

Genetička transformacija kvasca *Spathaspora passalidarum*

Smolec, Lea

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:664227>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-16**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Lea Smolec
0119058338**

GENETIČKA TRANSFORMACIJA KVASCA *Spathaspora passalidarum*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

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

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Genetička transformacija kvasca *Spathaspora passalidarum*

Lea Smolec, 0119058338

Sažetak: Nekonvencionalni kvasci su sve vrste kvasaca izuzev *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, dvije vrste koje se najčešće koriste u industriji. Mnogi nekonvencionalni kvasci imaju sposobnost metaboliziranja širokog spektra supstrata, proizvodnje specifičnih relevantnih sekundarnih metabolita, te često pokazuju veću otpornost na stresne uvjete kao što su visoke temperature, osmotski pritisak, prisutnost toksičnih tvari ili ekstremne pH vrijednosti. Jedna od biotehnološki najznačajnijih karakteristika nekonvencionalnog kvasca *Spathaspora passalidarum* je da zahvaljujući specifičnim genima i biosintetskim putevima može fermentirati ksilozu, šećer prisutan u lignoceluloznoj biomasi. Kako bi se iskoristio potencijal nekonvencionalnih kvasaca te unaprijedile njihove karakteristike, neophodno je moći ih genetički modificirati. Stoga, je cilj ovog rada bio transformirati kvasac *Spathaspora passalidarum* sa različitim transformirajućim molekulama DNA, te ispitati aktivnost ishodišta replikacije iz različitih vrsta kvasaca korištenjem plazmidnih vektora. Postupak transformacije proveden je metodom elektroporacije koja je prethodno razvijena za kvasac *Brettanomyces bruxellensis*, a dobiveni rezultati pokazali su da se najviša efikasnost transformacije postiže sa plazmidom koji sadrži ishodište replikacije iz kvasca *Scheffersomyces stipitis*.

Ključne riječi: nekonvencionalni kvasci, kvasac *Spathaspora passalidarum*, genetička transformacija, elektroporacija, plazmidni vektori

Rad sadrži: 29 stranica, 7 slika, 2 tablice, 36 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: Angela Matanović, mag. ing.

Datum obrane: 10. rujna 2024.

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

Genetic Transformation of the Yeast *Spathaspora passalidarum*

Lea Smolec, 0119058338

Abstract: Nonconventional yeasts include all yeast species except *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, the two most commonly used species in industry. Many nonconventional yeasts have the ability to metabolize a wide range of substrates, produce specific relevant secondary metabolites, and often show greater resistance to stressful conditions such as high temperatures, osmotic pressure, the presence of toxic substances or extreme pH values. One of the most biotechnologically significant characteristics of the nonconventional yeast *Spathaspora passalidarum* is that, thanks to specific genes and biosynthetic pathways, it can ferment xylose, the sugar present in lignocellulosic biomass. To harness the potential of nonconventional yeasts and improve their characteristics, it is essential to be able to genetically modify them. Therefore, the aim of this work is to transform the yeast *Spathaspora passalidarum* with different transforming DNA molecules and to examine the activity of replication origins from various yeast species using plasmid vectors. The transformation process was carried out using the electroporation method previously developed for the yeast *Brettanomyces bruxellensis*, and the obtained results showed that the highest transformation efficiency is achieved with the plasmid containing the replication origin from the yeast *Scheffersomyces stipitis*.

Keywords: Unconventional yeasts, *Spathaspora passalidarum* yeast, genetic transformation, electroporation, plasmid vectors.

Thesis contains: 29 pages, 7 figures, 2 tables, 36 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Associate Professor Ivan-Krešimir Svetec, PhD

Technical support and assistance: Angela Matanović, mag. ing.

Thesis defended: September 10, 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. NEKONVENCIONALNI KVASCI I NJIHOVA VAŽNOST U BIOTEHNOLOGIJI ...	3
2.2. KVASAC <i>SPATHASPORA PASSALIDARUM</i>	4
2.3. METODE GENETIČKE TRANSFORMACIJE KVASCA	5
2.3.1. GENETIČKA TRANSFORMACIJA I CILJANA MODIFIKACIJA NEKONVENCIONALNIH KVASACA	5
2.3.2. METODE GENETIČKE TRANSFORMACIJE.....	6
2.3.3. METODA PROTOPLASTIRANJA	7
2.3.4. METODA POMOĆU LITIJEVOG ACETATA	7
2.3.5. TRANSFORMACIJA POMOĆU STAKLENIH KUGLICA	8
2.3.6. ELEKTROPORACIJA.....	8
2.3.7. BIOLISTIČKA TRANSFORMACIJA	9
2.3.8. TRANSFORMACIJA POMOĆU BAKTERIJA IZ RODA <i>AGROBACTERIUM</i>	9
2.4. PLAZMIDNI VEKTORI U GENETIČKOM INŽENJERSTVU.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. MIKROORGANIZMI.....	12
3.1.2. PLAZMIDI.....	12
3.1.3. RESTRIKCIJSKI ENZIMI	14
3.1.4. HRANJIVE PODLOGE	14
3.1.5. OTOPINE	14
3.1.6. KEMIKALIJE I ENZIMI	15
3.2. METODE.....	16
3.2.1. UZGOJ KVASCA <i>S. PASSALIDARUM</i>	16
3.2.2. GEL ELEKTROFOREZA	17
3.2.3. IZOLACIJA FRAGMENTA DNA IZ AGAROZNOG GELA.....	17
3.2.4. CIJEPANJE DNA RESTRIKCIJSKIM ENZIMIMA.....	17
3.2.5. TRANSFORMACIJA KVASCA ELEKTROPORACIJOM.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. RESTRIKCIJSKA ANALIZA	19
4.2. PRIPREMA TRANSFORMIRAJUĆE DNA.....	20

4.3. TRANSFORMACIJA KVASCA <i>SPATHASPORA PASSALIDARUM</i>	21
5. ZAKLJUČAK	25
6. POPIS LITERATURE	26

1. UVOD

Kvasci su eukariotski, jednostanični mikroorganizmi klasificirani kao članovi carstva gljiva. Imaju široku primjenu u svim područjima biotehnologije prvenstveno zbog njihove sposobnosti post-translacijske modifikacije, jednostavne genetičke manipulacije, jeftinog uzgoja i brzog rasta. Upotreba kvasca u biotehnološkim procesima vrlo je široka, a kako bi se kvasci što bolje prilagodili zahtjevima pojedinih bioprocasa, često ih je potrebno i optimizirati na genetičkoj razini.

