

Analiza transformanata kvasca *Scheffersomyces stipitis* metodom hibridizacije DNA po Southernu

Merdžo, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:483065>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski studij Biotehnologija**

Martina Merdžo
0058217269

**Analiza transformanata kvasca *Scheffersomyces stipitis*
metodom hibridizacije DNA po Southernu**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

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

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Analiza transformanata kvasca *Scheffersomyces stipitis* metodom hibridizacije DNA po Southernu
Martina Merdžo, 0058217269

Sažetak: Cilj ovog rada bio je analiza nekonvencionalnog kvasca *Scheffersomyces stipitis*, prethodno transformiranog s dvije različite linearne molekule DNA, kako bi se dokazala ilegitimna integracija ovih molekula u genom kvasca. Svaki transformirajući fragment nositelj je po jednog od dva gena potrebna za pretvorbu piruvata u vrijedni 2,3-butandiol te gena za rezistenciju na antibiotik, koji je korišten kao genetički biljeg za selekciju transformanata. Molekularna analiza provedena je metodom hibridizacije DNA po Southernu. Probe obilježene digoksigeninom za detekciju integriranih fragmenata sintetizirane su metodom PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*, lančana reakcija polimerazom). Probe su konstruirane tako da budu komplementarne samo kodirajućoj DNA (ORF, eng. *Open Reading Frame*, otvoreni okvir čitanja) gena za odgovarajuću antibiotičku rezistenciju na transformirajućim fragmentima. Analiza je pokazala da je u svim transformantima uspješno provedena integracija obje transformirajuće molekule DNA na nasumičnim mjestima u genomu kvasca.

Ključne riječi: *Scheffersomyces stipitis*, metoda hibridizacije DNA po Southernu, ilegitimna integracija, nekonvencionalni kvasac, probe obilježene digoksigeninom

Rad sadrži: 33 stranice, 10 slika, 3 tablice, 29 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Datum obrane: 14. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Analysis of the *Scheffersomyces stipitis* transformants by Southern blot hybridization

Martina Merdžo, 0058217269

Abstract: The aim of this work was to analyse the non-conventional yeast *Scheffersomyces stipitis*, previously transformed with two different linear DNA molecules, to prove the illegitimate integration of these molecules into the yeast's genome. Each transforming DNA fragment contains one of two genes required for the conversion of pyruvate to a valuable 2,3-butanediol and an antibiotic resistance gene as a genetic marker for the selection of transformants. The molecular analysis was conducted by Southern blot hybridization. Digoxigenin labelled probes for detection of integrated fragments were synthesized by polymerase chain reaction (PCR). The probes were designed to be complementary only to coding DNA (Open Reading Frame, ORF) of antibiotic resistance genes on the transforming fragments. The analysis showed that the integration of two transforming DNA molecules at a random place in this yeast's genome was successful in all of the analysed transformants.

Keywords: *Scheffersomyces stipitis*, Southern blot hybridization, illegitimate integration, non-conventional yeast, digoxigenin labelled probes

Thesis contains: 33 pages, 10 figures, 3 tables, 29 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ivan-Krešimir Svetec, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Marina Svetec Miklenić, PhD, Associate Professor

Thesis defended: July 14, 2023

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Nekonvencionalni kvasci	2
2.2. <i>Scheffersomyces stipitis</i>	3
2.3. Genetičko inženjerstvo nekonvencionalnih kvasaca	4
2.3.1. Genetička rekombinacija	4
2.3.2. Regulacija ekspresije gena	5
2.3.3. Sustav <i>Cre-loxP</i>	6
2.3.4. Sustav CRISPR/Cas	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Mikroorganizmi	8
3.1.2. Plazmidi	9
3.1.3. Oligonukleotidi	10
3.1.4. Hranjive podloge.....	11
3.1.5. Otopine.....	11
3.1.6. Kemikalije i enzimi.....	16
3.2. Metode	17
3.2.1. Uzgoj kvasca <i>Scheffersomyces stipitis</i> u tekućoj hranjivoj podlozi.....	17
3.2.2. Izolacija genomske DNA iz kvasca	17
3.2.3. Taloženje DNA	17
3.2.4. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima	18
3.2.5. Gel-elektroforeza	18
3.2.6. Uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i> u tekućoj hranjivoj podlozi	18
3.2.7. Izolacija plazmidne DNA	18
3.2.8. Sinteza i obilježavanje probe za hibridizaciju DNA metodom po Southernu	19
3.2.9. Metoda hibridizacije DNA po Southernu	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Izolacija i cijepanje genomske DNA	22
4.2. Sinteza proba obilježenih DIG-om	24
4.3. Molekularna analiza transformanata kvasca <i>S. stipitis</i> hibridizacijom DNA metodom po Southernu	27
5. ZAKLJUČAK	30
6. POPIS LITERATURE	31

1. UVOD

Kvasci igraju značajnu ulogu u industrijskim procesima proizvodnje širokog spektra različitih proizvoda. Konvencionalnim kvascima smatraju se *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, koji se već ustaljeno koriste u raznim biotehnološkim postupcima te su razvijene efikasne metode za njihove genetičke manipulacije. Ipak, neki njihovi fiziološki nedostaci mogli bi se nadomjestiti selekcijom i primjenom alternativnih vrsta, odnosno nekonvencionalnih kvasaca.

Nekonvencionalni kvasci posjeduju čitav niz pogodnih fenotipskih karakteristika koje ih čine potencijalnim kandidatima za široku primjenu u industrijskoj proizvodnji visokovrijednih kemikalija. Neki od njih već se primjenjuju kao radni mikroorganizmi u proizvodnji terapijskih proteina, cjepiva, lipida te bioobnovljivih kemikalija. Prednosti u odnosu na najčešće korištene vrste, konvencionalne kvasce, su termotolerantnost, osmotolerantnost, halotolerantnost, sposobnost rasta na alternativnim izvorima ugljika, otpornost na inhibitore rasta, visoka razina sekrecije metabolita i brojne druge. Ipak, za razliku od konvencionalnih kvasaca, poznato je puno manje informacija o njihovoj genetici i metabolizmu. Osim toga, provođenje željenih genetičkih modifikacija znatno je otežano jer još uvijek nisu istraženi i razvijeni svi protokoli koji bi se mogli koristiti za genetičke transformacije ove vrste kvasaca. Precizno modificiranje genoma, u svrhu uvođenja novih i unapređivanja već postojećih karakteristika metodama genetičkog inženjerstva, omogućilo bi iskorištavanje potpunog potencijala nekonvencionalnih kvasaca u biotehnološkoj proizvodnji.

U ovom radu korišten je kvasac *Scheffersomyces stipitis*, prethodno transformiran s dva različita linearna fragmenta DNA. Jedan linearni fragment nositelj je gena *alsS*, a drugi gena *alsD*, koji kodiraju za enzime uključene u biosintetski put proizvodnje vrijednog 2,3-butandiola iz piruvata. Budući da krajevi linearnih transformirajućih fragmenata nisu bili homologni genomu *S. stipitis*, očekivano je da će se nakon transformacije ugraditi na nasumičnim mjestima u genomu ilegitimnom (nehomolognom) rekombinacijom. Cilj analize bio je dokazati ilegitimnu integraciju oba linearna fragmenta u genom kvasca.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Nekonvencionalni kvasci

Nekonvencionalni kvasci sve su više predmetom brojnih istraživanja u svrhu iskorištavanja njihova potencijala za industrijsku primjenu. Neki od najzanimljivijih su *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris* i *Hansenula polymorpha* (Löbs i sur., 2017). Posjeduju čitav niz poželjnih prirodnih karakteristika koje im daju prednost u odnosu na tradicionalno korištene domaćeine u biotehnološkoj proizvodnji, poput kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*.

Nekonvencionalni kvasci razvili su specifične mehanizme za podnošenje nepovoljnih okolišnih uvjeta, kao što su visok osmotski tlak, visoka temperatura, visoka koncentracija soli i etanola te prisutnost nekih toksičnih kemikalija (Thorwall i sur., 2020). Također, tolerantni su na razne nusproizvode i inhibitore koji nastaju tijekom bioprocesa (Navarrete i L. Martínez, 2020). Sposobni su asimilirati širok raspon izvora ugljika. Mogu metabolizirati ksilozu, što ih čini pogodnima za rast na lignoceluloznoj biomasi kao jeftinom izvoru ugljika, čijom razgradnjom nastaju pentoze (Petraović Tominac i sur., 2017). Za razliku od toga, *S. cerevisiae* ne može fermentirati ksilozu, a osim toga osjetljiv je na furfural i druge spojeve koji nastaju njezinom razgradnjom (Iwaki i sur., 2013). Iako je *S. cerevisiae* odličan producent etanola iz odgovarajućih izvora ugljika, njegova primjena u proizvodnji drugih industrijski važnih spojeva često zahtjeva opsežne modifikacije metodama genetičkog inženjerstva. Takvi složeni postupci mogu se izbjeći selekcijom odgovarajućih vrsta nekonvencionalnih kvasaca koji već posjeduju prirodni kapacitet za efikasnu proizvodnju raznih proteina, lipida i ostalih komercijalno važnih kemikalija. Pogodan prirodni fenotip potrebno je dodatno unaprijediti metaboličkim inženjerstvom za postizanje što boljih proizvodnih karakteristika (Löbs i sur., 2017). Nekonvencionalni kvasci su Crabtree-negativni, fermentacijski put nije preferiran u odnosu na respiraciju, tako da je sinteza nealkoholnih produkata znatno olakšana (Patra i sur., 2021).

Ipak, modificiranje nekonvencionalnih kvasaca i dalje predstavlja izazov zbog još uvijek nepotpunog poznavanja njihove genetike, metabolizma i stanične fiziologije te ograničenih sredstava i metoda za genetičke transformacije (Wagner i Alper, 2016).

