu. Zatim je suspenziji dodano 10 mL otopine natrijev hidroksid/SDS i blago je promiješano te ponovno ostavljeno 10 minuta na ledu. Nakon toga, dodano je 7,5 mL natrijevog acetata (3 M; pH 4,8) te je promiješano i inkubirano 15 minuta pri -20 °C. Nakon inkubacije, centrifugirano je 20 minuta na 6000 okretaja u minuti. Supernatant je prebačen u novu kivetu koja se tarira te slijedi ponovno centrifugiranje pri istim uvjetima (ovaj postupak ponavlja se dva puta). Bistri supernatant je prebačen u novu kivetu, određen mu je volumen, pomiješan s 0,6 V izopropanola i ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi zbog taloženja DNA. Suspenzija je centrifugirana 30 minuta na 10000 okretaja u minuti te je supernatant bačen, a talog osušen vakuum sisaljkom. Kad je talog posušen, otopljen je u 400 mL TE-pufere nakon čega je uslijedila fenolizacija (poglavlje 3.2.1.2.). Plazmidna DNA taložena je amonijevim acetatom i etanolom (poglavlje 3.2.1.1.) i otopljena u 50-100 µL TE-pufere, uz dodatak RNaze. Provjera uspješnosti izolacije plazmida provodi se pomoću gel elektroforeze uzoraka.

3.2.1.4. Izolacija kvaščeve DNA iz stanica uzgojenih u tekućoj podlozi

3 mL kulture kvasca u stacionarnoj fazi centrifugira se 3 minute na 4000 okretaja u minuti te se talog stanica resuspendira u 1 mL deionizirane vode i ponovno centrifugira pri istim uvjetima. Zatim se talog stanica resuspendira u 1 mL SCE, ponavlja se centrifugiranje i na kraju se dobiveni talog otopi u 130 μL SCE (ukupni volumen 200 μL). Nakon dodatka 20 μL zimolijaze 20-T stanice se inkubiraju 1 sat na 37 °C te im se doda 800 μL STE, promiješa se okretanjem i slijedi inkubacija 20 minuta u vodenoj kupelji pri 70 °C. Nakon toga, uzorci se ohlade u ledu 10 minuta te im se doda 200 μL kalijevog acetata (5 M; pH 4,8) da se istalože proteini. Uzorci se ostave na ledu u frižideru 2 sata ili preko noći. Nakon centrifugiranja 30 minuta na 10000 okretaja u minuti, 970 μL supernatanta se prenese u novu kivetu uz dodatak 630 μL izopropanola te se promiješa okretanjem. Nakon centrifugiranja 20 minuta na 10000 okretaja u minuti pri 4 °C, talog DNA se osuši vakuum sisaljkom i otopi u 300 μL TE-pufera pH 8,0. Slijedi inkubacija 20 minuta u vodenoj kupelji pri 70 °C te taloženje amonijevim acetatom (8 M) i etanolom (poglavlje 3.2.1.1.). Uzorci se čuvaju 2 sata pri -20 °C, a talog DNA dobije se centrifugiranjem 20 minuta na 11000 okretaja u minuti pri 4 °C. Talog DNA se zatim otapa u 50 μL TE-pufera i doda mu se 0,5 μL RNaze da bi se razgradila prisutna RNA.

3.2.2. 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).

3.2.3. Transformacija bakterije *Escherichia coli* elektroporacijom

U 40 μL suspenzije prethodno pripremljenih kompetentnih stanica dodan je 1 μL ligacijske smjese (DNA). Nakon homogenizacije i inkubacije stanica na ledu u trajanju od 5 minuta, smjesa se prenese u kivetu za elektroporaciju ohlađenu na ledu koja se zatim umetne u elektroporator. Kroz kivetu se provede visokovoltažni puls od 1,5 kV u trajanju od 5,4 ms nakon kojeg se stanice brzo resuspendiraju u 1 mL medija SOC. Dobivena suspenzija inkubira se na tresilici 1 h pri 37°C. Nakon inkubacije, suspenzija stanica se centrifugira 5 minuta pri

4000 okretaja u minuti te se odlije supernatant, a stanice se nacijepe na krutu LB hranjivu podlogu uz dodatak antibiotika ampicilina kako bi se preko noći dobili transformanti.

3.2.4. Transformacija kvašćevih stanica

Cilj transformacije unos je strane DNA u stanicu. Tijekom tog postupka, DNA mora proći kroz staničnu stijenku te je stoga ključan korak u transformaciji indukcija endocitoze ili uzrokovanje oštećenja stanične stijenke kako bi molekule DNA mogle proći, pri čemu je nužno da stanica preživi. U tu svrhu najčešće se koriste tri različite metode transformacije: protoplastiranje, transformacija pomoću alkalnih kationa (litij acetata) i elektroporacija. U ovom radu stanice kvasca transformirane su elektroporacijom i metodom pomoću litijevog acetata. Elektroporacija se osniva na izlaganju stanica kratkom električnom impulsu visokog napona koji u staničnoj membrani stvara kratkotrajne pore čime se povećava i propusnost stanične stijenke (Rivera i sur., 2014). Metoda pomoću litijevog acetata uključuje tretman stanica s litijevim ionima, polietilenglikolom (PEG), ssDNA-nosačem i povišenom temperaturom (toplinski šok).