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* najbolje je istražen eukariotski organizam, te vrlo čest mikroorganizam u brojnim bioprocima. Kvasac *S. cerevisiae* omogućuje istraživanje gotovo svih staničnih bioloških procesa prisutnih kod eukariota. Također, širokoj primjeni ovog kvasca doprinosi i jednostavno uvođenje preciznih modifikacija u njegov genom klasičnim metodama genetičkog inženjerstva koje se osnivaju na unošenju transformirajuće DNA u stanicu i njenoj homolognoj rekombinaciji s genomom. Biotehnološka važnost kvasca *S. cerevisiae* leži i u njegovim jedinstvenim biološkim karakteristikama, tj. njegovoj sposobnosti fermentacije, praćenju proizvodnjom alkohola i CO_2 , kao i njegovoj otpornosti na nepovoljne okolišne uvjete (Parapouli i sur., 2020). Međutim, osim navedenih pozitivnih karakteristika, kvasac *S. cerevisiae* ima i pojedine nedostatke, odnosno nije prikladan za uspostavu održivih bioprocasa baziranih na lignoceluloznim sirovinama, te nema sposobnost metaboliziranja ksiloze koja može činiti i do 20 % suhe tvari lignocelulozne biomase (Liu, 2006; Mittelman i Barkai, 2017). Predtretman lignoceluloznog otpada dovodi do oslobađanja inhibitora koji negativno utječu na rast i fermentaciju kvasca *S. cerevisiae*, a isto tako on nema sposobnost rasta na visokim temperaturama koje pogoduju simultanoj saharifikaciji i fermentaciji supstrata u bioetanol (Ndubuisi i sur., 2023). Nekonvencionalne vrste kvasca, a u tu skupinu spadaju svi drugi kvasci izuzev *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, poput *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Spathaspora passalidarum* predstavljaju potencijalna rješenja za ove probleme zbog njihove sposobnosti da fermentiraju i heksozne i pentozne šećere, te da toleriraju visoke temperature i stresne uvjete prisutne tijekom proizvodnje etanola iz lignoceluloznih hidrolizata.

Nekonvencionalni kvasac *Spathaspora passalidarum* može koristiti i fermentirati ksilozu, a bolje razumijevanje molekularnih mehanizama koji reguliraju asimilaciju ksiloze u kvascima s takvom sposobnošću može omogućiti uklanjanje određenih prepreka u proizvodnji biogoriva i razvoj drugih industrijskih sojeva, a sve sa ciljem da se poveća dostupnost obnovljivih proizvoda biogoriva iz poljoprivredne biomase.

Kako bi se proširila upotreba nekonvencionalnih kvasaca u biotehnološkim procesima,

poželjno je moći mijenjati njihove karakteristike primjenom genetičkog inženjerstva što podrazumijeva mogućnost transformacije kvasca stranom DNA. Također, od velike važnosti je i primjena različitih replikativnih vektora, uz stabilnu razinu ekspresije odabranih gena. Stoga, je cilj ovog rada transformirati kvasac *Spathaspora passalidarum* sa različitim transformirajućim molekulama DNA, te ispitati aktivnost ishodišta replikacije iz različitih vrsta kvasaca korištenjem plazmidnih vektora.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NEKONVENCIONALNI KVASCI I NJIHOVA VAŽNOST U BIOTEHNOLOGIJI

Moderni biotehnološki pristupi koji bi mogli omogućiti korištenje alternativnih obnovljivih izvora biogoriva privlače sve više pažnje istraživača. Jedan od takvih rastućih biotehnoloških trendova jest fermentacija poljoprivrednog otpada bogatog šećerom s ciljem proizvodnje bioetanolu pomoću konvencionalnih ili nekonvencionalnih kvasaca (Selim i sur., 2020). Prednosti kvasaca u odnosu na bakterije su ti što kvasac raste na jednostavnijim i jeftinijim podlogama, nema rizika od kontaminacije kulture bakteriofagima, a i bolje raste pri niskim pH vrijednostima u bioreaktorima.

Nekonvencionalnim se kvascima smatraju sve vrste kvasaca osim *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, vrsta koje se tisućljećima koriste u biotehnološkim procesima (Spencer i sur., 2002). Mnogi nekonvencionalni kvasci mogu rasti i fermentirati u širokom rasponu procesnih uvjeta, odnosno pokazuju karakteristike poput termotolerantnosti, halotolerantnosti i osmotolerantnost, isto tako otporni su i na visoke koncentracije inhibitora rasta i fermentacije. Osim glukoze, mogu koristiti veliki broj izvora ugljika prisutnih u obnovljivim sirovinama poput; monosaharida (fruktoza, arabinoza), disaharida (laktoza) pa čak i polisaharida (celuloza).

Važnu skupinu nekonvencionalnih kvasaca čine CTG kvasci specifični po tome što kodon CUG transliraju u serin, umjesto u leucin. Ovaj alternativni genetički kod otkriven je 1995. godine u kvascu *Candida albicans* (Santos i Tuite, 1995) nakon čega je pronađen i u većini ostalih kvasaca iz roda *Candida*, ali i kod nekih vrsta iz drugih rodova (Gomes i sur., 2011; Turner i Butler, 2014).

Osim navedenih prednosti, neke vrste nekonvencionalnih kvasaca pokazale su se iznimno pogodnim za proizvodnju rekombinantnih proteina za razliku od najčešće korištenog kvasca *S. cerevisiae* i to zato što ne dolazi do prekomjerne glikozilacije proteina tijekom posttranslacijskih modifikacija (Stöckmann i sur., 2009). Zahvaljujući navedenim karakteristikama i nedavnoj tehnološkoj revoluciji u smislu sintetske biologije, sekvencioniranja genoma i razvoja metode CRISPR/Cas9 za editiranje genoma, nekonvencionalni kvasci predstavljaju obećavajuću alternativu u suvremenim biotehnološkim istraživanjima.