2.2. *Scheffersomyces stipitis*

Scheffersomyces stipitis nekonvencionalni je kvasac, homotaličan, koji se većinom nalazi u haploidnom obliku. Tijekom vegetativne faze rasta formira pseudomicelij i po dvije askospore u svakom askusu. Ima veliku moć biokonverzije različitih supstrata, posjeduje brojne enzime koji mu omogućuju rast na drvnjoj biomasi te crijevima kukaca, a konstruirani su i sojevi koji proizvode mliječnu i fumarnu kiselinu (Jeffries i Van Vleet, 2009). Za uspješnu ekspresiju heterolognih gena izuzetno je važno znati da *S. stipitis* pripada tzv. CUG skupini kvasaca kod kojih kodon „CUG“ kodira za serin, pa je stoga najčešće nužno modificirati sastav kodona prilikom kloniranja heterolognih gena (Löbs i sur., 2017).

Ovaj nekonvencionalni kvasac ima izuzetno velik kapacitet za fermentaciju ksiloze, što ga čini pogodnim mikroorganizmom za proizvodnju etanola na kompleksnim lignoceluloznim sirovinama, pri čemu ne dolazi do proizvodnje ksilitola ili se on proizvodi u zanemarivim količinama (Ruchala i sur., 2020). Lignocelulozna biomasa sastoji se od celuloze, hemiceluloze i lignina, a ksiloza nastaje hidrolizom hemiceluloze prilikom obrade sirovine. *S. cerevisiae* prirodno nema sposobnost iskorištavanja ove pentoze kao izvora ugljika. Tek transformacijom genima za ksiloza reduktazu i ksiloza dehidrogenazu, koji potječu iz *S. stipitis*, kvasac *S. cerevisiae* uspješno metabolizira ksilozu (Mohd Azhar i sur., 2017).

Glavne mane *S. stipitis* su spora fermentacijska aktivnost, manje efikasna fermentacija pentozna u odnosu na heksoze iz lignocelulozne biomase, osjetljivost na inhibitore koji se oslobađaju tijekom hidrolize ove sirovine te niska tolerancija na etanol i šećere (Harner i sur., 2015). Još uvijek nije razvijeno dovoljno alata za provođenje metoda genetičkog inženjerstva u svrhu poboljšanja svojstava ovog nekonvencionalnog kvasca. Najčešće se provode postupci uvođenja nasumičnih mutacija djelovanjem UV zračenja, fuzije protoplasta i adaptivna evolucija (Löbs i sur., 2017). Ilegitimna rekombinacija preferirana je vrsta genetičke rekombinacije u ovom kvascu, što znatno otežava ciljane modifikacije genoma. Također, rezistentan je na veliki broj antibiotika, pa je izbor selektivnih markera znatno ograničen (Ruchala i sur., 2020).

2.3. Genetičko inženjerstvo nekonvencionalnih kvasaca

2.3.1. Genetička rekombinacija

Heterologna ekspresija gena može se postići transformacijom stanice replikativnom ili nereplikativnom transformirajućom DNA. Replikativni plazmidi efikasno se koriste za transformaciju kvasca *S. cerevisiae* zbog dostupnosti širokog spektra stabilnih plazmidnih vektora, koji ostaju postojani u stanicama u velikom broju kopija (Lee i sur., 2015). S druge strane, primjena plazmidnih vektora za transformaciju nekonvencionalnih kvasaca, poput *S. stipitis*, ograničena je zbog njihove nepravilne raspodjele u stanice kćeri prilikom diobe i malog broja kopija u stanici (Löbs i sur., 2017; Vernis i sur., 2001). Uvođenje centromerne sekvencije *CEN5* na plazmidne vektore može poboljšati njihovu stabilnost u stanicama nekonvencionalnih kvasaca, kao i razinu ekspresije plazmidnih gena. Sekvencija *CEN5* sastavni je dio svih kromosoma na kojem se nalazi multiproteinski kompleks kinetohora, za koju se vežu niti diobenog vretena prilikom stanične diobe. Uvođenje ove sekvencije na plazmid koji sadrži ishodište replikacije osigurava njegovu nepristranu segregaciju prilikom stanične diobe (Cao i sur., 2017).

Ipak, za uvođenje novih gena ili cijelih biosintetskih puteva u industrijski važne sojeve nekonvencionalnih kvasaca pogodnija je integracija strane DNA u genom domaćina (Vernis i sur., 2001). Nereplikativna DNA se u genom domaćina može ugraditi homolognom rekombinacijom na točno određeno mjesto ili nehomolognom (ilegitimnom) rekombinacijom na nasumično mjesto u genomu. Integracija se odvija onim mehanizmom popravka dvolančanog loma koji je dominantan za stanicu domaćina. Homologna rekombinacija dominantan je mehanizam za popravak dvolančanog loma u *S. cerevisiae* i događa se samo između molekula ili regija DNA koje su homologne (identične ili gotovo identične). To znači da transformirajuća DNA, osim željenog gena i selektivnog biljega za transformante, mora sadržavati regije homologne ciljanim lokusima u genomu. Popravak dvolančanog loma u nekonvencionalnih kvasaca prvenstveno se odvija nehomolognim sparivanjem krajeva (eng. *Non-Homologous End Joining*, NHEJ), a homologna rekombinacija često je neučinkovita (Vogl i sur., 2013). Iako svega 40 pb homologije omogućuje uspješnu homolognu rekombinaciju u *S. cerevisiae*, u mnogim drugim eukariotima ni puno veće duljine homolognih regija nisu dovoljne da bi one rekombinirale s homolognom regijom u genomu (Kooistra i sur., 2004).

Budući da se transformirajuća DNA ugrađuje na nasumično mjesto u genomu, ilegitalna rekombinacija može uzrokovati inaktivaciju esencijalnih gena. Također, može doći do različite razine ekspresije integriranih gena kod različitih transformanata ovisno o tome na koje mjesto su se ugradili u genomu domaćina (Schwartz i sur., 2017).

Učestalost homologne rekombinacije u nekonvencionalnim kvascima može se povećati inaktivacijom gena *KU70* i *KU80*, koji imaju esencijalnu ulogu u popravljanju dvolančanog loma nehomolognim sparivanjem krajeva. Proteinski produkti ovih gena vežu se za slobodne krajeve linearne transformirajuće DNA te ju usmjeravaju na nasumično mjesto u genomu. Nehomologna rekombinacija dominantan je mehanizam za popravak dvolančanog loma u nekonvencionalnih kvasaca te se događa s povećanom učestalošću čak i ako su na transformirajućoj DNA prisutne regije homologne određenim lokusima na kromosomu (Kooistra i sur., 2004). Inhibicija mehanizma nehomologne rekombinacije pokazala se kao učinkovita metoda za povećanje uspješnosti genskog ciljanja u nekonvencionalnim kvascima. Disrupcija gena *KU80* u *S. stipitis* osigurava povećanu efikasnost integracije transformirajuće DNA u ciljani lokus u genomu homolognom rekombinacijom (Maassen i sur., 2008). Disrupcija istog gena u *K. marxianus* dovodi do povećanja učestalošću homologne rekombinacije na više od 70 %, a delecijom gena *KU70* iz genoma učestalost homologne rekombinacije može se povećati do 95 % (Choo i sur., 2014). Sličan efekt delecijom gena *KU70* može se postići i u *P. pastoris* (Näätsaari i sur., 2012). Učestalost homologne rekombinacije u divljem tipu *K. lactis* prilično je varijabilna, ali disrupcijom gena *KU80* postignuta je učestalost čak od 97 % neovisno o duljini homolognih regija (Kooistra i sur., 2004).

2.3.2. Regulacija ekspresije gena

Do sada su identificirani i kategorizirani brojni promotori i terminatori koji se primjenjuju u metodama sintetske biologije u nekonvencionalnim kvascima. Neki od njih potječu iz *S. cerevisiae*, ali i iz samih nekonvencionalnih kvasaca. Konstitutivni promotori osiguravaju ekspresiju gena koje reguliraju u svim uvjetima. Neki od jakih konstitutivnih promotora su P_{TEF1} , P_{POT1} , P_{POX2} , P_{ICL1} , P_{RPS7} i P_{XPR2} , koji potječu iz nekonvencionalnog kvasca *Y. lipolytica* (Patra i sur., 2021; Juretzek i sur., 2000; Müller i sur., 1998). Inducibilni promotori aktiviraju se samo u određenim uvjetima čime je omogućena kontrolirana ekspresija gena. Neki od jakih inducibilnih promotora identificirani su u *K. marxianus*, a oni su P_{PDC1} , P_{ALD4} , P_{XYL1} , P_{XYL2} , P_{TDH3} i P_{FBA1} i induciraju se ksilozom (Patra i sur., 2021; Rajkumar i sur., 2019). Kako bi se

pojačala aktivnost sintetskih promotora, dodaje im se sekvencija pojačivača (eng. *enhancer*) te ih je potrebno konstruirati tako da budu što manje duljine (Blazeck i sur., 2011). Odabir terminatora također ima značajan utjecaj na razinu ekspresije gena, pogotovo ako dolaze u kombinaciji s inducibilnim promotorom (Ramakrishnan i sur., 2020). Mogu utjecati i na stabilnost transkripta, pa brojne mogućnosti njihove primjene u metodama sintetske biologije za unapređivanje industrijski važnih vrsta nekonvencionalnih kvasaca tek trebaju biti istražene (Patra i sur., 2021).

2.3.3. Sustav *Cre-loxP*

Višestruke modifikacije genoma, bilo izbacivanje ili uvođenje velikog broja različitih gena, ograničene su problemom nedovoljnog broja različitih markera za selekciju transformanata. Sustav *Cre-loxP* jedan je od alata u genetičkom inženjerstvu za reduciranje broja potrebnih selektivnih biljega. Koristi se prilikom genetičkih manipulacija u kvascima poput *S. cerevisiae*, ali pokazao se učinkovitim za primjenu i u mnogim vrstama nekonvencionalnih kvasaca (Patra i sur., 2021).