3.2.4.1. Transformacija kvašćevih stanica elektroporacijom

Za transformaciju stanica kvasca elektroporacijom korišten je protokol za transformaciju kvasca *B. bruxellensis* (Miklenić i sur., 2015). Prije transformacije kolonija kvasca *Kluyveromyces marxianus* narasla na krutoj podlozi, nacjepljena je u 200 mL kompletne kompleksne tekuće podloge s antibiotikom nurserotricinom koja je zatim stavljena na inkubaciju na tresilici pri 28 °C. Uzgoj je trajao dva dana dok nije postignuta koncentracija stanica do 5×10^7 stanica mL⁻¹. Točan broj stanica odredi se brojanjem u Thoma-ovoj komorici. Zatim se stanice izdvoje iz podloge centrifugiranjem 4 minute pri 4000 okretaja u minuti i resuspendiraju u sterilnoj deioniziranoj vodi (ovaj postupak se ponavlja dva puta). Ponovno slijedi centrifugiranje pri istim uvjetima, nakon čega se stanice resuspendiraju u 20 mL CTS podloge (DDT/LiAc) i onda se inkubiraju 45 minuta pri 28 °C na tresilici pri 80 okretaja u minuti. Nakon inkubacije, slijedi centrifugiranje 4 minute pri 4000 okretaja u minuti i resuspendiranje stanica u hladnoj sterilnoj deioniziranoj vodi te centrifugiranje pri istim uvjetima i resuspendiranje stanica u hladnom sorbitolu (1 M) (dva puta). 50 µL suspenzije stanica prenese se u kivete, doda se do 10 µL otopine DNA i resuspendira te se ostavi 5 minuta na ledu. Kiveta sa smjesom stanica i DNA stavi se u elektroporator i podvrgne puls električne energije. Zatim se stanicama što prije doda 1 mL podloge (YPD/sorbitol), uzorci se promiješaju i inkubiraju 20 minuta pri 28 °C. Nakon toga, uzorcima se doda još 1 mL YPD podloge te se inkubiraju 2 do 3 sata pri 28 °C na tresilici pri 180 okretaja u minuti. Poslije inkubacije, stanice

se centrifugiraju i resuspendiraju u sterilnoj deioniziranoj vodi te se nacijepljuju na selektivne podloge i ostave na inkubaciju pri 28 °C da bi narasli transformanti.

3.2.4.2. Transformacija kvašćevih stanica litij acetatom

Jedna kolonija kvasca se s krute hranjive podloge prenese u 200 mL tekuće podloge i preko noći uz aeraciju inkubira pri 28 °C do koncentracije stanica od 2 do 5 x 10⁷ stanica mL⁻¹. Točan broj stanica odredi se brojanjem u Thoma-ovoj komorici. Zatim se centrifugiranjem 5 minuta pri 4000 okretaja u minuti stanice izdvoje od podloge, resuspendiraju u 30 mL sterilne deionizirane vode te se ponovno isperu s 1 mL sterilne deionizirane vode centrifugiranjem pri istim uvjetima. Isprane stanice se resuspendiraju u 850 µL sterilne deionizirane vode, centrifugiraju 5 minuta pri 3000 okretaja u minuti, nakon čega se resuspendiraju u 900 µL sterilne deionizirane vode te se po 100 µL suspenzije stanica podijeli u kivete. Stanice se ponovno centrifugiraju 5 minuta pri 3000 okretaja u minuti i iz svake kivete se ukloni 80 µL supernatanta.

Talag stanica se pomiješa sa do 10 µL otopine DNA i 350 µL smjese za transformaciju, dobro se resuspendira te se zatim inkubira 40 minuta na 28 °C. Stanice se nakon toga podvrgnu toplinskom šoku pri 42 °C tijekom 40 minuta. Nakon toplinskog šoka uzorci se centrifugiraju 3 minute pri 3000 okretaja u minuti i ukloni se 350 µL supernatanta. Stanice se resuspendiraju u 1000 µL tekuće YPD podloge i inkubiraju minimalno 3 sata. Nakon toga, stanice se centrifugiraju i talog se resuspendira u 300 µL sterilne deionizirane vode i nacijepe na selektivne podloge. Rezultati transformacije vide se nakon 3 do 5 dana inkubacije pri 28 do 30 °C.

3.2.5. Gel elektroforeza

Otopljeni agarozni gel (opisan u poglavlju 3.1.3.5.) ohladi se na oko 60 °C i izlije u nosač gela na koji je postavljen češalj za formiranje jažica. Kada se gel skrutne, češalj se izvadi, a nosač gela postavi se u kadicu za elektroforezu u kojoj je uliven TBE pufer (1x) tako da sloj pufera iznad gela bude debeo oko 1mm. 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 (UV) svjetlu. Gel se fotografira kroz crveni filter.

3.2.6. Metoda hibridizacije DNA po Southern-u

Ova metoda hibridizacije DNA po temelji se na specifičnom sparivanju (hibridizaciji) neradioaktivno obilježene DNA sonde s komplementarnom sekvencom.

Iz stanica kvasca uzgojenih do stacionarne faze rasta, izolira se DNA (poglavlje 3.2.1.4.) te se pocijepa odgovarajućim restriksijskim enzimima (poglavlje 3.2.2.). Nakon toga provodi se gel-elektroforeza (poglavlje 3.2.4.), a nakon završetka gel se ispire u alkalnoj otopini koja uzrokuje depurinaciju DNA (fragmentiranje) te slijedi prijenos DNA s gela na membranu (poglavlje 3.2.5.2.). Prijenos DNA na membranu provodi se oko 90 minuta putem uređaja za prijenos vakuumom uz podtlak od 15 kPa, a s obzirom da je najlonska membrana pozitivno nabijena, fragmenti DNA ostaju fiksirani na membrani na poziciji koja odgovara onoj na gelu. Nakon toga slijedi ispiranje membrane, dodatno fiksiranje DNA na temperaturi od 130 °C kroz 30 minute i inkubacija u predhibridizacijskoj otopini (poglavlje 3.2.5.3.) koja zasićuje membranu i sprječava nespecifično vezanje probe na membranu. Nakon toga, membrana se ispire u hibridizacijskoj otopini koja je istog sastava kao i predhibridizacijska otopina, ali dodatno sadrži sondu sa dioksigeninom obilježenim deoksiuridin-trifosfatom (DIG-dUTP). Nakon hibridizacije, slijedi detekcija (poglavlje 3.2.5.4.) 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.

3.2.6.1. Priprema DNA sonde

DNA sonde korištene u ovom radu pripremljene su metodom nasumičnog započinjanja sinteze DNA (engl. random priming). DNA bakteriofaga λ koristi se kao standard za elektroforezu pa sonda mora biti komplementarna cijelom genomu bakteriofaga λ . Osim toga, u ovome radu je kako proba za hibridizaciju uzoraka korištena digoksigeninom obilježena proba pBR322 koja hibridizira s plazmidnom okosnicom u transformirajućim fragmentima NatBAV i HygBAV.

Otopina za sintezu DNA sonde za hibridizaciju:

DNA faga λ ili pBR322 (100 ng)	(prethodno denaturirana)	13 μ L
Smjesa heksanukleotida		3 μ L
Smjesa deoksiribonukleozid-trifosfata i DIG-dUTP		3 μ L
Klenow enzim		1 μ L.