2.2. KVASAC *Spathaspora passalidarum*

Kvasac *Spathaspora passalidarum* prva je identificirana vrsta roda *Spathaspora*, a izoliran je iz crijeva drvoreznih kornjaša 2006. godine. Reproducira se aseksualno pupanjem; njegove askospore su izdužene dok su njegove vegetativne stanice uglavnom kuglastog oblika i sužavaju se na krajevima s membranom koja prolazi duž uzdužne osi spore. Genom kvasca *Spathaspora passalidarum* veličine je približno 16 milijuna parova baza, a sadrži oko 6000 gena, što je usporedivo i s drugim kvascima.

Jedna od najznačajnijih karakteristika kvasca *S. passalidarum* je da zahvaljujući specifičnim genima i biosintetskim putevima koji su manje učinkoviti ili uopće nisu prisutni kod drugih vrsta kvasaca poput *S. cerevisiae*, može fermentirati ksilozu, šećer prisutan u lignoceluloznoj biomasi. Genom kvasca *S. passalidarum* sadrži gene koji kodiraju za enzim ksiloza reduktaza i ksilitol dehidrogenaza koji konvertiraju ksilozu u ksilozu, intermedijer koji ulazi u središnji metabolizam.

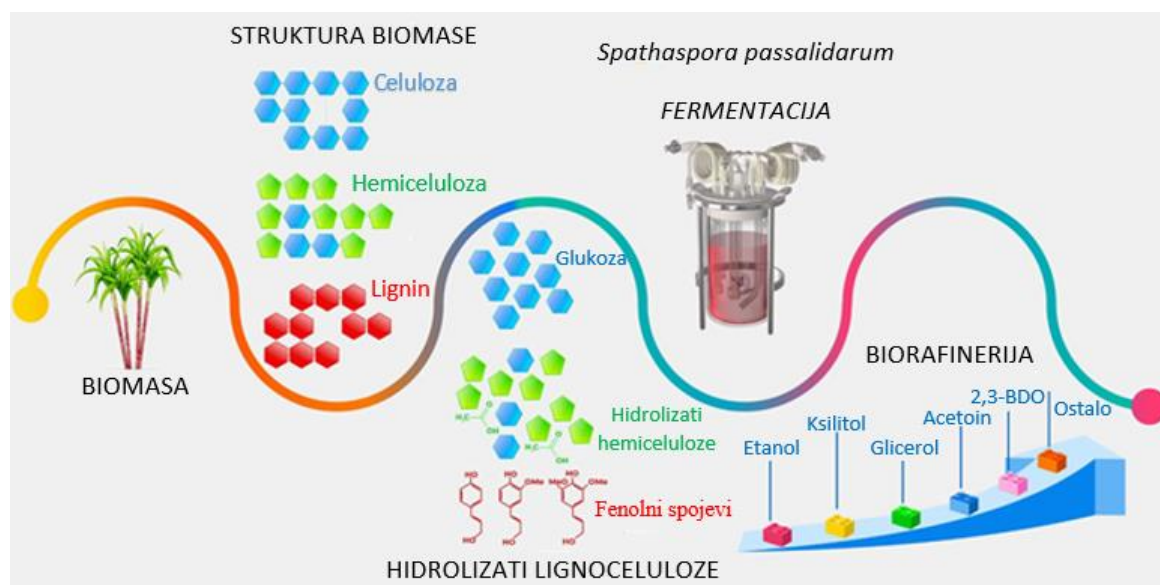
U metabolizmu pentoze pomoću kvasca *S. passalidarum*, ksiloza se reducira u ksilitol djelovanjem NADPH- ovisnog enzima, koji se zatim oksidira u ksilozu djelovanjem NAD⁺ - ovisnog enzima. Akumulacija ksilitola događa se u uvjetima kada se nedovoljna koncentracija NAD⁺ regenerira tijekom fermentacije.

Osim svoje neobične sposobnosti prirodne proizvodnje etanola iz pentoz, ovaj mikroorganizam može se koristiti i za dobivanje drugih proizvoda od interesa kao što su ksilitol, glicerol, aceton i 2,3-butandiol (Martinez-Jimenez i sur., 2021).

Pored etanola i ksilitola, *S. passalidarum* također se koristi i za proizvodnju 2,3-butandiola. Ovaj proizvod vrlo je važan zbog svoje primjene u proizvodnji polimera i goriva. Visoka ogrijevna vrijednost 2,3-butandiola i sposobnost povećanja oktanskog broja goriva čine ga perspektivnim "drop-in" gorivom, odnosno gorivom koje se može koristiti kao zamjena za fosilna goriva bez potrebe za skupim modifikacijama motora (Białkowska, 2016; Kargbo i sur., 2021).

Unapređenja u učinkovitosti fermentacije kod kvasca *S. passalidarum* otvaraju put za genetičko inženjerstvo konvencionalnih i nekonvencionalnih kvasaca za fermentaciju heksoza i pentoz u hemiceluloznim hidrolizatima. Fermentacija ksiloze ključna je za biokonverziju lignocelulozних biomasa u biogoriva i kemikalije, stoga genomi prirodnih nekonvencionalnih kvasaca poput *S. passalidarum* koji fermentiraju ksilozu imaju i veliku važnost jer njihove genetičke karakteristike i regulacijski obrasci mogu poslužiti i kao izvor gena i metaboličkih

puteva nužnih za daljnji razvoj sojeva kvasaca poput *S. cerevisiae* koji ne mogu prirodno fermentirati ksilozu. Kvasac *S. passalidarum* može se smatrati genetičkom škrinjom s blagom kada je riječ o genima povezanim sa metabolizmom ksiloze te za poboljšanjem proizvodnje bioetanola (Selim i sur., 2020).



Slika 1: *Spathaspora passalidarum* u integriranom konceptu biorafinerije za proizvodnju kemikalija i biogoriva iz lignocelulozne biomase (Martinez-Jimenez i sur., 2021).