Transformirajuća DNA konstruira se tako da sadrži regije *loxP*, koje se nalaze s obje strane selektivnog biljega. Sekvencija *loxP* duga je 34 pb i sastoji se od dva obrnuta ponavljanja razdvojena sekvencijom duljine 8 pb. Nakon što se transformirajuća DNA integrira u genom domaćina, rekombinaza Cre specifično prepoznaje regije *loxP* i katalizira mjesno-specifičnu rekombinaciju između susjednih regija *loxP*. Ako su ove sekvencije obrnuto ponovljene, aktivnošću rekombinaze Cre dolazi do inverzije DNA između ponavljanja. Ako su sekvencije *loxP* istosmjerno ponovljene, dolazi do izrezivanja sekvencije između ponavljanja i gubitka jednog ponavljanja (Yarmolinsky i Hoess, 2015). Primjena ovog sustava omogućuje uklanjanje selekcijskog markera nakon integracije egzogene DNA. Na taj je način, prilikom višestrukih modifikacija genoma, reduciran potreban broj različitih markera za selekciju transformanata.

S druge strane, uzastopne modifikacije genoma ovom metodom uzrokuju pojavu velikog broja regija *loxP* u genomu, koje zatim mogu međusobno rekombinirati i uzrokovati velike kromosomske prerasporede. Rekombinacija može rezultirati nastankom dicentričnih ili kružnih kromosoma te mnogim drugim kromosomskim abnormalnostima s citotoksičnim učinkom (Janbandhu i sur., 2014). Također, i dalje preostaje problem preferirane ilegitimne integracije strane DNA, te otežanog provođenja ciljanih modifikacija u genomima nekonvencionalnih

kvasaca. Iz navedenih razloga razvijaju se metode koje neće ostaviti nikakve tragove u genomu i pružit će mogućnost preciznih modifikacija, poput sustava CRISPR/Cas.

2.3.4. Sustav CRISPR/Cas

Sustav CRISPR/Cas posljednjih godina intenzivno se istražuje kao jedan od alata za precizno modificiranje eukariotskih genoma. Otkriven je u mnogim bakterijama i temelji se na nukleaznoj aktivnosti ribonukleoproteinskog kompleksa koji bakterijama služi za obranu od virusne infekcije (Horvath i Barrangou, 2010). Nukleazna aktivnost ovog kompleksa omogućuje njegovu primjenu u metodama genetičkog inženjerstva za modificiranje konvencionalnih i nekonvencionalnih kvasaca. Kompleks se sastoji od proteina Cas, najčešće Cas9 ili Cas12. Kompleks čini i molekula crRNA, koja je jednim dijelom komplementarna s ciljanom regijom u genomu, a drugim dijelom vezana za molekulu tracrRNA, koja je također dio kompleksa. Uz to, molekule crRNA i tracrRNA međusobno mogu biti povezane petljom i tvoriti sgRNA (eng. *Single Guide RNA*). Sekvencija PAM (eng. *Protospacer Adjacent Motif*) neophodna je za endonukleaznu aktivnost ribonukleoproteinskog kompleksa sustava CRISPR/Cas. Kompleks će specifično prepoznati mjesto u genomu na kojem se nalazi regija DNA komplementarna molekuli crRNA. Nakon komplementarnog sparivanja, enzim Cas uvodi dvolančani lom u toj regiji na genomu te dolazi do aktivacije mehanizama za popravak dvolančanog loma (Raschmanová i sur., 2018). Dvolančani lom može biti popravljen nehomolognim sparivanjem krajeva, što može rezultirati pojavom mutacija. Mutacije uvedene na ovaj način mogu uzrokovati pomak okvira čitanja (insercija, delecija) i inaktivaciju gena. Drugi mehanizam za popravak induciranog dvolančanog loma je homologna rekombinacija. Stanica se transformira fragmentom koji sadrži regije homologne s ciljanim lokusima u kvašćevom genomu. Transformirajuća DNA služi kao kalup za popravak dvolančanog loma, pri čemu se u genom uvode željene modifikacije. Efikasan sustav CRISPR/Cas razvijen je za nekoliko nekonvencionalnih kvasaca. Probleme i dalje predstavljaju nedovoljna specifičnost sekvencija PAM, što može dovesti do uvođenja dvolančanih lomova na neželjenim mjestima u genomu, te nedostatak odgovarajućih jakih promotora za ekspresiju sgRNA (Patra i sur., 2021). Sustav se može primjenjivati i za regulaciju ekspresije ciljanih gena. U tom slučaju protein Cas potrebno je inaktivirati tako da izgubi svoju endonukleaznu aktivnost, ali se i dalje može vezati na specifično mjesto u genomu. Ipak, korištenje ovog sustava u tu svrhu još uvijek nije dovoljno istraženo u nekonvencionalnim kvascima (Löbs i sur., 2017).

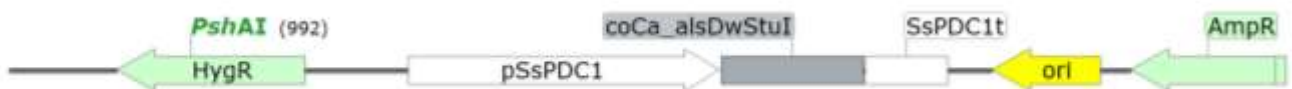
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

3.1.1.1 Kvasac *Scheffersomyces stipitis*

Za analizu su korišteni divlji tip i 6 transformanata soja JCM10742 kvasca *Scheffersomyces stipitis*. Ishodni soj *S. stipitis* JCM10742 potječe iz japanske kolekcije mikroorganizama (eng. *Japan Collection of Microorganisms*). Transformanti su konstruirani pomoću dva različita linearna fragmenta DNA. Transformirajuća DNA koja sadrži gen *alsD* ujedno nosi i gen za rezistenciju na higromicin kao selektivni biljeg za transformante (slika 1). Transformirajuća DNA koja sadrži gen *alsS* ujedno nosi i gen za rezistenciju na antibiotik nurseotricin kao selektivni biljeg (slika 2). Stoga su transformanti koji sadrže oba transformirajuća fragmenta fenotipa Hyg^R Nrs^R. Oba fragmenta transformirajuće DNA sadrže i bakterijsko ishodište replikacije (*ori*) i selektivni biljeg (Amp^R) za bakteriju *Escherichia coli*.



Slika 1. Mapa transformirajuće DNA 1, koja nosi gen *alsD* i rezistenciju na higromicin. Na slici su naznačena restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad.



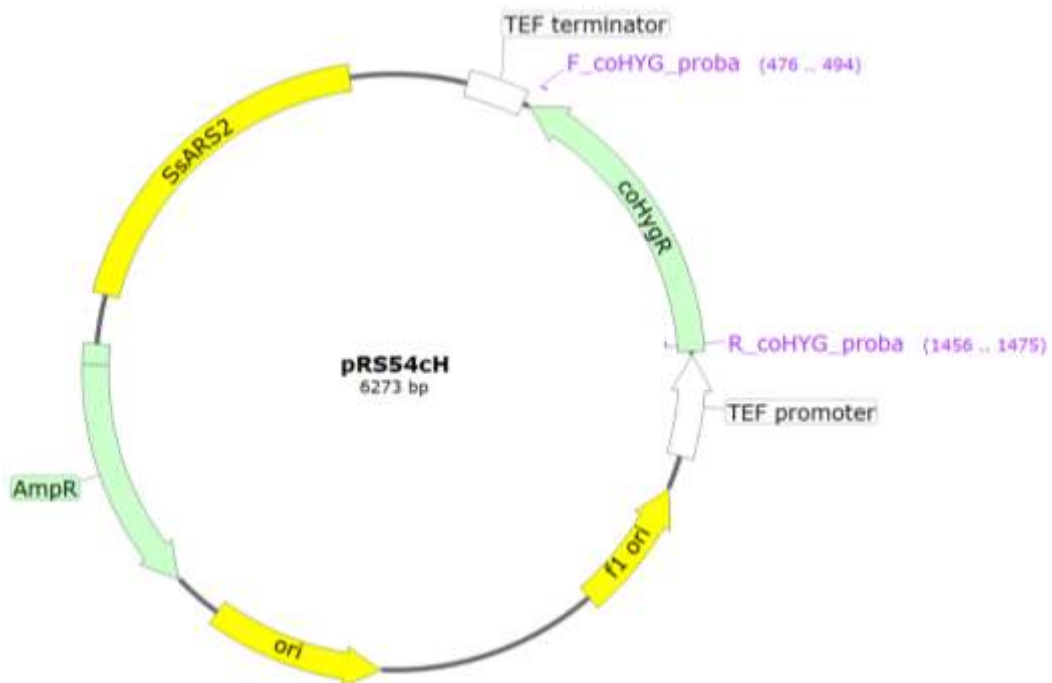
Slika 2. Mapa transformirajuće DNA 2, koja nosi gen *alsS* i rezistenciju na nurseotricin. Na slici su naznačena restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad.