Otopina za sintezu DNA-sonde za hibridizaciju priprema se tako da se 13 μ L otopine koja sadrži 100 ng DNA-kalupa 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 μ L 0,5 mol L⁻¹ EDTA pH 8,0, a DNA se istaloži dodatkom 2 μ L 5 mol L⁻¹ litij klorida i 75 μ L ledenog apsolutnog etanola i inkubacijom najmanje 2 sata pri -20 °C. Talog dobiven centrifugiranjem otopi se u 200 μ L TE pufera pH 8,0.

3.2.6.2. Prijenos DNA na membranu

Nakon provedene gel-elektroforeze i vizualizacije DNA, agarozni gel se 30 minuta inkubira u kloridnoj kiselini (0,25 M) te se nakon kratkog ispiranja u destiliranoj vodi inkubira 25 do 30 minuta u otopini natrijev hidroksid (0,4 M) /amonijev acetat (1 M). 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 stavljen na membranu i uronjen u 0,4 M natrijev hidroksid. Nakon završenog prijenosa membrana se drži 15 minuta u amonijevom acetatu (1 M) te se 20 minuta inkubira pri 120 °C.

3.2.6.3. Predhibridizacija i hibridizacija

Predhibridizacija (inkubacija membrane) provodi se 2 do 3 sata pri 70 °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 te se hibridizacija 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 otopinom A pri sobnoj temperaturi, a zatim još dva puta po 20 do 30 minuta sa otopinom B pri temperaturi od 70 °C.

3.2.6.4. *Detekcija*

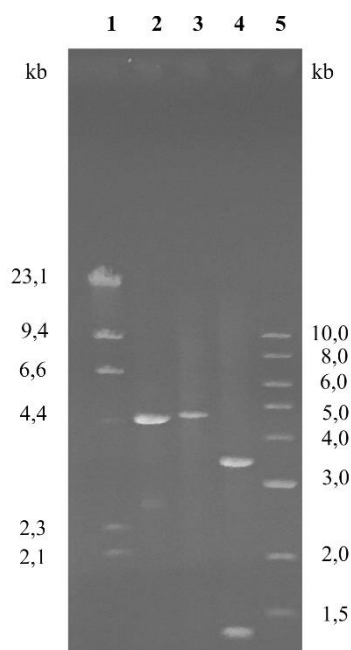
U svrhu detekcije, membrana se kratko ispere u puferu 1, zatim se 1 sat ispire u puferu 2, a onda 30 minuta u puferu 2 u kojem se nalazi 3 μL kompleksa antitijela i alkalne fosfataze. Nakon ispiranja membrane dva puta po 15 minuta u puferu 1, membrana se kratko ispere u puferu 3 te zatali u plastičnu vrećicu sa otopinom za detekciju koja sadrži pufer 3 uz dodatak 35 μL α -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 I RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je odrediti uspješnost genskog ciljanja u nekonvencionalnom kvascu *Kluyveromyces marxianus*. Naime, gensko ciljanje jedan je od postupaka koji se koriste pri konstrukciji genetički modificiranih sojeva, a kvasac *K. marxianus* zbog svojih poželjnih karakteristika, posebice termotolerantnosti, iznimno je interesantan u biotehnološkim procesima. Kako bi se provela konstrukcija ovoga soja, prvo je bilo potrebno konstruirati plazmid pNatBAV kojim je potom transformiran kvasac *K. marxianus*. Selekcijom transformanata koji su u genom integrirali linearni fragment DNA koji sadrži gen *coNat* i nosi rezistenciju na antibiotik nurserotricin i molekularnom analizom metodom po Southern-u potvrđena je konstrukcija soja NatBAV. Soj NatBAV zatim je korišten za određivanje uspješnosti genskog ciljanja transformacijom s linearnim fragmentom HygBAV koji je sadržavao gen *coHyg*, koji nosi rezistenciju na antibiotik higromicin i provedena je selekcija transformanata te je određena uspješnost genskog ciljanja u ovom kvascu.

4.1. KONSTRUKCIJA PLAZMIDA pNatBAV i pHygBAV

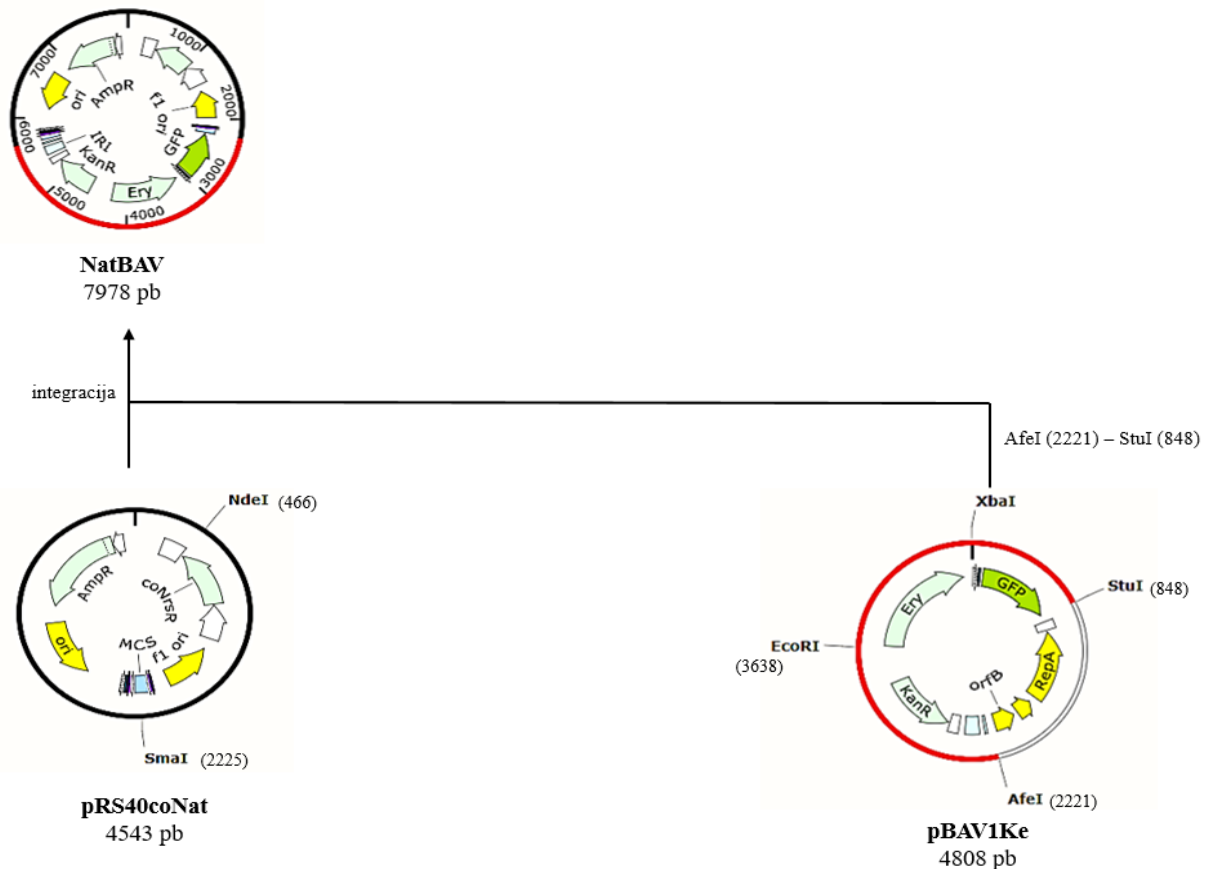
Pri konstrukciji plazmida pNatBAV i pHygBAV korišteni su plazmid pBAV1Ke, koji je služio kao polazni vektor za kloniranje te integrativni plazmidi pRS40coNat (sadrži gen *coNrsR* odgovoran za rezistenciju na antibiotik nurserotricin) i pRS40coHyg (sadrži gen *coHygR* odgovoran za otpornost na antibiotik higromicin) (opisani u poglavlju 3.1.1.2.). Restriksijskom analizom provjerena je struktura početnih plazmida korištenih u kloniranju (Slika 6).