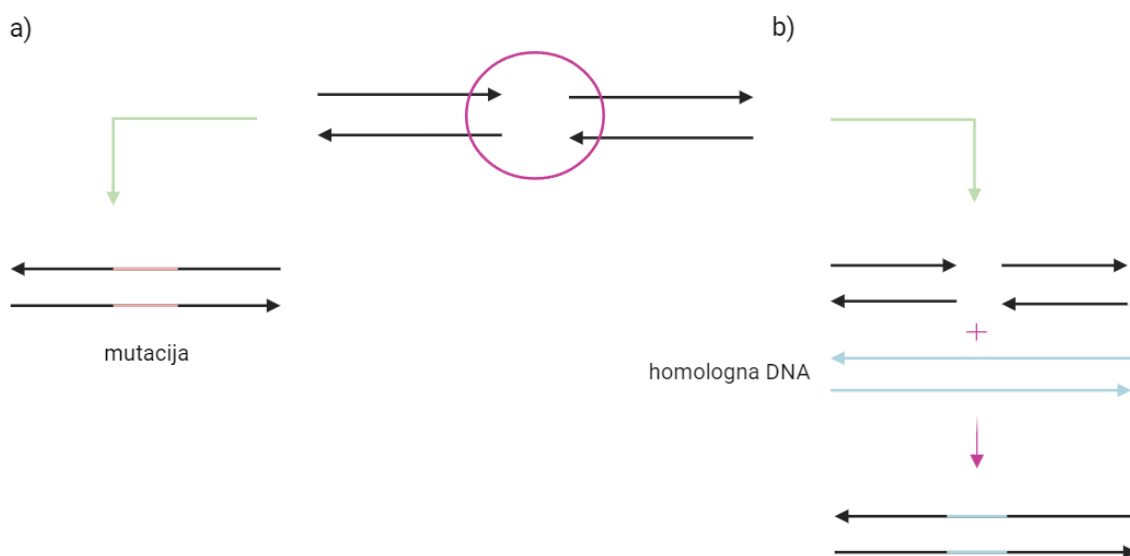
2.3. METODE GENETIČKE TRANSFORMACIJE KVASCA

2.3.1. Genetička transformacija i ciljana modifikacija nekonvencionalnih kvasaca

Kako bi se iskoristio potencijal nekonvencionalnih kvasaca te unaprijedile njihove karakteristike, neophodno je moći ih genetički modificirati. Genetička modifikacija nekonvencionalnih kvasaca kompleksnija je u odnosu na genetičku modifikaciju konvencionalnih kvasaca poput *S. cerevisiae* zbog slabije istraženog genoma, ali i zbog toga što se u većini do sada otkrivenih nekonvencionalnih kvasaca dvolančani lom u DNA popravljaju prvenstveno nehomolognim, ilegitimnim spajanjem krajeva.

Ciljane genetičke modifikacije odnose se na precizne promjene koje se uvode u specifične gene ili regije genoma organizma, a uključuju ciljane delecije, disrupcije i integracije gena te točkaste mutacije. Integracija heterolognih gena i metode inaktivacije gena (engl. *knockout*) temelje se na endogenim mehanizmima popravka dvolančanih lomova DNA, odnosno

homolognoj rekombinaciji (HR) i ilegitimnoj rekombinaciji (NHEJ). Homologna rekombinacija predstavlja proces u kojem dolazi do razmjene genetičkog materijala između homolognih DNA sekvenci, a samim time omogućava ciljanu modifikaciju genoma te osigurava stabilnost integriranih gena. S druge strane, ilegitimna rekombinacija uključuje razmjenu DNA između nehomolognih sekvenci, odnosno nije ovisna o homologiji između sekvenci DNA te se obično događa na slučajnim lokacijama u genomu, što može uzrokovati neželjene promjene fenotipa soja te varijabilnu ekspresiju heterolognog gena. Kod kvasca *S. cerevisiae* preferirani mehanizam je homologna rekombinacija koja omogućava mjesno-specifične modifikacije, međutim većina nekonvencionalnih vrsta kvasaca preferira ilegitimnu rekombinaciju kao primarni mehanizam popravka DNA zbog čega su za pojedine vrste razvijene različite strategije za pospješivanje homologne rekombinacije (Löbs i sur., 2017).



Slika 2: Shematski prikaz ilegitimne i homologne rekombinacije. (a) Ilegitimna rekombinacija (engl. *Non-homologous end joining, NHEJ*), (b) homologna rekombinacija (HR).

2.3.2. Metode genetičke transformacije

Pod pojmom genetička transformacija podrazumjeva se postupak unošenja DNA u stanicu što rezultira promjenom genotipa i fenotipa transformirane stanice. Postupak genetičke transformacije primjenjuje se u genetičkom inženjertsvu, a od iznimnog je značaja u

biotehnologiji jer omogućava konstrukciju sojeva koji se koriste kao radni mikroorganizmi u biotehnološkim procesima. Metode genetičke transformacije su; metoda protoplastiranja, metoda pomoću litijevog acetata, transformacija pomoću staklenih kuglica, elektroporacija, biolistička transformacija, te transformacija pomoću bakterija iz roda *Agrobacterium*. Također, za transformaciju nekonvencionalnih vrsta kvasaca sve više se primjenjuje i tehnologija CRISPR/Cas9, jedinstvena tehnologija koja omogućuje uređivanje dijelova genoma uklanjanjem, dodavanjem ili izmjenom dijelova DNA sekvence (Redman i sur., 2016).

2.3.3. Metoda protoplastiranja

Metoda transformacije protoplasta uključuje enzimsku razgradnju stanične stijenke, unos egzogene DNA uz dodatak polietilen glikola (PEG) te CaCl_2 te ponovnu regeneraciju stanične stijenke (Burgers i Percival, 1987). Ove stanice su pogodnije za genetičku transformaciju jer se njima može lakše manipulirati, a samim time u njih se mogu lakše unijeti strani geni. Efikasnost transformacije metodom protoplastiranja značajno ovisi o samoj koncentraciji protoplasta, vrsti egzogene DNA te trajanju enzimske razgradnje. Burgers i Percival (1987) zabilježili su najveću efikasnost transformacije koja je postignuta ovom metodom, a iznosila je od 3×10^6 do 4×10^7 transformanata/ μg DNA, odnosno pokazali su kako se najviša efikasnost transformacije postiže uz niže koncentracije stanica i visoke koncentracije enzima kako bi se u što kraćem periodu razgradile stanične stijenke kod većine tretiranih stanica. Pretpostavlja se da je ovako velika efikasnost rezultat dodatka „carrier“ DNA, odnosno velike količine netransformirajuće DNA (iz telećeg timusa ili *E. coli*), koja vjerojatno štiti plazmidnu DNA od nukleaza, međutim njena uloga još nije potpuno poznata (Kawai i sur., 2010). Prednost ove metode je to što ne zahtjeva posebnu opremu, a prikladna je za transformaciju stanica s velikim molekulama DNA, međutim rijetko se primjenjuje zbog osjetljivog procesa razgradnje i regeneracije stanične stijenke. Razvojem drugih metoda transformacije, metoda protoplastiranja danas se uglavnom koristi za transformaciju umjetnim kvašćevim kromosomom te transformaciju infektivnim česticama, prionima (Gietz i Woods, 2001; Kawai i sur., 2010).