3.1.1.2. Bakterija *Escherichia coli*

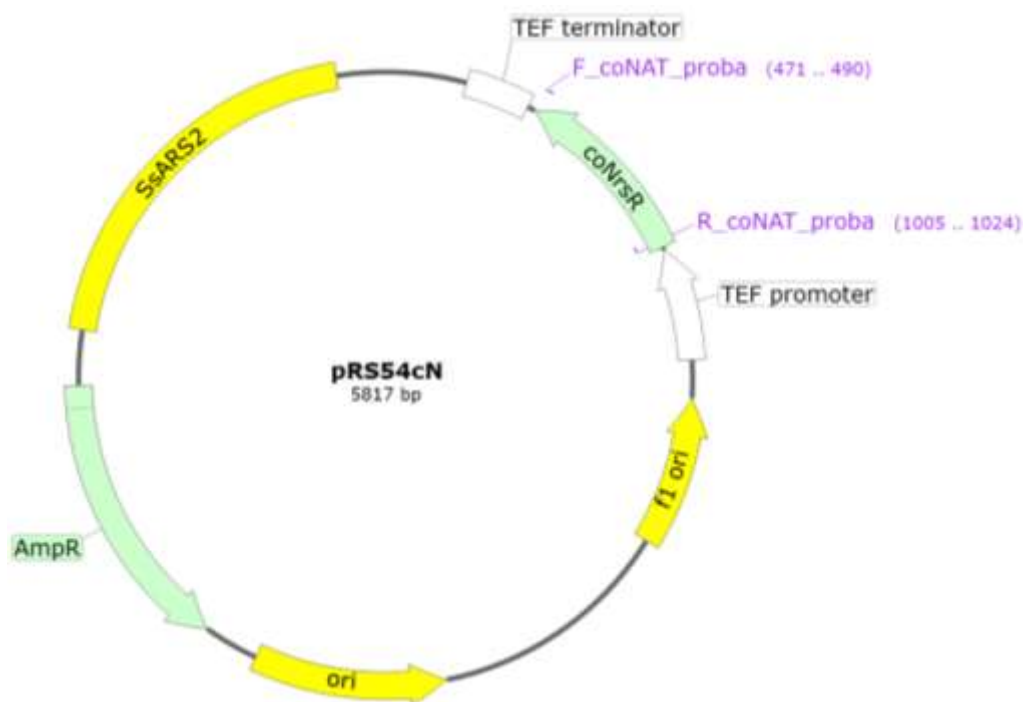
U ovom radu za umnažanje plazmidne DNA korišten je soj bakterije *Escherichia coli* DH5 α genotipa: *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

3.1.2. Plazmidi

Za sintezu DNA probe obilježene digoksigeninom (DIG) metodom PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*, lančana reakcija polimerazom), korišteni su plazmidi iz dva soja bakterije *Escherichia coli*. Jedan soj sadrži plazmid pRS54cH s genom za rezistenciju na higromicin (slika 3), koji služi kao kalup za sintezu probe coHYG. Drugi soj ima plazmid pRS54cN s genom za rezistenciju na nurseotricin (slika 4), koji služi kao kalup za sintezu probe coNAT.



Slika 3. Mapa plazmida pRS54cH s genom za rezistenciju na higromicin (*coHygR*) i označenim mjestima za komplementarno sparivanje početnica korištenih za sintezu probe metodom PCR.



Slika 4. Mapa plazmida pRS54cN s genom za rezistenciju na nurseotricin (*coNrsR*) i označenim mjestima za komplementarno sparivanje početnica korištenih za sintezu probe metodom PCR.

3.1.3. Oligonukleotidi

U ovom radu korištene su početnice prikazane u tablici 1. Početnice su korištene za umnažanje kalupa i sintezu proba obilježenih DIG-om.

Tablica 1. Početnice za sintezu proba za hibridizaciju DNA po Southernu

Počelnica	Sekvencija (5'-3')	T _m (°C)
F_coHYG	ccttggtctctggacgtgt	60
R_coHYG	gcaacatccgtcgaaaagtt	58
F_coNAT	ttaagggcatggcatagaca	56
R_coNAT	acaccgcatatcgttacgt	59

3.1.4. Hranjive podloge

3.1.4.1. Tekuća kompletna hranjiva podloga (YPD) za uzgoj kvasca:

Bacto pepton	20 g L ⁻¹
Yeast extract	10 g L ⁻¹
Glukoza	20 g L ⁻¹
Destilirana voda	do 100 mL

Podloga je sterilizirana filtracijom. Koncentracija higromicina za selekciju transformanata kvasca *Schefferomyces stipitis* iznosi 400 µg mL⁻¹, a koncentracija nurseotricina 50 µg mL⁻¹. U 6 mL sterilne podloge za selekciju transformiranih stanica doda se 6 µL higromicina (koncentracije 400 mg mL⁻¹) i 6 µL nurseotricina (koncentracije 50 mg mL⁻¹).

3.1.4.2. Tekuća kompletna hranjiva podloga (LB) za uzgoj bakterije:

Bacto-pepton	10 g L ⁻¹
Bacto-yeast extract	5 g L ⁻¹
NaCl	10 g L ⁻¹

Za pripremu podloge s ampicilinom u 4 mL sterilne hranjive podloge LB potrebno je dodati 20 µL sterilne otopine ampicilina (koncentracije 20 mg mL⁻¹).

3.1.5. Otopine

3.1.5.1. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA kvasca

Tris-HCl (1M):

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

pH 7,4 – 7,0 mL

pH 7,6 – 6,0 mL

pH 8,0 – 4,2 mL

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

186,1 g EDTA·2H₂O otopi se u 80 mL destilirane vode. pH se podesi dodatkom NaOH (približno 2 g peleta). Volumen se dopuni destiliranom vodom do 100 mL.

SCE:

Sorbitol	1 M
Natrijev citrat	0,10 M
EDTA	0,06 M

Zimoliaza 20-T:

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

STE:

SDS	5 g L ⁻¹
EDTA (pH 8,5)	0,05 M
Tris-HCl (pH 8,0)	0,1 M

Kalijev acetat (3 M):

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

Pufer TE (pH 8,0 ili 7,4):

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

Priprema se iz sterilnih otopina

RN-aza:

Ribonukleaza A otopi se u 10 mM Tris-HCl (pH 7,59 i 15 mM NaCl do konačne koncentracije 10 mg mL⁻¹ i zagrije 15 min u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon hlađenja do sobne temperature čuva se na -20 °C.

Amonijev acetat (8 M):

616,64 g amonijeva acetata otopi se u 1 L destilirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4 °C.

3.1.5.2. Otopine za gel-elektroforezu

Pufer TBE (10×):

Borna kiselina	55 g
Tris	108 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 mL
Destilirana voda	do 1000 mL

Pufer za gel-elektroforezu priprema se u koncentriranom obliku i naknadno razrjeđuje destiliranom vodom do željene koncentracije. Nije potrebno provesti sterilizaciju.

Agarozni gel:

Razrjeđivanjem TBE-pufera (10×) pripremi se TBE-pufer (1×). Potrebno je otopiti 1,06 g agaroze u 200 mL TBE-pufera (1×) za pripremu 0,8 %-tnog agaroznog gela. Ovisno o potrebi, koncentracija agaroze u gelu može biti 7-20 g L⁻¹.

Boja za nanošenje uzorka:

Ksilen-cijanol	2,5 g L ⁻¹
Brom-fenol-plavo	2,5 g L ⁻¹
Ficoll 400	250 g L ⁻¹

Otopina se ne sterilizira i čuva na 4 °C.

Etidijev bromid:

Pripremi se osnovna otopina koncentracije 10 mg mL⁻¹, koju nije potrebno sterilizirati. Otopina za vizualizaciju DNA pripremi se dodatkom 50 μL osnovne otopine u 1 L destilirane vode. Osnovna otopina i otopina za vizualizaciju čuvaju se u tamnoj boci pri 4 °C.

3.1.5.3. Otopine za hibridizaciju DNA metodom po Southernu

HCl (0,25 M):

22 mL 10 M otopine HCl razrijedi se dodatkom 978 mL destilirane vode.

Amonijev acetat (1 M):

Pripremi se razrjeđivanjem 8 M otopine amonijeva acetata.

NaOH (0,4 M):

Pripremi se otapanjem 16 g NaOH (peleta) u 1 L destilirane vode.

NaOH/amonijev acetat:

Pripremi se otapanjem 16 g NaOH i 77,08 g amonijeva acetata u 1 L destilirane vode.

SSC (20×):

Pripremi se otapanjem 175,3 g NaCl i 88,2 g natrijeva citrata u 900 mL destilirane vode. Puffer sadrži 3 M NaCl i 0,3 M natrijev acetat. pH se namješta na vrijednost 7,0 dodatkom HCl ili NaOH. Sterilizacija se provodi u autoklavu.

Predhibridizacijska otopina:

„Blocking reagent“	1 g
(smjesa za sprječavanje nespecifičnih interakcija)	
SSC (20×)	25 mL
Na-sol <i>N</i> -laurilosarkozina (100 g L ⁻¹)	1 mL
SDS (10 %)	200 μL
Destilirana voda	do 100 mL

Hibridizacijska otopina:

Istog je sastava kao predhibridizacijska otopina. Dodatno sadrži 20-50 ng obilježene DNA-probe.

Otopina A:

SSC (20×)	20 mL
SDS (10 %)	2 mL
Destilirana voda	178 mL

Otopina B:

SSC (20×)	1 mL
SDS (10 %)	2 mL
Destilirana voda	197 mL

Otopina P1:

Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	100 mL
NaCl	30 mL
Destilirana voda	870 mL

Otopina P2:

„Blocking reagent“	1 g
Otopina P1	do 100 mL

Otopina P3:

Tris-HCl (1 M; pH 9,7)	50 mL
NaCl (5 M)	25 mL
MgCl ₂ (1 M)	25 mL
Destilirana voda	do 500 mL

pH otopine podesi se na vrijednost 9,5 dodatkom otopine HCl.

Otopina za detekciju:

Otopina P3	10 mL
NBT	45 µL
BCIP	35 µL

3.1.6. Kemikalije i enzimi

Sastojci hranjivih podloga	<i>Difco</i> , Detroit <i>Merck</i> , Darmstadt <i>Sigma Chemicals Co.</i> , St. Louis
Restriksijski enzimi PshAI, EcoRV, BamHI:	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, USA
Apsolutni etanol:	<i>Novokem</i> , Zagreb
Izopropanol:	<i>Alkaloid</i> , Skopje
EDTA:	<i>Kemika</i> , Zagreb
Tris (Tris Ultra Pure):	<i>Sigma Chemicals Co.</i> , St. Louis
Zimoliza (Zymolise 100-T i 20-T):	<i>Seikugaku Kogyo Co.</i> , Tokyo
Ribonukleaza A:	<i>Sigma Chemicals Co.</i> , St. Louis
Agaroz:	<i>Appligene</i> , Strassbourg
DNA bakteriofaga λ :	<i>New England Biolabs</i> , Beverly
Etidijev bromid:	<i>Boehringer Mannheim GmbH</i> , Mannheim
Komplet kemikalija za izolaciju plazmidne DNA:	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, USA
Komplet kemikalija za PCR:	<i>Promega</i> , Madison, USA
Komplet kemikalija za hibridizaciju DNA metodom po Southernu:	<i>Boehringer Mannheim GmbH</i> , Mannheim

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis* u tekućoj hranjivoj podlozi

Pojedinačne kolonije kvasca precijepu se s krutih hranjivih podloga u epruvete s 6 mL tekuće hranjive podloge YPD pomoću sterilne mikrobiološke ušice. Za uzgoj transformanata koriste se podloge s dodatkom higromicina i nurseotricina, a uzgoj divljeg tipa provodi se u podlogama bez antibiotika. Stanice se inkubiraju na tresilici pri 180 okretaja u minuti i 28 °C do stacionarne faze rasta.