Slika 6. Rezultati restrikcijske analize. 1 – DNA standard, genom bakteriofaga λ pocijepan enzimom HindIII, 2 – plazmid pRS40coNat pocijepan enzimom SmaI, 3 – plazmid pRS40coHyg pocijepan enzimom SmaI, 4 – plazmid pBAV1Ke pocijepan enzimima AfeI i StuI, 5 - DNA standard, 1 kb NEB.

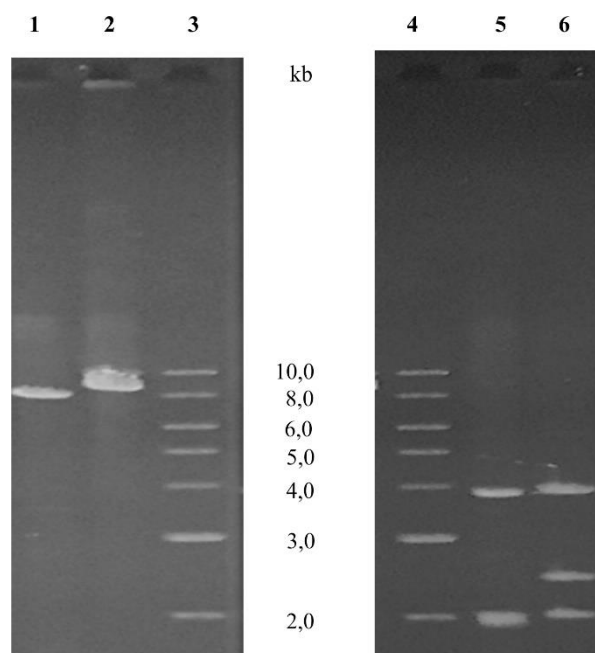
Rezultati provedene restrikcijske analize početnih plazmida korištenih u ovom radu u skladu su s očekivanjima te je na Slici 6 u jažici 2 jasno vidljiva jedna vrpca od 4543 pb koja odgovara plazmidu pRS40coNat pocijepanom endonukleazom SmaI, u jažici 3 uočljiva je jedna vrpca od 4999 pb koja odgovara plazmidu pRS40coHyg pocijepanom endonukleazom SmaI, dok se u jažici 4 vide dvije vrpce od 3435 pb i 1373 pb koje pripadaju plazmidu pBAV1Ke pocijepanom endonukleazama AfeI i StuI.

Plazmid pNatBAV konstruiran je na način da je najprije provedena restrikcija plazmida pBAV1Ke s restrikcijskim endonukleazama AfeI i StuI, pri čemu su dobivena dva fragmenta duljina 1373 pb i 3435 pb te je nakon toga provedena ligacija većeg fragmenta s fragmentom dobivenim linearizacijom plazmida pRS40coNat s restrikcijskim enzimom SmaI (Slika 7). Konstrukcija plazmida pHygBAV provedena je na jednaki način tako da je fragment veličine 3435 bp nastao cijepanjem plazmidnog vektora pBAV1Ke s endonukleazama AfeI i StuI ligiran s fragmentom DNA koji je sadržavao gen *coHyg*, a dobiven je linearizacijom plazmida pRS40coHyg sa SmaI.



Slika 7. Shematski prikaz konstrukcije plazmida pNatBAV (na isti način konstruiran je plazmid pHygBAV). Prikazane su regije i restrikcijska mjesta bitna za ovaj rad. Objašnjenje slike nalazi se u tekstu.

Nakon transformacije kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* soj DH5 α elektroporacijom s ligacijskom smjesom koja je sadržavala vektor i insert te nacjepljivanja stanica na selektivnu LB podlogu s antibiotikom ampicilinom (poglavlje 3.2.3.) preko noći dobiveni su transformanti iz kojih je izolirana plazmida DNA i provedena je restrikcijska analiza. Struktura konstruiranih plazmida pNatBAV i pHygBAV (Slika 5, poglavlje 3.1.1.3.) provjerena je restrikcijskom analizom pri čemu su korištene restrikcijske endonukleaze SmaI i EcoRI (Slika 8).