2.3.4. Metoda pomoću litijevog acetata

Većina laboratorija koji rade s kvascima koriste metodu pomoću litijevog acetata (LiAc), zbog njene vrlo visoke efikasnosti, brzine i jednostavnosti (Gietz i Woods, 2001). Ito i sur. (1983)

pokazali su da je moguće transformirati cjelovite stanice kvasca pomoću jednovalentnih kationa poput Na⁺, Rb⁺, Cs⁺, K⁺ i Li⁺, te da najveću efikasnost transformacije pokazuje korištenje Li⁺ kationa. Također pokazano je da Li⁺ kationi u kombinaciji s PEG-om stimuliraju unos plazmidne DNA u stanice kvasca za razliku od dvovalentnih kationa koji imaju veliki utjecaj za transformaciju bakterije *E. coli* ali nemaju gotovo nikakav utjecaj za transformaciju kvasaca. Poznato je da PEG, dodatak LiAc i toplinski šok povećavaju efikasnost transformacije, te da se najefikasnije transformiraju stanice u srednjoj logaritamskoj fazi rasta. Prednost ove metode je vrlo visoka efikasnost, niska cijena opreme i materijala te činjenica da se stanice nakon transformacije ne moraju nacijepiti na agar za regeneraciju.

2.3.5. Transformacija pomoću staklenih kuglica

Ova metoda, zajedno sa metodom elektroporacije ubraja se u fizikalne metode transformacije, a odnosi se na brzo miješanje sa staklenim kuglicama u prisutnosti „carrier“ i plazmidne DNA (Gurpilhares, 2006). Mješavina željene DNA i sterilnih staklenih kuglica promjera oko 0,45 mm vorteksira se na maksimalnoj brzini od 100 m/s u periodu od 15 do 45 sekundi pri čemu DNA prodire kroz stanicu. Nakon završetka postupka stanice se nacjepljuju na selektivnu podlogu koja sadrži 1M sorbitol. Transformacija pomoću staklenih kuglica je brza, jednostavna, efikasna i jeftina metoda jer ne zahtijeva korištenje sofisticiranih uređaja te ne zahtijeva nikakve kemijske tretmane i enzime (Rivera i sur., 2014). Ova metoda konkurira transformaciji elektroporacijom za najbržu metodu, međutim ima vrlo nisku efikasnost transformacije zbog učestalog oštećenja DNA te smanjenja vijabilnosti stanica (Rivera i sur., 2014).

2.3.6. Elektroporacija

Elektroporacija je najčešće korištena fizikalna metoda za transformaciju stanica funga, zbog svoje jednostavnosti, brzine i efikasnosti. Transformacija stanica kvasca elektroporacijom temelji se na izlaganju stanica električnom pulsus visoke voltaže. Djelovanjem izmjeničnog ili pulsirajućeg električnog polja pojačava se stvaranje pora izmjenjivanjem polarnosti membrane i time se omogućuje ulazak makromolekula u stanice (Rivera i sur., 2014). Na efikasnost ove metode utječu brojni parametri poput jakosti električnog polja, otpor, električni kapacitet, te način pripreme stanica. Svaki od ovih parametara mora se prilagoditi ovisno o vrstama i sojevima koji se izlažu postupku transformacije kako bi se postigla maksimalna efikasnost postupka. Stanice u logaritamskoj fazi se ovom metodom transformiraju 10 puta efikasnije

nego stanice u stacionarnoj fazi (Meilhoc i sur., 1990). Prednost ove metode je to što je izrazito brza i efikasna u odnosu na prethodno navedene metode, međutim zahtjeva vrlo složene protokole za regeneraciju stanica nakon provedene genetičke transformacije.

2.3.7. Biolistička transformacija

Biolistička transformacija, također poznata kao tehnika bombardiranja česticama, česta je metoda genetičke transformacije koja se primjenjuje kod mnogih vrsta uključujući bakterije, funge pa čak i životinjske stanice. Ova metoda temelji se na direktnom unosu fragmenta DNA u stanicu pomoću čestica teškog metala (zlata ili volframa) obloženih s DNA, korištenjem genskog pištolja (Carter i Shieh, 2015.). Metalne čestice stvaraju rupe u staničnoj stijenci te ulaze u stanice ostavljajući DNA unutar stanice domaćina. Efikasnost transformacije kod ove metode ovisi o nekoliko parametara kao što su količina stanica, temperatura, sposobnost regeneracije stanica, broj mikroprojektila, te kinetička energija čestica, a najefikasnije se transformiraju stanice u stacionarnoj fazi rasta. Prednost biolističke transformacije je ta da ne zahtjeva enzimsko tretiranje staničnih stijenci čime ne dolazi do smanjenja vijabilnosti stanica, također nakon transformacije transformanti se mogu jednostavno propagirati (Rivera i sur., 2014).