3.2.2. Izolacija genomske DNA iz kvasca

Stanice iz prethodno uzgojene kvašćeve kulture izdvoje se centrifugiranjem 5 min pri 22 °C i 5000 okretaja u minuti te odljevanjem supernatanta. Talog se dva puta ispere s 800 µL vode uz centrifugiranje 5 min pri 22 °C i 5000 okretaja u minuti, a zatim se resuspendira u 800 µL otopine SCE uz centrifugiranje pri istim uvjetima. Nakon toga, talog se resuspendira u 130 µL otopine SCE uz dodatak 20 µL zimoliazije i inkubaciju 1 h pri 37 °C. U suspenziju se doda 800 µL otopine STE, suspenzija se promiješa okretanjem, inkubira 20 min pri 70 °C i ohladi na ledu. U suspenziju se doda 200 µL hladnog kalijeva acetata te ju je potrebno dobro promiješati okretanjem i inkubirati u ledu preko noći kako bi se istaložili proteini. Nakon inkubacije, uzorci se centrifugiraju 20 min pri 4 °C i 10 000 okretaja u minuti. Supernatant se pažljivo izdvoji u novu kivetu u koju se zatim doda 600 µL izopropanola. Suspenzija se centrifugira 20 min pri 4 °C i 10 000 okretaja u minuti, supernatant se odlije i talog osuši uz plamenik. Talog se resuspendira u 300 µL TE pufera uz dodatak 1 µL RN-aze, sve se dobro promiješa pipetiranjem i stavi na inkubaciju u vodenu kupelj tijekom 20 min na 70 °C.

3.2.3. Taloženje DNA

U uzorke se doda 100 µL 8 M amonijeva acetata i 800 µL 96 %-tnog etanola i dobro promiješa okretanjem. DNA se taloži preko noći u frižideru na -20 °C. Otopina se centrifugira 20 min pri 4 °C i 10 000 okretaja u minuti i supernatant odlije. Talog je potrebno posušiti najprije pomoću vakuum sisaljke, kojom se pažljivo uklone zaostale kapljice s unutrašnje stijenke epice, a zatim 10 min uz plamenik. Suhi talog resuspendira se u 20 µL sterilne deionizirane vode i inkubira kroz 5 min pri 70 °C kako bi se DNA potpuno otopila.

3.2.4. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Restrikcija izolirane DNA provodi se pri optimalnim uvjetima za svaki enzim prema uputama proizvođača. U ovom radu korišteni su restrikcijski enzimi PshAI, EcoRV i BamHI proizvođača *New England Biolabs*, Ipswich, MA.

3.2.5. Gel-elektroforeza

Pripremi se 0,8 %-tni agarozni gel otapanjem 1,6 g agaroze u 200 mL pufera TBE (1×). Tikvica sa smjesom postepeno se zagrijava u mikrovalnoj pećnici do potpunog otapanja agaroze nakon čega je otopinu potrebno ohladiti na oko 60 °C. Kalup za gel ima dvije otvorene strane, pa ih je potrebno dobro zatvoriti ljepljivom trakom. U kalupe s umetnutim „češljem“ ulije se ohlađena otopina i ostavi da se gel skrutne nakon čega se ukloni ljepljiva traka. Gelovi se umetnu u kadicu uređaja za elektroforezu, iz svakog izvadi „češalj“ i ulije se pufer TBE (1×) tako da prekrije gelove. U formirane jažice mikropipetom se nanese uzorci pomiješani s migracijskim bojilom. Elektroforeza se provodi 2-3 h pri naponu od 80 V. Gelovi se, nakon elektroforeze, inkubiraju u otopini etidijeva bromida 15-20 min. DNA u gelu se vizualizira na transiluminatoru paljenjem UV svjetla i gelovi se fotografiraju kroz crveni filter.

3.2.6. Uzgoj bakterije *Escherichia coli* u tekućoj hranjivoj podlozi

Pojedinačne kolonije precijepu se pomoću mikrobiološke ušice s krute u tekuću hranjivu podlogu LB s ampicilinom. Epruvete se inkubiraju preko noći na tresilici pri 37 °C.

3.2.7. Izolacija plazmidne DNA

Prethodno uzgojene bakterijske kulture centrifugiraju se 3 min pri 7000 okretaja u minuti. Supernatant se odlije, a talog resuspendira u 200 µL pufera B1 i promiješa pipetiranjem. Suspenziji se doda 200 µL pufera B2 uz lagano miješanje okretanjem i inkubaciju na sobnoj temperaturi kroz 1 min. Zatim se doda 400 µL pufera B3 i lagano miješa okretanjem do pojave žutog obojenja kada se uzorci stavljaju na inkubaciju 2 min pri sobnoj temperaturi. Lizat se centrifugira 5 min pri 13 000 okretaja u minuti. Dobiveni supernatant pažljivo se prenese na kolonu s matriksom i centrifugira 1 min pri 11 000 okretaja u minuti. Dio koji je prošao kroz kolonu se odlije, a na kolonu se doda 200 µL pufera za ispiranje 1 i centrifugira 1 min pri 11 000 okretaja u minuti. Na kolonu se potom doda 400 µL pufera za ispiranje 2 i ponovo centrifugira pri istim uvjetima. Kolona se prenese u novu epicu. DNA se s kolone eluira uz dodatak 40 µL pufera za eluciju i centrifugiranje 1 min pri 11 000 okretaja u minuti.

3.2.8. Sinteza i obilježavanje probe za hibridizaciju DNA metodom po Southernu

Probe se sintetiziraju pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR). U prvom koraku PCR-om se sintetizira neobilježeni PCR produkt, a zatim se on koristi kao kalup za sintezu obilježenog PCR produkta, pri čemu se koristi otopina deoksiribonukleotid-trifosfata koja sadrži i dUTP na koji je vezan digoksinin (DIG). Kao kalup za sintezu probe coHYG koristi se izolirana plazmidna DNA s genom za rezistenciju na higromicin, a za sintezu probe coNAT plazmidna DNA s genom za rezistenciju na nurseotricin. Za provođenje reakcija koristi se enzim GoTaq® DNA Polymerase prema uputama proizvođača. Uspješnost svakog koraka umnažanja provjerava se gel-elektroforezom. Sastav reakcijske smjese za PCR prikazan je u tablici 2, a uvjeti provedene metode PCR prikazani su u tablici 3.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za sintezu probe coHYG, tj. coNAT metodom PCR

Komponenta	Volumen (µL)
Deionizirana voda	35,7
Pufer (5×)	10
Otopina deoksiribonukleotida (10 mM)	1
* Uzvodna početnica (F_coHYG / F_coNAT)	1
* Nizvodna početnica (R_coHYG / R_coNAT)	1
Dna kalup	0,3
Polimeraza	1

* Početnica F_coHYG koristi se za sintezu probe coHYG; početnica F_coNAT koristi se za sintezu probe coNAT

* Početnica R_coHYG koristi se za sintezu probe coHYG; početnica R_coNAT koristi se za sintezu probe coNAT

Pripremljene reakcijske otopine potrebno je dobro izmiješati pipetiranjem prije stavljanja u uređaj za PCR. Uvjeti provođenja metode PCR programiraju se prema uputama proizvođača.

Tablica 3. Uvjeti provođenja metode PCR

Korak	Temperatura (°C)	Trajanje (min)
Početna denaturacija	95	2
Denaturacija	95	0,5
Sparivanje početnica	52	0,5
Sinteza DNA	72	1
Završna sinteza	72	5
Hlađenje	4	nekoliko minuta

3.2.9. Metoda hibridizacije DNA po Southernu

Hibridizacija DNA metodom po Southernu provodi se u svrhu molekularno-genetičke analize transformanata. Nakon transfera DNA s gela na membranu i hibridizacije sa specifičnom DNA probom, detektiraju se samo oni fragmenti za koje se proba komplementarno vezala. Proba je neradioaktivno obilježena DIG-om i vizualizacija se temelji na kolornoj reakciji. Kolornu reakciju provodi alkalna fosfataza fuzionirana s antitijelom koje se specifično veže za DIG.

Gelovi se stave na inkubaciju u 0,25 M otopinu HCl oko 20 min, tj. sve dok se boja migracijskog bojila ne promijeni u žutu kao indikator promjene pH. Nakon ispiranja u kadici s vodom, gelovi se inkubiraju u otopini 0,4 M NaOH i 1 M amonijeva acetata kroz 15 min, odnosno dok vrpce ponovo postanu ljubičaste boje. Prijenos DNA s gela na membranu odvija se u denaturirajućim uvjetima pomoću uređaja za vakuum prijenos (*GE Healthcare Biosciences*, New Jersey). Na filter papiru najprije se olovkom označe uokvirena mjesta za membrane. Papir se stavi u uređaj i namoči vodom kako bi što bolje prionuo za perforirano dno. Na označena mjesta na papiru postavljaju se membrane, a zatim maska, koja ih uokviruje. Svi slojevi moraju biti dobro fiksirani za dno. Na svaku membranu pažljivo se priglone dio gela na kojem se nalaze uzorci, pri čemu se pazi da se između gela i membrane ne stvore mjehurići zraka. Kada je cijela aparatura pripremljena, uključi se pumpa. Pumpa stvara vakuum, koji djeluje kao pokretačka sila za prijenos DNA s gela na membranu. Gelovi se urone u otopinu 0,4 M NaOH i otopina se nadopunjuje po potrebi tijekom prijenosa. Prijenos traje oko 60 min i DNA će se pritom za membrane vezati ionskim vezama. Nakon prijenosa, membrane se pincetom pažljivo prenesu iz uređaja u kadice s 1 M amonijevim acetatom i inkubiraju 15 min. Membrane se ostave u sušioniku na 120 °C kroz 30 min, čime je omogućeno kovalentno vezanje DNA za membranu.