Slika 8. Rezultati restrikcijske analize za provjeru strukture plazmida pNatBAV ip HygBAV. 1 – plazmid pNatBAV pocijepan enzimom SmaI; 2 – plazmid pHygBAV pocijepan enzimom SmaI; 3, 4 – DNA standard 1 kb NEB; 5 – plazmid pNatBAV pocijepan enzimom EcoRI, 6 – plazmid pHygBAV pocijepan enzimom EcoRI. Obilježena je veličina vrpce u kb

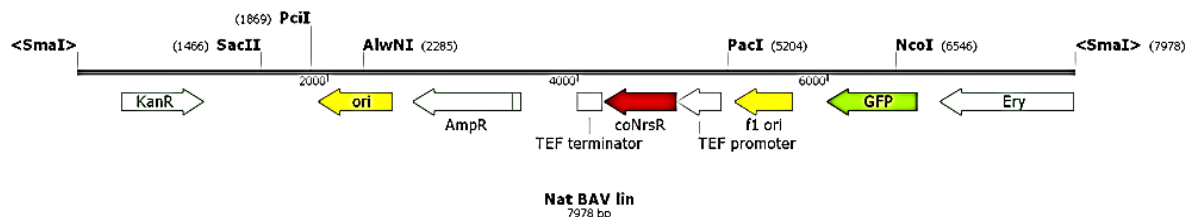
Nakon restrikcije s endonukleazom SmaI, u jažici 1 vidljiva je vrpca veličine 7978 pb koja odgovara lineariziranom plazmidu pNatBAV, a u jažici 2 vrpca veličine 8434 pb koja odgovara lineariziranom plazmidu pHygBAV. U jažici 5 su dvije vrpce koje odgovaraju plazmidu pNatBAV pocijepanom s endonukleazom EcoRI. Jedna vrpca sadrži fragment od 3935 pb, a u drugoj vrpce nalaze se dva fragmenta od 2015 pb i 2028 pb, koja se vide kao samo jedna vrpca zbog vrlo slične veličine. U jažici 6 vidljive su tri vrpce veličina 3935, 2471 i 2028 pb nastale cijepanjem plazmida pHygBAV s EcoRI. Kako fragmenti dobiveni restrikcijskom analizom odgovaraju očekivanima može se potvrditi konstrukcija plazmida pNatBAV i pHygBAV.

4.2. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI GENSKOG CILJANJA U *K. marxianus*

Kao bi se odredila uspješnost genskog ciljanja, najprije je konstruiran soj *K. marxianus* NatBAV, transformacijom stanica s linearnim fragmentom NatBAV kako bi se dobio soj koji sadrži ciljani lokus (Slika 9). Nakon selekcije transformanata koji su u genom integrirali fragment s genom *coNat*, u sljedećem koraku provedena je transformacija s linearnim fragmentom HygBAV te je nakon selekcije i analize transformanata na temelju fenotipa određena uspješnost zamjene gena, odnosno genskog ciljanja.

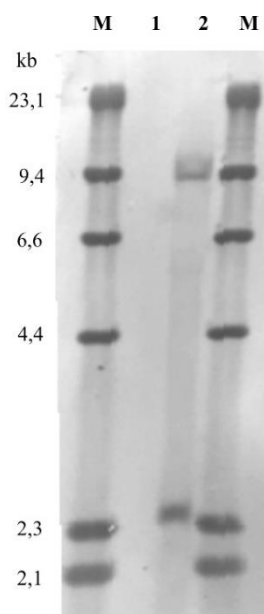
4.2.1. Konstrukcija soja *K. marxianus* NatBAV koji sadrži ciljni lokus

Za konstrukciju sustava za određivanje uspješnosti genskog ciljanja korišten je fragment NatBAV, koji je dobiven linearizacijom plazmida pNatBAV restriksijskom endonukleazom SmaI, te pročišćen izolacijom iz gela. Ovaj fragment (7978 pb) u središnjem dijelu sadržava gen koji kodira za rezistenciju na antibiotik nurserotricin, a s obje strane ima duge heterologne regije kako bi se spriječila degradacija selektivnog biljega egzozonukleazama.



Slika 9. Prikaz transformirajućeg fragmenta NatBAV za konstrukciju sustava za određivanje uspješnosti genskog ciljanja

Kvasac *K. marxianus* transformiran je elektroporacijom s linearnim fragmentom NatBAV, (Slika 9, poglavlje 3.2.4.1.). Selekcija transformanata provedena je na podlozi s antibiotikom nurserotricinom, a na hranjivoj podlozi narasla je jedna kolonija fenotipa Nat^R (rezistentna na antibiotik nurserotricin). Nakon toga, provedena je molekularna analiza kako bi se potvrdila nasumična integracija transformirajuće DNA, jer u genomu ne postoji homologna regija. Dodatno, hibridizacija po Southern-u korištena je i kako bi se potvrdila i integracija jedne molekule transformirajućeg fragmenta u genom (Slika 10).



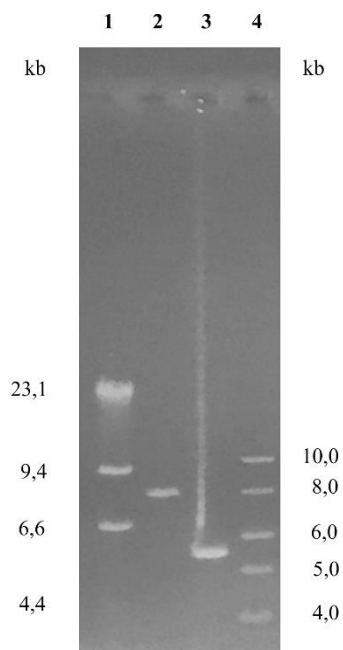
Slika 10. Rezultati molekularne analize transformanta *K. marxianus* NatBAV hibridizacijom po Southern-u. M - DNA standard, genom bakteriofaga λ pocijepan enzimom HindIII, 1 - DNA netransformiranog ishodnog soja *K. marxianus*, 2 - DNA transformanta *K. marxianus*. Genomska DNA

pocijepana je s endonukleazom AlwNI, a uzorci su hibridizirani digoksinom obilježenim plazmidom pBR322.

U jažici 1, u kojoj je genomska DNA početnog (netransformiranog) soja, nije došlo do hibridizacije dok se u jažici 2 mogu vidjeti vrpce nastale hibridizacijom. Kako restriksijski enzim AlwNI cijepa jednom u transformirajućem fragmentu NatBAV, u slučaju integracije jednog fragmenta u genom očekuju se dvije vrpce što je i dobiveno, čime je potvrđena konstrukcija soja *K. marxianus* NatBAV.