2.3.8. Transformacija pomoću bakterija iz roda *Agrobacterium*

Metoda transformacije pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens* primarno je metoda koja se koristi za transformaciju biljnih stanica, ali se njome mogu transformirati i kvasci i plijesni (Hooykas i sur., 2018). *Agrobacterium tumefaciens* je gram-negativna patogena bakterija iz tla koja prirodno inficira oštećena mjesta kod mnogih biljnih vrsta čime uzrokuje tumor vrata korijena. Metoda se temelji na sposobnosti *A. tumefaciens* da prenese dio svoje DNA, koja se naziva T-DNA što dolazi od "transfer" DNA, u eukariotsku stanicu (Zhu i sur., 2000; Zupan i sur., 2000). T-DNA nalazi se na tumor inducirajućem plazmidu (Ti plazmidu) zajedno sa *vir* genima koji su odgovorni za virulentnost, a također omogućuju i prijenos T-DNA u stanicu domaćina. Unošenjem T-DNA u stanicu domaćina dolazi do integracije T-DNA u genom domaćina, a samim time i do ekspresije gena koji se nalaze na T-DNA, što rezultira nekontroliranim rastom biljnih stanica (Mubeen i sur., 2016). Za transformaciju biljaka i gljiva koristi se binarni vektorski sustav u kojem su T-DNA i *vir* regija smještene na različitim plazmidima. „Razorožani“ Ti-plazmid, koji ne sadrži tumor inducirajuće gene, između T-DNA graničnih LB i RB regija umjesto T-DNA sadrži gen koji se prenosi u biljnu stanicu ili stanicu

funga te selektivni biljeg, a pomoćni plazmid sadrži *vir* gene. Kao i kod transformacije biljaka, za transformaciju gljiva se kao selektivni marker koriste geni za rezistenciju na antibiotike i herbicide koji su pod kontrolom promotora aktivnih u organizmu domaćinu (Hooykaas i sur., 2018).

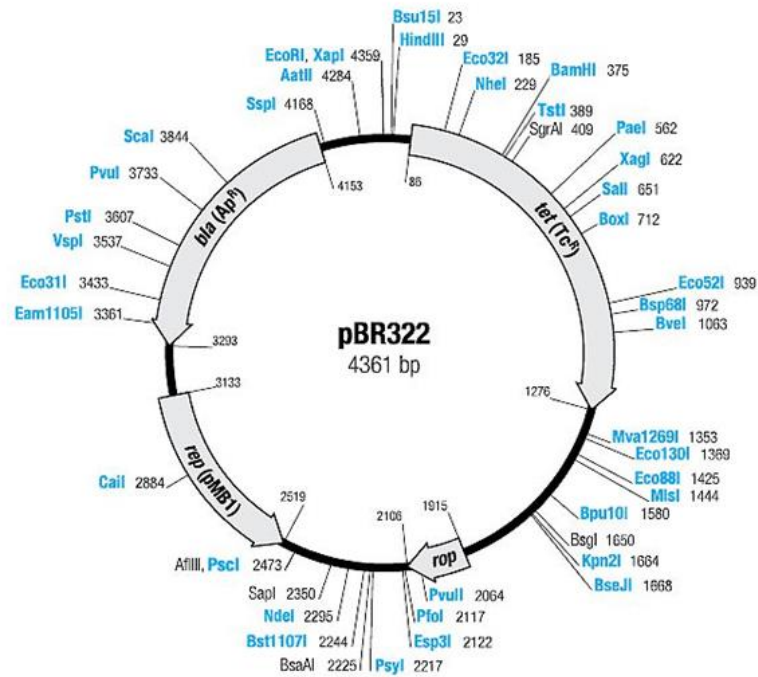
2.4. PLAZMIDNI VEKTORI U GENETIČKOM INŽENJERSTVU

Plazmidi su male kružne ili linearne molekule dvolančane DNA koje se nalaze u bakterijskim stanicama, ali se prirodno pojavljuju i u arheja i eukariota. Plazmidi posjeduju sposobnost samostalne replikacije neovisne o kromosomima zahvaljujući sekvenci *ori*, odnosno ishodištu replikacije. Također mogu sadržavati gene zaslužne za prijenos plazmida u druge stanice, antibiotsku rezistenciju, rezistenciju na teške metale, produkciju toksina i slično (del Solar i sur., 1998). Sposobnost plazmida da se samostalno repliciraju unutar stanice i jednostavnost njihove modifikacije učinile su ih jednim od osnovnih alata u genetičkom inženjerstvu. Plazmidi se mogu koristiti kao vektori za kloniranje i održavanje željenih sekvenca DNA ili kao ekspresijski vektori, a tada takav vektor uključuje promotorske regije i pojačivače kojima se regulira ekspresija željenog gena i omogućava nastanak proteina od interesa.

Ključna uloga vektora u genetičkom inženjerstvu je prijenos genetičkog materijala u stanice. Vektori su nosioci DNA te omogućuju umetanje željenih gena u ciljne stanice kako bi se postignule specifične promjene u genetičkom sastavu organizma. Svi vektori koji se koriste u genetičkom inženjerstvu konstruirani su metodama genetičkog inženjerstva, a potječu od prirodnih molekula DNA. S obzirom na podrijetlo dijele se na: plazmidne vektore, virusne vektore, plazmidno – virusne vektore i umjetne kromosome (BAC, YAC).

Svi plazmidni vektori u svojoj strukturi imaju: ishodište replikacije (*ori*) koja omogućuje replikaciju plazmida unutar stanice; selektivni biljeg, odnosno sekvencije koje omogućavaju selekciju stanica koje sadrže plazmid kao i stanica koje sadrže plazmid sa željenim insertom, a najčešće su to geni koji nose rezistenciju na antibiotik ampicilin (gen *bla*), tetraciklin ili kanamicin. Također, sadrže takozvano višestruko mjesto za kloniranje (eng. MCS – multiple cloning site), odnosno kratku „umjetnu“ sekvenciju veličine oko 50ak parova baza koja sadrži jedinstvena restrikcijska mjesta za 10 do 20 pa čak i više restrikcijskih enzima kako bi se u plazmid ugradio željeni gen, odnosno insert. Okosnica većine kvašćevih vektora koji se danas koriste potječe od plazmidnog vektora pBR322. Ovaj plazmid veličine je 4361 pb, ima bakterijsko ishodište replikacije što omogućava održavanje u velikom broju kopija (regija *rep*), a sadrži i regiju *rop* koja je zaslužna za regulaciju broja kopija plazmida po stanici. Također sadrži gene za rezistenciju na antibiotike tetraciklin i ampicilin, te veliki broj jedinstvenih

restriksijskih mjesta, odnosno mjesta za restriksijske enzime koji ovaj plazmid cijepaju na samo jednom mjestu. Neka od tih jedinstvenih restriksijskih mjesta se nalaze unutar regija koje kodiraju za rezistenciju na antibiotike, ugradnjom fragmenata DNA dolazi do inaktivacije gena za rezistenciju što omogućuje jednostavnu selekciju plazmida koji sadrže insert (Bolivar i sur., 1977). Restriksijska mapa plazmida pBR322 prikazana je na slici 3.