Zatim je potrebno provesti predhibridizaciju kako bi se spriječilo nespecifično vezanje probe na membranu. Kada je predhibridizacijska otopina pripremljena, membrane se stave u plastične vrećice i zatale s tri strane. U vrećice se ulije predhibridizacijska otopina nakon čega je važno ukloniti mjehuriće zraka pažljivim istiskivanjem pomoću staničevine. Vrećice se zatale s četvrte strane, urone u vodenu kupelj i inkubiraju uz protresanje 3 h pri 64 °C. Predhibridizacijska otopina se izlije i membrane prebace u nove vrećice i zatale s tri strane. Hibridizacijska otopina pripremi se na isti način kao predhibridizacijska, ali uz dodatak obilježene probe i DNA- nosača

(eng. *carrier DNA*). Probu je potrebno denaturirati zagrijavanjem do vrenja kroz 5 min i naglim hlađenjem na ledu. Hibridizacijska otopina ulije se u vrećice i vrećice se zatale s četvrte strane te inkubiraju preko noći uz protresanje pri 64 °C.

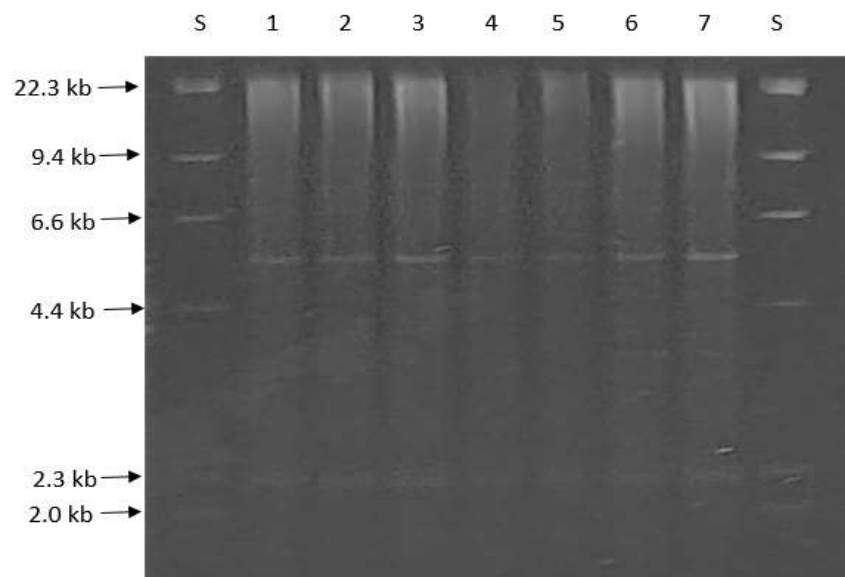
Nakon hibridizacije, membrane se izvade iz vrećica i ispiru u posudama s otopinom A kroz 10 min uz lagano protresanje pri sobnoj temperaturi. Otopina A se izlije i membrane još jednom inkubiraju u preostalom volumenu otopine A pri istim uvjetima. Membrane se premjeste u plastične vrećice i zatale s tri strane. Ulije se otopina B, uklone mjehurići i vrećice zatale s četvrte strane. Ispiranje u otopini B provodi se kroz 10 min uz protresanje pri 64 °C nakon čega se otopina B izlije iz vrećica i cijeli postupak ponovi još jednom. Membrane se izvade iz vrećica i kratko inkubiraju u otopini P1, a zatim u otopini P2 tijekom 60 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, membrane se zatale u vrećice zajedno s 20 mL otopine P2 u koju je dodano 4 µL otopine antitijela. Inkubacija se provodi na tresilici kroz 30 min. Membrane se izvade iz vrećica i dva puta po 10 min ispiru u otopini P1 na tresilici pri sobnoj temperaturi nakon čega se kratko urone u otopinu P3. Za provođenje kolorne reakcije membrane je potrebno zataliti u vrećice zajedno s otopinom za detekciju koja sadrži BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat) i NBT (eng. *Nitroblue Tetrazolium Salt*). Vrećice s membranama inkubiraju se u mraku pri 37 °C preko noći, tj. do pojave ljubičasto obojenih vrpca. BCIP je supstrat za alkalnu fosfatazu, a NBT indikator koji daje ljubičasto obojenje vrpca. Reakcija se zaustavlja dodatkom destilirane vode u vrećice s membranama. Membrane je potrebno osušiti u sušioniku na 37 °C, zataliti u nove vrećice i čuvati u mraku.

4. REZULTATI I RASPRAVA

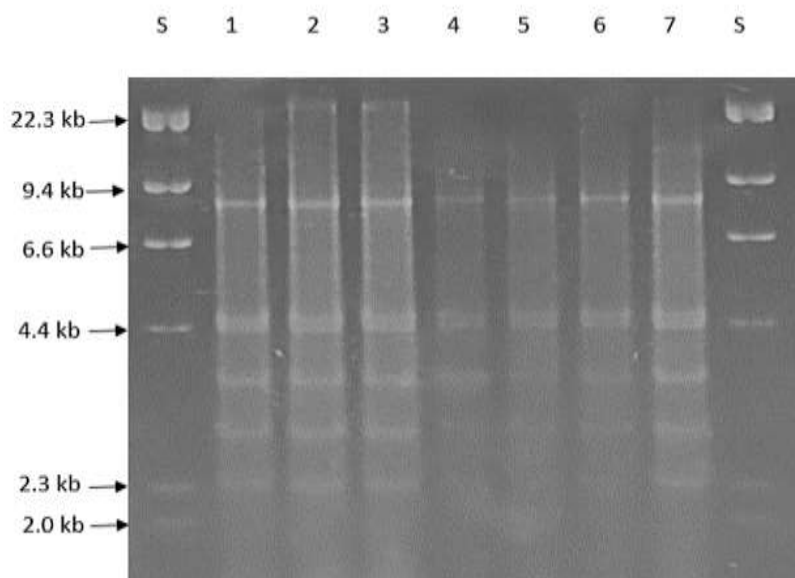
U ovom radu provedena je analiza šest transformanata kvasca *Scheffersomyces stipitis* soja JCM10742 hibridizacijom DNA metodom po Southernu. Transformanti su dobiveni kotransformacijom dva linearna transformirajuća fragmenta DNA. Svaki od tih fragmenata nosi po jedan od dva gena potrebna za sintezu 2,3-butandiola te gen za rezistenciju na antibiotik kao selektivni biljeg za transformante (slika 1 i slika 2). Stoga je transformante koji su u genomu nosili oba transformirajuća fragmenta bilo moguće selekcionirati na podlozi s antibioticima higromicinom i nurseotricinom. Obzirom da linearni transformirajući fragmenti nisu imali krajeve homologne regijama u genomu kvasca, očekivana je ilegitimna ugradnja oba fragmenta na nasumična mjesta u genomu. Cilj ovog rada bio je provjeriti je li zaista došlo do ilegitimne integracije oba transformirajuća fragmenta. U tu svrhu, genomsku DNA kvasca najprije je bilo potrebno izolirati, pocijepati odgovarajućim restrikcijским enzimom i uspješnost izolacije i cijepanja provjeriti gel-elektroforezom (poglavlje 4.1.). Također su sintetizirane dvije probe obilježene DIG-om specifične za pojedinu transformirajuću DNA kako bi se provedla hibridizacija DNA metodom po Southernu (poglavlje 4.2.). U konačnici, provedena je molekularna analiza transformanata hibridizacijom DNA metodom po Southernu (poglavlje 4.3.).

4.1. Izolacija i cijepanje genomske DNA

Za izolaciju DNA, transformanti te netransformirani soj *S. stipitis* uzgojeni su u odgovarajućim tekućim hranjivim podlogama prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. do stacionarne faze rasta. Nakon uzgoja, iz kvašćevih stanica izolirana je genomska DNA (prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.) te je pocijepana odgovarajućim restrikcijским enzimom (postupak opisan u poglavlju 3.2.4.). Polovina izolirane DNA od svakog uzorka procijepana je restrikcijским enzimom EcoRV, a druga polovina restrikcijским enzimom PshAI. Uzorci pocijepani s PshAI prilikom molekularne analize metodom hibridizacije DNA po Southernu bit će hibridizirani s probom koja omogućuje detekciju selektivnog biljega Hyg^R, tj. jedne transformirajuće DNA 1, a oni pocijepani s EcoRV hibridizirat će se s probom koja omogućuje detekciju transformirajuće DNA 2 (hibridizirajući sa selektivnim biljegom Nrs^R). Provjera uspješnosti restrikcije provodi se gel-elektroforezom u 0,8 %-tnom agaroznom gelu (postupak opisan u poglavlju 3.2.5.).



Slika 5. Gel-elektroforeza genomske DNA kvasca pocijepane restrikcijskim enzimom PshAI
 1 - netransformirani soj, 2-7 - transformanti, S - 100 ng DNA bakteriofaga λ pocijepane s HindIII



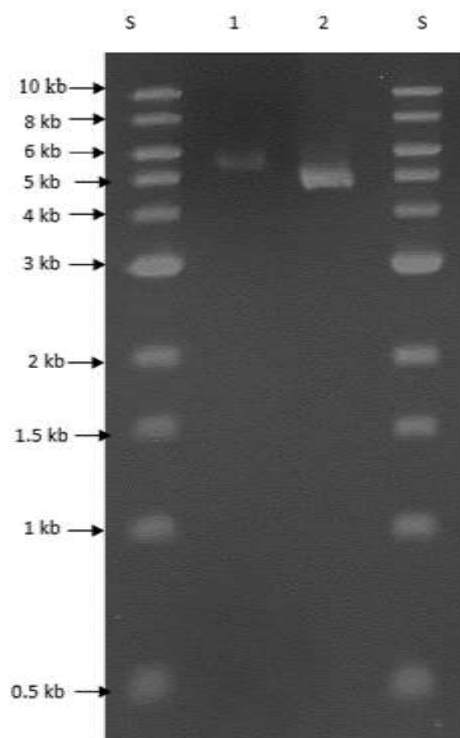
Slika 6. Gel-elektroforeza genomske DNA kvasca pocijepane restrikcijskim enzimom EcoRV
 1 - netransformirani soj, 2-7 - transformanti, S - 100 ng DNA bakteriofaga λ pocijepane s HindIII

Na oba gela očekivano je vidljiv „razmaz“, uz pojedine diskretne vrpce, što znači da je genomna DNA uspješno izolirana i pocijepana. Svaki od korištenih restrikcijskih enzima, osim što cijepa unutar integrirane transformirajuće DNA, može cijepati i na velikom broju drugih mjesta u genomu. Zbog toga je cijepanjem kvašćevih kromosoma u oba slučaja nastao veliki broj fragmenata različitih veličina.