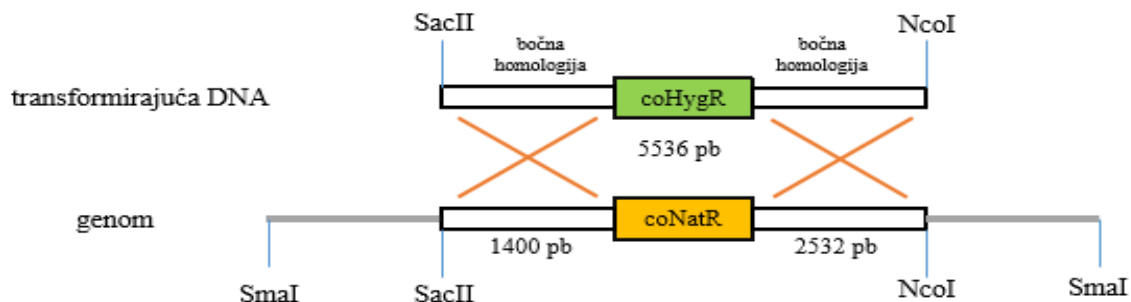
4.2.2. Određivanje uspješnosti genskog ciljanja

Nakon potvrde konstrukcije sustava, u drugom koraku kvasac *K. marxianus* soj NatBAV, koji u genomu sadrži integrirani fragment NatBAV, transformiran je s fragmentom HygBAV nastalim cijepanjem plazmida pHygBAV endonukleazama SacII i NcoI. Naime, cijepanjem plazmida pHygBAV endonukleazama SacII i NcoI nastaju dva fragmenta, transformirajući fragment HygBAV duljine 5536 pb i fragment duljine 2898 pb. Fragment HygBAV sadrži selektivni biljeg *coHyg* i duge bočne homologije (1400 pb uzvodno i 2532 pb nizvodno) koje omogućuju gensko ciljanje homolognom rekombinacijom (Slika 11).



Slika 11. Fragment HygBAV korišten za transformaciju. 1 – DNA standard, genom bakteriofaga λ pocijepan enzimom *HindIII*, 2 – plazmid pHygBav lineariziran sa *SmaI*, 3 – transformirajući fragment HygBAV veličine 5536 bp nastao cijepanjem s *NcoI* i *SacII* i izoliran iz gela, 4 – 1 kb NEB standard.

Kvasac *K. marxianus* soj NatBAV transformiran je fragmentom HygBAV, izoliranim iz gela, pomoću litijeveg acetata (poglavlje 3.2.4.2.) i nacjepljen na selektivnu YPD podlogu koja sadrži antibiotik higromicin kako bi se omogućio rast transformanata koji su u genom integrirali fragment koji sadrži gen *coHyg*. Pri genskom ciljanju očekuje se zamjena genomskog alela koji sadrži gen *coNat* s transformirajućim fragmentom koji sadrži gen *coHyg* (Slika 12).



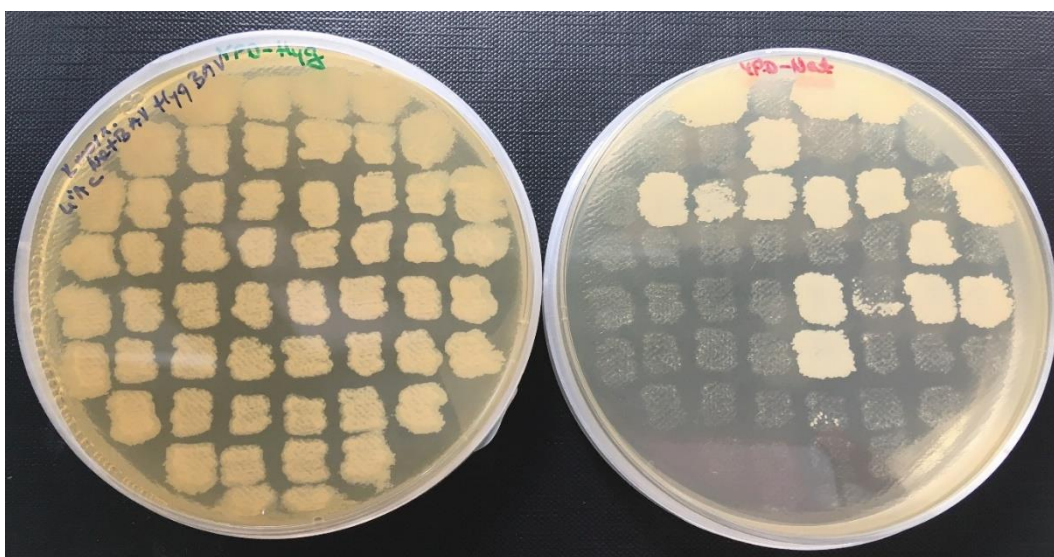
Slika 12. Shematski prikaz sustava za određivanje uspješnosti genskog ciljanja u kvascu *K. marxianus*. Prikazani su transformirajuća DNA i ciljna regija u genomu i naznačene su bočne homologije (i njihove duljine) koje rekombiniraju pri čemu dolazi do zamjene gena (markera).

Na podlozi YPD s higromicinom narasao je ukupno 71 transformant fenotipa Hyg^R te je provedena njihova analiza da bi se odredila uspješnost genskog ciljanja. Transformanti narasli na podlozi YPD s antibiotikom higromicinom precijepljeni su na novu podlogu YPD s higromicinom i replicirani na podlogu YPD koja je sadržavala antibiotik nurserotricin te je na temelju fenotipa utvrđena uspješnost zamjene gena (Slika 13, Tablica 3). Kod transformanata koji imaju fenotip Hyg^RNat^S došlo je do genskog ciljanja i zamjene gena *coNat* genom *coHyg*, dok je kod transformanata s fenotipom Hyg^RNat^R došlo do nastanka aberantnog transformacijskog događaja.