Slika 3: Restriksijska mapa plazmida pBR322 sa naznačenim restriksijskim mjestima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

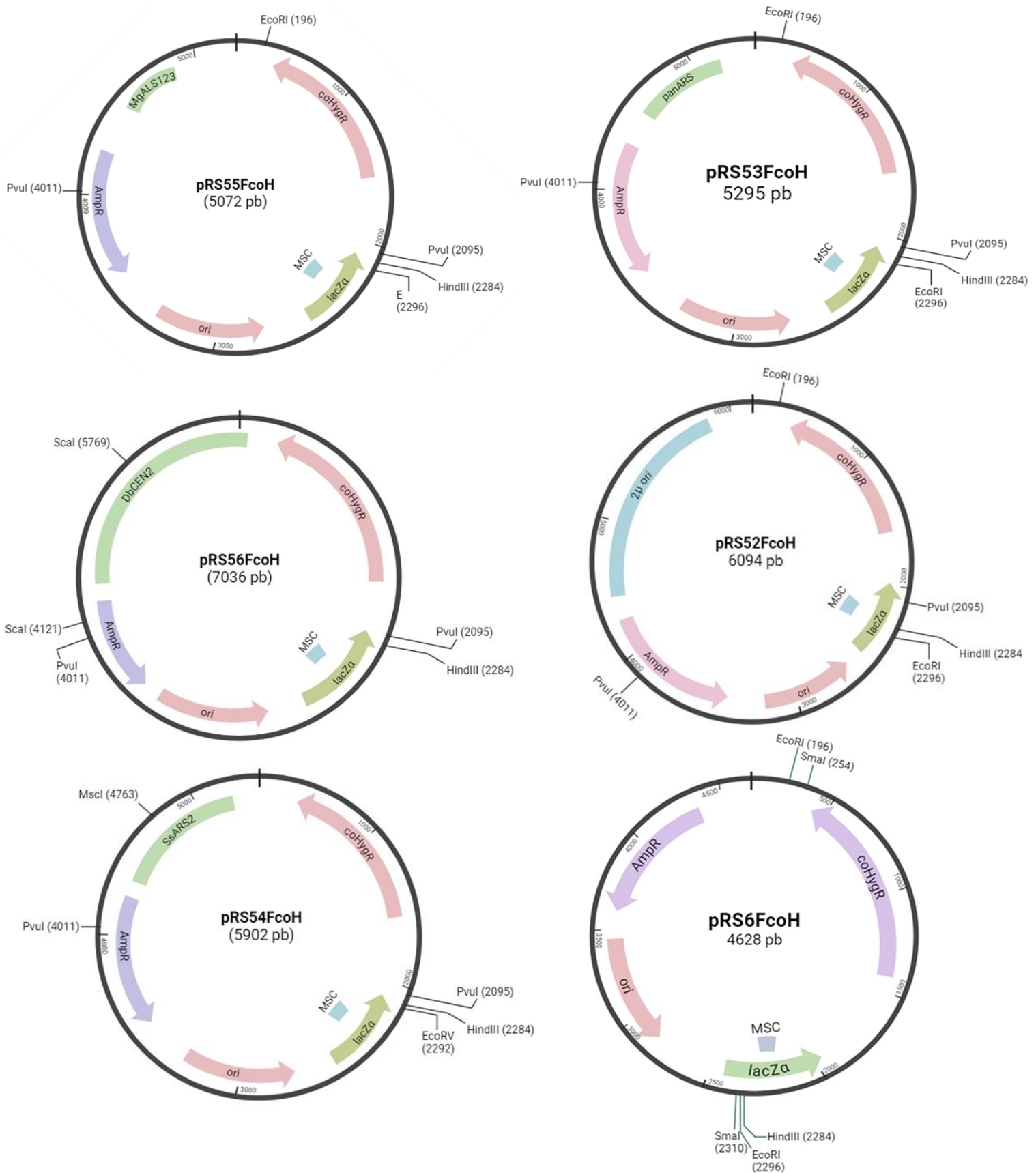
3.1.1. Mikroorganizmi

3.1.1.1 Kvasac *Spathaspora passalidarum*

U ovom radu korišten je divlji tip soja CBS10155T kvasca *Spathaspora passalidarum*. *S. passalidarum* CBS10155T je nekonvencionalni kvasac iz roda *Candida*. Karakteristično za kvasce iz roda *Candida* pa tako i za *S. passalidarum* je da koriste alternativni genetički kod, odnosno sadrže serinsku tRNA koja kodon CUG prepoznaje kao kodon za serin umjesto kao kodon za leucin.

3.1.2. Plazmidi

Za transformaciju je korišteno 6 plazmida koji su prethodno konstruirani u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Matanović i sur., 2022), a koristit će se za transformaciju nekonvencionalnih kvasaca kao vektori za ekspresiju željenih gena u odabranim vrstama. Plazmidi sadrže uobičajene sekvencije za transformaciju i umnažanje plazmida u bakteriji *E.coli* – bakterijsko ishodište replikacije *ori* i gen *bla* (*Amp^R*). Svi plazmidi sadrže polilinker unutar alela *lacZα*, te selektivni biljeg koji omogućuje selekciju transformanata kvasca na podlozi s antibiotikom higromicinom. Sastav kodona ovog selektivnog biljega je u prethodnim istraživanjima optimiran kako bi se mogao koristiti i u kvascima iz CTG skupine kod kojih je karakteristično da kodon za leucin prepoznaju kao kodon za serin. Korišteni plazmidi međusobno se razlikuju jedino prema kvašćevom ishodištu replikacije. Naime, plazmid pRS6FcoH nema kvašćevo ishodište replikacije, plazmid pRS52FcoH sadrži ishodište replikacije plazmida 2μ iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Christianson i sur., 1992), plazmid pRS53FcoH sadrži ishodište replikacije panArs izolirano iz kvasca *Kluyveromyces lactis* (Liachko i Dunham, 2014), plazmid pRS54FcoH sadrži ishodište replikacije SsARS2 izolirano iz kvasca *Scheffersomyces stipitis* (Yang i sur., 1994), plazmid pRS55FcoH sadrži ishodište replikacije MgALS123 iz kvasca *Meyerozyma guilliermondi* (Foureau i sur., 2013), te plazmid pRS56FcoH koji sadrži regiju DbCEN2 koja uključuje ishodište replikacije iz kvasca *Brettanomyces bruxellensis* (Ishchuk i sur., 2016).