Pri vrhu gela na koji su naneseni uzorci pocijepani s PshAI (slika 5) vidljivo je puno velikih fragmenata DNA. Vjerojatno su restrikcijska mjesta za PshAI u genomu rijetka, stoga cijepanjem nastaje puno velikih fragmenata. U uzorcima koji su pocijepani s EcoRV (slika 6) ne nastaje toliko velikih fragmenata, što znači da su restrikcijska mjesta za ovaj enzim češća. U svim uzorcima vidljive su pojedine vrpce jačeg intenziteta u odnosu na ostale u istom uzorku. One se mogu objasniti cijepanjem unutar repetitivne DNA, primjerice gena za rDNA, pri čemu nastaje puno fragmenata iste veličine.

4.2. Sinteza proba obilježenih DIG-om

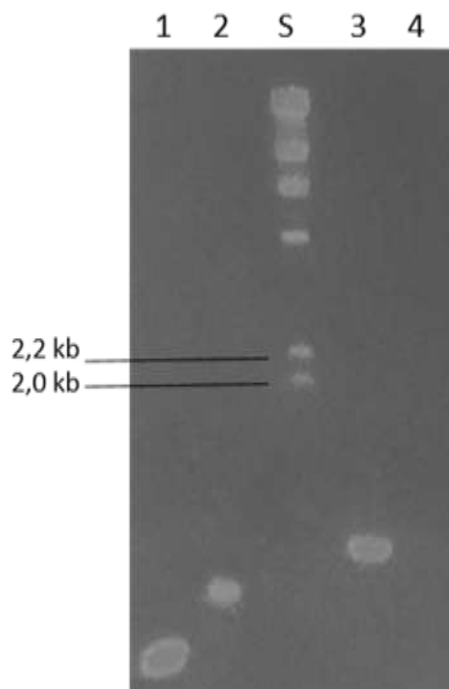
Prisutnost i mjesto ugradnje transformirajuće DNA 1 (slika 1) provjerit će se hibridizacijom DNA po Southernu, pri čemu će kao proba poslužiti neradioaktivno DIG-om obilježen ORF gena Hyg^R. Prisutnost i mjesto ugradnje transformirajuće DNA 2 provjerit će se istom metodom, ali će kao proba poslužiti neradioaktivno DIG-om obilježen ORF gena Nrs^R. U tu svrhu, potrebno je sintetizirati navedene probe obilježene DIG-om, a to je provedeno pomoću PCR-a. Kako bi se umnažanje PCR-om moglo provesti, najprije su iz bakterija *E. coli* izolirani plazmidi pRS54cH i pRS54cN (prikazani na slikama 3 i 4), koji sadrže gene za rezistenciju na higromicin i nurseotricin i koji će zatim poslužiti kao kalup za njihovo umnažanje. Izolacija plazmidne DNA provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7., a uspješnost izolacije provjerena je gel-elektroforezom.



Slika 7. Gel-elektroforeza izolirane plazmidne DNA. Uzorci na gelu:

1 - pRS54cH, 2 - pRS54cN, S - standard za gel-elektroforezu (1 kb DNA Ladder, *New England Biolabs*)

Iz gela je vidljivo da je izolacija oba plazmida bila uspješna. Budući da je provedena gel-elektroforeza nepocijepanih plazmida, veličinu svakog nije moguće odrediti na temelju usporedbe sa standardom jer nativna plazmidna DNA zauzima konformaciju superzavojnice. Nakon izolacije, obje plazmidne DNA linearizirane su pomoću enzima BamHI (poglavlje 3.2.4.) kako tijekom PCR reakcije superzavijena struktura ne bi ometala dobivanje produkta. Umnažanje ORF-ova gena Hyg^R i Nrs^R najprije je provedeno bez prisutnosti dUTP-a obilježenog DIG-om, a zatim je dobiveni PCR produkt poslužio kao kalup za sintezu probe. Kao što je vidljivo iz mjesta vezanja početnica za umnažanje ORF-ova (slika 3 i 4), očekivane duljine PCR produkata su 999 pb za Hyg^R i 553 pb za Nrs^R . Međutim, u slučaju uspješne sinteze probe obilježene DIG-om očekivano je da dobiveni obilježeni PCR produkt putuje sporije nego neobilježeni jer je zbog ugradnje dUTP-a s DIG-om veće molekulske mase. Uspješnost sinteze proba metodom PCR, bez dUTP-DIG i uz njegov dodatak, analizirana je gel-elektroforezom.



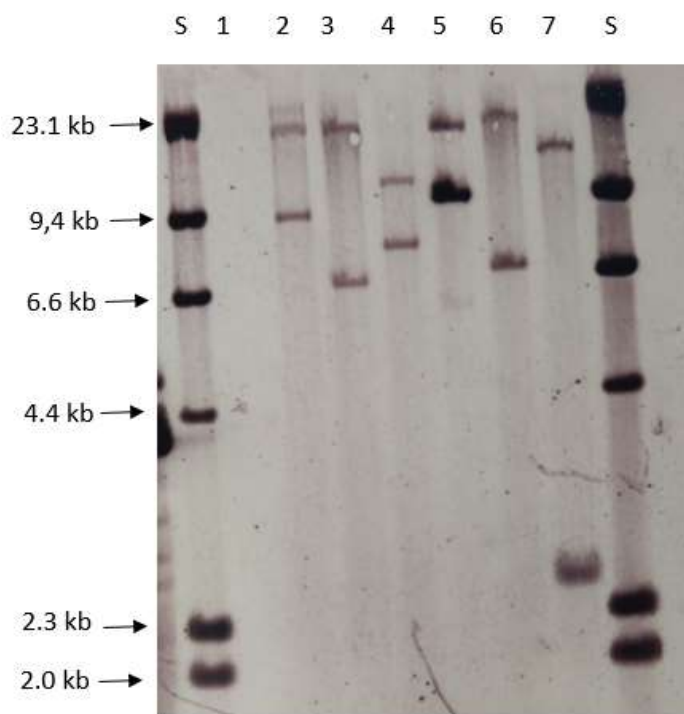
Slika 8. Provjera uspješnosti sinteze obilježenih proba pomoću gel-elektroforeze. Jažica 1 - produkt umnažanja ORF-a gena Nrs^R bez dodatka dUTP-DIG, 2 - produkt umnažanja ORF-a gena Nrs^R uz dodatak dUTP-DIG, 3 - produkt umnažanja ORF-a gena Hyg^R bez dodatka dUTP-DIG, 4 - produkt umnažanja ORF-a gena Hyg^R uz dodatak dUTP-DIG, S - standard za gel-elektroforezu (DNA bakteriofaga λ pocijepana enzimom HindIII)

Kao što je vidljivo iz gornjeg gela, umnažanje ORF-a gena Nrs^R i Hyg^R bilo je uspješno i rezultiralo je jednom vrpcom očekivane veličine (999 pb za Hyg^R i 553 pb za Nrs^R). Također, u jažici 2 vidljiv je produkt umnažanja probe Nrs^R pomoću PCR-a, pri čemu je u reakciji bio prisutan dUTP-DIG. Stoga je molekulska masa ovakvog PCR produkta obilježenog DIG-om nešto veća u odnosu na neobilježeni PCR produkt, te se može zaključiti da je neradioaktivno obilježena proba za ORF gena Nrs^R uspješno sintetizirana. Međutim, u jažici 4 nije bio vidljiv produkt umnažanja PCR-om, pa se može zaključiti da sinteza probe Hyg^R obilježene DIG-om nije bila uspješna. Mogući razlog tome je prevelika koncentracija dUTP-DIG nukleotida u PCR reakcijskoj smjesi, koja onemogućava uspješno obilježavanje nešto dužih PCR fragmenata (ORF gena Hyg^R otprilike je dvostruko duži od ORF-a gena Nrs^R). Moguće je da je za uspješnu sintezu i obilježavanje probe Hyg^R potrebno optimirati koncentraciju dUTP-DIG u reakcijskoj smjesi za PCR, ali to nije bilo provedeno u sklopu ovog rada.

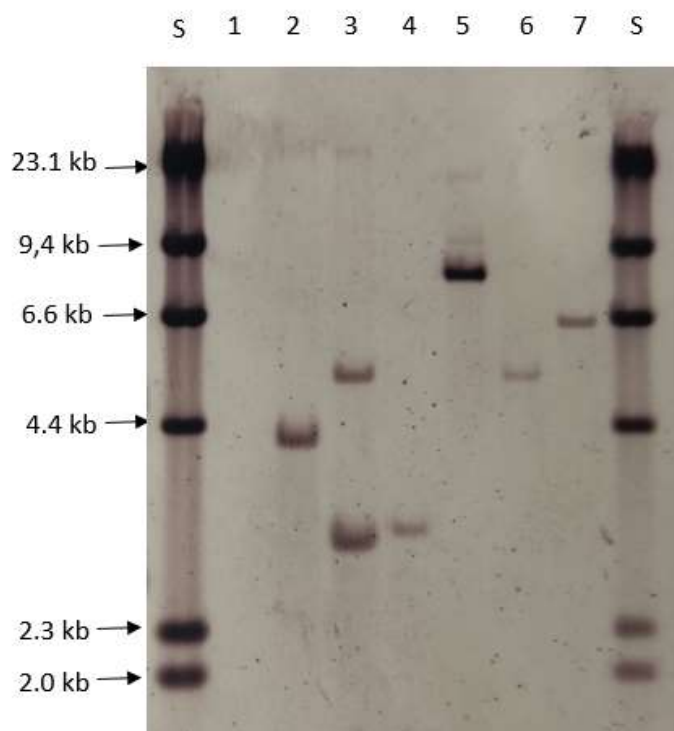
Za molekularnu analizu transformanata kvasca *S. stipitis* korištena je proba Nrs^R obilježena DIG-om, koja je sintetizirana u ovom radu te proba Hyg^R obilježena DIG-om, koja je sintetizirana tijekom ranijih istraživanja u Laboratoriju, a koja je također komplementarna ORF-u gena Hyg^R.