Tablica 3. Uspješnost genskog ciljanja u kvascu *K. marxianus*

Fenotip transformanata	Broj transformanata	Uspješnost genskog ciljanja (%)
Hyg ^R Nat ^S	50	70,42
Hyg ^R Nat ^R	21	29,58
Ukupno analizirano (Hyg ^R)	71	100,00

Od 71 transformanata, kod njih 50 došlo je do genskog ciljanja i zamjene gena *coNat* genom *coHyg*, te je uspješnost genskog ciljanja u kvascu 70, 42 %.



Slika 13. Određivanje fenotipa transformanata. Transformanti nastali transformacijom s linearnim fragmentom HygBAV precjepljeni na podlogu s higromicinom (lijeva podloga) i replicirani na podlogu s nurserotricinom (desna podloga).

Transformacija različitih, nekonvencionalnih kvasaca s fragmentima za rekombinaciju „krajevi-van“ najčešće je rezultirala niskim uspješnostima genskog ciljanja, iako rezultati variraju ovisno o vrsti kvasca i metodi korištenoj za transformaciju. Iznimka je kvasac *Candida dubliniensis*, u kojem je nakon transformacije elektroporacijom u više od 90 % transformanata detektirana integracija vektora u genom homolognom rekombinacijom (Staib i sur., 2001). Slično kvascu *S. cerevisiae*, u kvascima *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* i *C. albicans* detektiran je visoki postotak homologne integracije ukoliko su korištene duge bočne homologije pri rekombinaciji „krajevi-van“ (900 i 800 pb kod *C. dubliniensis*, 1200 i 2700 pb kod *C. tropicalis*, 1400 i 2100 pb kod *C. albicans*).

Transformacijom kvasca *C. albicans* metodom pomoću litijeveg acetata dobivena je uspješnost genskog ciljanja od 75 % (Monteoliva i sur., 1996), a metodom protoplastiranja 84 % (Kelly i sur., 1987.). Za razliku od kvasaca iz vrste *Candida*, podaci dobiveni analizom genskog ciljanja u vrstama *Kluyveromyces lactis* i *Hansenula polymorpha* potvrdili su visoku razinu nasumične integracije, čak i u slučaju kada su vektori sadržavali relativno duge regije homologne ciljnoj sekvenci u genomu. U slučaju kvasca *Kluyveromyces lactis*, zabilježeno je oko 1 % genskog ciljanja pri rekombinaciji „krajevi-van“ čak i kada su pri transformaciji elektroporacijom ili pomoću litijeveg acetata korištene relativno duge bočne homologije. Razlozi za tako nisku uspješnost mogli bi biti snažna supresija homologne rekombinacije,

preferirana ilegitimna rekombinacija ili visoka aktivnost nukleaza u stanici (Klinner i Schäffer, 2004).

Lu i sur. (2000) elektroporirali su kvasac *H. polymorpha* fragmentom koji je sadržavao gen *ScLEU2* kao selektivni marker te bočne homologije duljine 900 i 400 pb, i utvrdili oko 25 % genskog ciljanja. Vrlo niska uspješnost genskog ciljanja (0,2 %) dobivena je transformacijom kvasca *Pichia stipitis* metodom pomoću litijevog acetata. U ovom slučaju pokazano je da duge bočne homologije (2700 i 1700 pb) nisu dovoljne za uspješnu rekombinaciju „krajevi –van“ (Shi i sur., 2002). Uspješnost genskog ciljanja u nekonvencionalnim kvascima u pravilu je relativno niska te svaka vrsta kvasca zahtjeva odabir odgovarajuće metode transformacije i duge bočne homologije na fragmentu za transformaciju. Zbog toga, usporedbom rezultata opisanih u ovom radu s rezultatima genskog ciljanja u ostalim nekonvencionalnim kvascima, može se uočiti da je homologna integracija u kvascu *K. marxianus* relativno uspješna.

U ovom radu, u preostalom 21 transformantu, koji imaju fenotip Hyg^RNat^R došlo je do nekog od aberantnih transformacijskih događaja. Naime, transformacija linearnom DNA može biti popraćena različitim neželjenim događajima kao što su ilegitimna integracija, integracija transformirajućeg fragmenta pored ciljne sekvence ili čak duplikacija ciljnog kromosoma. Do ilegitimne integracije može doći zbog ilegitimne rekombinacije kojom se transformirajuća DNA nasumično ugrađuje u bilo koje mjesto u genomu, bez obzira na postojanje homologije. Duplikacija ciljnog kromosoma može se dogoditi ekstenzivnom sintezom s 3'–jednolančanih krajeva transformirajućeg fragmenta DNA do krajeva ciljnog kromosoma mehanizmom replikacije DNA potaknute dvolančanim lomom (*engl.* break-induced replication, BIR) (Malkova i sur., 1996). Takvi aberantni transformanti sadrže alel koji se očekuje nakon uspješnog genskog ciljanja i netransformirani alel (Svetec i sur., 2007). Štafa i sur. (2014) su hibridizacijom po Southern-u utvrdili da je pri transformaciji kvasca *S. cerevisiae* vektorom za rekombinaciju „krajevi-van“ duplikacija ciljnog kromosoma dominantni aberantni transformacijski događaj.

Cilj ovog rada bio je odrediti uspješnost genskog ciljanja u kvascu *K. marxianus* i analiza dobivenih transformanata provedena je na temelju fenotipa (rezistencija na antibiotik). Aberantni transformacijski događaji nisu dalje analizirani hibridizacijom po Southern-u, no ova analiza bit će provedena u nastavku istraživanja kako bi se utvrdilo koji su tipovi neželjenih transformacijskih događaja prisutni u transformantima s aberantnim fenotipom.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. U ovom radu osmišljen je i primijenjen jednostavan sustav za precizno određivanje uspješnosti zamjene gena u divljim sojevima kvasaca jer omogućava brzu analizu velikog broja transformanata.
2. Uspješnost ciljane zamjene gena mehanizmom rekombinacije krajevi-van u kvascu *Kluyveromyces marxianus* iznosi 70 % ako su bočne homologije dugačke približno 1,4 i 2,5 kb.

6. LITERATURA

Abdel-Banat, B. M. A., Nonklang, S., Hoshida, H., Akada, R. (2009) Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*. **27**, 29-39.