4.3. Molekularna analiza transformanata kvasca *S. stipitis* hibridizacijom DNA metodom po Southernu

Hibridizacija DNA metodom po Southernu provedena je u svrhu detektiranja onih fragmenata DNA na koje se odgovarajuća DIG-obilježena proba može komplementarno vezati. Nakon gel-elektroforeze pocijepane kromosomske DNA kvasaca, proveden je vakuum transfer s gelova na membrane. Svaka membrana hibridizirana je sa specifičnom probom i provedena je detekcija (postupci opisani u poglavlju 3.2.9.). Na slikama 9 i 10 prikazani su rezultati molekularne analize transformanata hibridizacijom DNA po Southernu.



Slika 9. Fragmenti detektirani na membrani hibridiziranoj s probom Hyg^R. Raspored uzoraka na gelu: 1 - netransformirani soj, 2-7 - analizirani transformanti, S - 100 ng DNA bakteriofaga λ pocijepane s HindIII



Slika 10. Fragmenti detektirani na membrani hibridiziranoj s probom Nrs^R. Raspored uzoraka na gelu: 1 - netransformirani soj, 2-7 - analizirani transformanti, S - 100 ng DNA bakteriofaga λ pocijepane s HindIII

Veličine detektiranih fragmenata u uzorcima procjenjuju se na temelju usporedbe sa standardom za koji je korištena DNA bakteriofaga λ pocijepana s endonukleazom HindIII. Uzorak 1 (netransformirani soj) očekivano ne daje signal, niti u slučaju hibridizacije s probom Nrs^R, niti u slučaju hibridizacije s probom Hyg^R.

Na slici 9 u uzorcima 2, 3, 4, 5, 6 i 7 vidljive su po dvije vrpce različitih veličina u svakom uzorku. Ova membrana hibridizirana je s probom Hyg^R, koja je komplementarna ORF-u gena za rezistenciju na higromicin na transformirajućoj DNA 1. Budući da enzim PshAI ovu transformirajuću DNA cijepa jednom, i to unutar ORF-a gena za rezistenciju (slika 1), očekivano je da su na membrani vidljive dvije vrpce. Minimalne veličine detektiranih fragmenata koje je moguće dobiti cijepanjem s PshAI iznose 0,9 kb i 5,9 kb. Sve vidljive vrpce veće su od navedenih vrijednosti.

Na slici 10 u uzorcima 2, 4, 5, 6 i 7 očekivano je detektiran samo jedan fragment različitih veličina. Ova membrana hibridizirana je s probom Nrs^R, koja je komplementarna ORF-u gena za rezistenciju na nurseotricin na transformirajućoj DNA 2. Enzim EcoRV ovu transformirajuću DNA cijepa na tri mjesta, ali izvan ORF-a gena za nurseotricinsku rezistenciju (slika 2). To znači da se proba specifično mogla vezati samo na jedan fragment i dati signal. U uzorku 3 neočekivano su detektirana 2 signala. Ovaj rezultat sugerira da su u ovom transformantu ugrađene dvije molekule transformirajuće DNA 2 u dva nasumična mjesta u genomu. Sve vrpce veće su od minimalne očekivane veličine, koja iznosi 2,2 kb.

Fragmenti detektirani na svakoj membrani nasumičnih su veličina čime je dokazana ilegitimna integracija, odnosno obje transformirajuće DNA ugradile su se na nasumičnim mjestima u genomu kvasca. Zbog toga je nakon restrikcije s odgovarajućim enzimom nemoguće dobiti jednake fragmente u svakom uzorku na pojedinoj membrani. Ova vrsta integracije je očekivana jer niti jedna transformirajuća DNA ne sadrži regije homologne regijama u kvašćevu genomu.

5. ZAKLJUČAK

Hibridizacijom DNA metodom po Southernu utvrđeno je da svi transformanti sadrže obje linearne transformirajuće molekule DNA integrirane ilegitimno, odnosno na nasumičnim mjestima u kvašćevu genomu.

6. POPIS LITERATURE

- Blazeck J, Liu L, Redden H, Alper H (2011) Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach. *Appl Environ Microbiol* **77**, 7905–7914. <https://doi.org/10.1128/AEM.05763-11>
- Cao M, Gao M, Lopez-Garcia CL, Wu Y, Seetharam AS, Severin AJ, i sur. (2017) Centromeric DNA Facilitates Nonconventional Yeast Genetic Engineering. *ACS Synth Biol* **6**, 1545–1553. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00046>
- Choo JH, Han C, Kim JY, Kang HA (2014) Deletion of a KU80 homolog enhances homologous recombination in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett* **36**, 2059–2067. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1576-4>
- Harner NK, Wen X, Bajwa PK, Austin GD, Ho CY, Habash MB, i sur. (2015) Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **42**, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1535-z>
- Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science (80-)* **327**, 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
- Iwaki A, Kawai T, Yamamoto Y, Izawa S (2013) Biomass conversion inhibitors furfural and 5-hydroxymethylfurfural induce formation of messenger RNP granules and attenuate translation activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **79**, 1661–1667. <https://doi.org/10.1128/AEM.02797-12>
- Janbandhu VC, Moik D, Fässler R (2014) Cre recombinase induces DNA damage and tetraploidy in the absence of LoxP sites. *Cell Cycle* **13**, 462–470. <https://doi.org/10.4161/cc.27271>
- Jeffries TW, Van Vleet JRH (2009) *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res* **9**, 793–807. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00525.x>
- Juretzek T, Wang HJ, Nicaud JM, Mauersberger S, Barth G (2000) Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of β -galactosidase in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioprocess Eng* **5**, 320–326. <https://doi.org/10.1007/BF02942206>
- Kooistra R, Hooykaas PJJ, Steensma HY (2004) Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **21**, 781–792. <https://doi.org/10.1002/yea.1131>

- Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, Dueber JE (2015) A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth Biol* **4**, 975–986. <https://doi.org/10.1021/sb500366v>
- Löbs AK, Schwartz C, Wheeldon I (2017) Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. *Synth Syst Biotechnol* **2**, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.002>
- Maassen N, Freese S, Schruff B, Passoth V, Klinner U (2008) Nonhomologous end joining and homologous recombination DNA repair pathways in integration mutagenesis in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *FEMS Yeast Res* **8**, 735–743. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00383.x>
- Mohd Azhar SH, Abdulla R, Jambo SA, Marbawi H, Gansau JA, Mohd Faik AA, i sur. (2017) Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem Biophys Reports* **10**, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Müller S, Sandal T, Kamp-Hansen P, Dalbøge H (1998) Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, 1267–1283. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199810\)14:14<1267::AID-YEA327>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199810)14:14<1267::AID-YEA327>3.0.CO;2-2)
- Näätsaari L, Mistlberger B, Ruth C, Hajek T, Hartner FS, Glieder A (2012) Deletion of the *pichia pastoris* ku70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS One* **7**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039720>
- Navarrete C, L. Martínez J (2020) Non-conventional yeasts as superior production platforms for sustainable fermentation based bio-manufacturing processes. *AIMS Bioeng* **7**, 289–305. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2020024>
- Patra P, Das M, Kundu P, Ghosh A (2021) Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnol Adv* **47**, 107695. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695>
- Petravić Tominac V, Tolvajčić M, Stanzer D, Mrvčić J, Šantek B (2017) Kvasci za proizvodnju bioetanola iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina. *Glas zaštite bilja* **40**, 24–33. <https://doi.org/10.31727/gzb.40.5.3>

- Rajkumar AS, Özdemir E, Lis A V., Schneider K, Qin J, Jensen MK, i sur. (2019) Engineered Reversal of Function in Glycolytic Yeast Promoters. *ACS Synth Biol* **8**, 1462–1468. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00027>
- Ramakrishnan K, Prattipati M, Samuel P, Sankaranarayanan M (2020) Transcriptional control of gene expression in *Pichia pastoris* by manipulation of terminators. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 7841–7851. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10785-8>
- Raschmanová H, Weninger A, Glieder A, Kovar K, Vogl T (2018) Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. *Biotechnol Adv* **36**, 641–665. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.006>
- Ruchala J, Kurylenko OO, Dmytruk K V., Sibirny AA (2020) Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). *J Ind Microbiol Biotechnol* **47**, 109–132. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02242-x>
- Schwartz C, Shabbir-Hussain M, Frogue K, Blenner M, Wheeldon I (2017) Standardized Markerless Gene Integration for Pathway Engineering in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol* **6**, 402–409. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00285>
- Thorwall S, Schwartz C, Chartron JW, Wheeldon I (2020) Stress-tolerant non-conventional microbes enable next-generation chemical biosynthesis. *Nat Chem Biol* **16**, 113–121. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0452-x>
- Vernis L, Poljak L, Chasles M, Uchida K, Casarégola S, Käs E, i sur. (2001) Only centromeres can supply the partition system required for ARS function in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Biol* **305**, 203–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4300>
- Vogl T, Hartner FS, Glieder A (2013) New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* **24**, 1094–1101. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.024>
- Wagner JM, Alper HS (2016) Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genet Biol* **89**, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.001>
- Yarmolinsky M, Hoess R (2015) The Legacy of Nat Sternberg: The Genesis of Cre-lox Technology. *Annu Rev Virol* **2**, 25–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-054930>

Izjava o izvornosti

Ja, Martina Merdžo, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Martina Merdžo

Vlastoručni potpis