Arambašić, K. (2017) Construction of shuttle vectors for the genetic manipulation of diverse biotechnologically relevant budding yeasts. Diplomski rad, Sveučilište u Orleanu i Sveučilište u Zagrebu.

Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., Cullin, C. (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3329–3330.

Doyon, Y., Vo, T. D., Mendel, M. C., Greenberg, S. G., Wang, J., Xia, D. F., Miller, J. C., Urnov, F. D., Gregory, P. D., Holmes, M. C. (2011) Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat. Methods*. **8**, 74-79.

Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A. K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 339–354.

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 i 563-567.

Groeneveld, P., Stouthamer, A.H., Westerhoff, H.V. (2008) Super life – how and why ‘cell selection’ leads to the fastest-growing eukaryote. *FEBS J.* **276**, 254–270.

Hensing, M., Vrouwenvelder, H., Hellinga, C., Baartmans, R., van Dijken, H. (1994) Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 516–521.

Heslot, H., Gaillardin, C. (1992) Molecular biology and genetic engineering of yeasts, CRC Press, Boca raton, Florida.

Hinnen, A., Hicks, J. B., Fink, G. R. (1978) Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **75**, 1929–1933.

Hoffman, C. S., Wood, V., Fantes, P. A. (2015) An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics*. **201**, 403-423.

Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H., Tamaki, H. (2007) Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J. Biotechnol.* **130**, 114–123.

Horowitz, A. A., Walter, J. M., Schubert, M. G., Kung, S. H., Hawkins, K., Platt, D. M., Hernday, A. D., Mahatdejkul-Meadows, T., Szeto, W., Chandran, S. S., Newman, J. D. (2015) Efficient Multiplexed Integration of Synergistic Alleles and Metabolic Pathways in Yeasts via CRISPR-Cas. *Cell Syst.* **1**, 88-96.

Inokuma, K., Ishii, J., Hara, K. Y., Mochizuki, M., Hasunuma, T., Kondo, A. (2015) Complete Genome Sequence of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777, a Nonconventional Thermotolerant Yeast. *Genome Announc.* **3**.

Joung, J. K., Sander, J. D. (2012) TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 49–55.

Kaye, J. A., Melo, J. A., Cheung, S. K., Vaze, M. B., Haber, J. E., Toczyski, D. P. (2004) DNA Breaks Promote Genomic Instability by Impeding Proper Chromosome Segregation. *Curr. Biol.* **14**, 2096–2106.

Kelly, R., Miller, S.M., Kurtz, M.B., Kirsch, D.R. (1987) Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step gene disruption to isolate *ura3* mutants. *Mol. Cell Biol.* **7**, 199-208.

Klinner, U., Schäfer, B. (2004) Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 201-223.

Kooistra, R., Hooykaas, P. J. J., Steensma, H. Y. (2004) Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. **21**, 781–792.

Lachance, M. A. (1998) *Kluyveromyces van der Walt* emend. van der Walt. U: *The yeasts. A taxonomic study*, 4.izd. (Kurtzman, C.P., Fell, J.W., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 227-247.

Lane, M. M., Morrissey, J. P. (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol. Rev.* **24**, 17-26.

Lodder, J., Kreger-van Rij, N.J.W (1952) *The yeasts: a taxonomic study*. NHPC, Amsterdam

Llorente, B., Malpertuy, A., Blandin, G., Artiguenave, F., Wincker, P., Dujon, B. (2000) Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *FEBS Lett.* **487**, 71–75.

Lu, S.F., Tolstorukov, I.I., Anamart, S., Kaneko, Y., Harashima, S. (2000) Cloning, sequencing and functional analysis of *HpOLE1* gene encoding Delta 9-fatty acid desaturase in *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 499-509.

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. USA.* **93**, 7131-7136.

Merico, A., Sulo, P., Piškur, J., Compagno, C. (2007) Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J.* **274**, 976–989.

Monteoliva, L., Sanchez, M., Pla, J., Gil, C., Nombela, C. (1996) Cloning of *Candida albicans* *SEC14* gene homologue coding for a putative essential function. *Yeast.* **12**, 1097-1105.

Moynahan, M. E., Jasin, M. (2010) Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 196-207.

Nevoigt, E. (2008) Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 379–412.

Pâques, F., Haber, J. E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 349-404.

Pecota, D. C., Rajgarhia, V., Da Silva, N. A. (2007) Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *J. Biotechnol.* **127**, 408–416.

Rivera, A. L., Magaña-Ortíz, D., Gómez-Lim, M., Fernández, F. i Loske, A. M. (2014) Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Phys. Life Rev.* **11**, 184-203.

Rothstein, R. J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Method. Enzymol.* **101**, 202-211.

Rouwenhorst, R. J., Visser, L. E, van der Baan, A. A., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. (1988) Production, Distribution, and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1131-1137.

Rubio-Teixeira, M. (2005) A comparative analysis of the *GAL* genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* **5**, 1115–1128.

San Filippo, J., Sung, P., Klein, H. (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229-257.

Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Method. Enzymol.* **350**, 3–41.

Shi, N.Q., Cruz, J., Sherman, F., Jeffries, T.W. (2002) SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*. *Yeast.* **19**, 1203-1220.

Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer, A.L., Laluce C. (2002) Non-conventional yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 147–156.

Staib, P., Moran, G.P., Sullivan, D.J., Coleman, D.C., Morschhäuser, J. (2001) Isogenic strain construction and gene targeting in *Candida dubliniensis*. *J. Bacteriol.* **183**, 2859-2865.

Stovicek, V., Borodina, I., Forster, J. (2015) CRISPR–Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng. Commun.* **2**, 13–22.

Suwannarangsee, S., Oh, D.B., Seo, J.W., Kim, C. H., Rhee, S. K., Kang, H. A., Chulalaksananukul, W., Kwon, O. (2010) Characterization of alcohol dehydrogenase 1 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 497–507.

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.

Symington, L. S. (2002) Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 630-670.

Symington, L. S., Gautier, J. (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 247-271.

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.

Vogl, T., Hartner, F. S., Glieder, A. (2013) New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**, 1094-1101.

Wagner, J. M., Alper, H. S. (2015) Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genet. Biol.* **89**, 126–136.

Zeeman, A. M., Steensma, H. Y. (2003) The acetyl co-enzyme A synthetase genes of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. **20**, 13–23.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Karla Jhuau

Ime i prezime studenta