Slika 4: Restriksijske mape plazmida pRS52FcoH, pRS6FcoH, pRS53FcoH, pRS54FcoH, pRS55FcoH, pRS56FcoH. Prikazana su restriksijska mjesta enzima korištenih za restriksijsku analizu. Detaljan opis plazmida nalazi se u tekstu.

3.1.3. Restriksijski enzimi

Za restriksijsku analizu korišteni su sljedeći restriksijski enzimi: *HindIII*, *SmaI*, *EcoI*, *PvuI*, *MseI*, *EcoRV* i *ScaI* od proizvođača New England Biolab.

3.1.4. Hranjive podloge

Korištene su tekuća i kruta YPD podloga uz dodatak antibiotika higromicina. Pripremljeno je 200 mL tekuće hranjive podloge na sljedeći način:

Bacto pepton	20 g L ⁻¹
Yeast extract	10 g L ⁻¹
Glukoza	20 g L ⁻¹
Destilirana voda	do 200 mL

Kruta hranjiva podloga je pripremljena na isti način kao i tekuća hranjiva podloga ali se po završetku pripreme dodaje agar u koncentraciji 20 g/L.

Hranjive podloge steriliziraju se u autoklavu 15 min na 121°C, 1 atm. Za selekciju transformanata kvasca *S. passalidarum* u ohlađenu krutu hranjivu podlogu (na 40 - 50°C) dodaje se otopina antibiotika higromicina do koncentracije od 300 mg/mL.

3.1.5. Otopine

3.1.5.1. Otopine za gel-elektroforezu

TBE pufer (10x)

Pufer se priprema dodavanjem 108 g Tris-a i 55,0 g borne kiseline u 40,0 mL 0,5 M EDTA pH 8.0 te se nadopuni destiliranom vodom do 1000 mL. Pufer se priprema u koncentriranom obliku i razrjeđuje s vodom do željene koncentracije. Otopinu nije potrebno sterilizirati.

Agarozni gel (0,8%)

Agarozni gel priprema se otapanjem agaroze u TBE-puferu (1x), koji je pripremljen razrjeđivanjem TBE – pufera (10x). Koncentracija agaroze u gelu može biti 7 – 20 g/L, ovisno o potrebi. Za pripremu 0,8% -tnog agaroznog gela 2 g agaroze otopi se u 250 mL TBE pufera (1x)

Pufer za uzorke

Bromfenol plavo	0,25 g
Ksilen cijanol FF	0,25 g
Glicerol	30,0 g
SDS	1,0 g
EDTA (0,5 M, pH 7.4)	20,0mL
Destilirana voda	do 1000 mL

Pufer se sterilizira filtracijom i čuva na 4°C.

Etidij-bromid

Osnovna otopina se pripremi u koncentraciji od 10 mg/mL, ne sterilizira se i čuva se pri 4°C u tamnoj boci. Pri otapanju je obavezna upotreba dvostrukih nitrilnih rukavica. Otopina za vizualizaciju DNA se priprema dodatkom 50 µL osnovne otopine na 1 L destilirane vode i također se čuva u tamnoj boci.

3.1.6. Kemikalije i enzimi

Sastojci hranjivih podloga	<i>Difco, Detroit</i> <i>Merck, Darmstadt</i> <i>Sigma Chemicals Co., St. Louis</i>
Restriksijski enzimi:	<i>New England Biolabs, Ipswich, USA</i>
Apsolutni etanol:	<i>Novokem, Zagreb</i>

Izopropanol:	<i>Alkaloid, Skopje</i>
EDTA:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Tris (Tris Ultra Pure):	<i>Sigma Chemicals Co., St. Louis</i>
Agaroz:	<i>Appligene, Strassbourg</i>
Etidijev bromid:	<i>Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim</i>
Restriksijski enzimi i odgovarajući puferi:	<i>New England Biolabs, Ipswich.</i>
SDS:	<i>Merck, Hohenbrunn</i>
Komplet kemikalija za restriksijsku analizu:	<i>Fermentas, Vilnius, Litva</i>
Sorbitol:	<i>Sigma-Aldrich., St. Louis.</i>
Standard za elektroforezu:	<i>New England Biolabs, Ipswich.</i>
Tris: Tris Ultra Pure	<i>Sigma-Aldrich., St. Louis.</i>

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj kvasca *S. passalidarum*

Divlji soj kvasca *S. passalidarum* za transformaciju je uzgajan u 400 mL tekuće YPD podloge. Kultura se inkubira na tresilici 48h na 28°C i 180 okretaja u minuti. Transformanti su selekcionirani na čvrstim podlogama uz dodatak antibiotika higromicina. Kruta hranjiva podloga inkubira se 48h. Sa krute hranjive podloge pomoću sterilne mikrobiološke ušice prenese se zasebna kolonija kvasca u 3 mL tekuće hranjive podloge.

3.2.2. Gel elektroforeza

Za gel elektroforezu korišten je 0.8% - tni agarozni gel. Priprema se otapanjem 2 g agaroze u 250 mL TBE pufera (1x). Tikvica sa smjesom se zagrijava 3 minute u mikrovalnoj pećnici s povremenim prekidima za miješanje. Proces traje sve dok se agarozna u potpunosti ne otopi. Gel se ohladi do temperature oko 50 °C, a zatim se izlije u prethodno pripremljeni kalup za gel. Uzorci DNA se bojom za nanošenje uzorka miješaju u omjeru 6:1 te se unose u jažice pomoću mikropipete. Elektroforeza se provodi pri naponu od 60 V oko 2 sata. Nakon završetka elektroforeze gel se inkubira 30 minuta u otopini etidijevog bromida te se osvjetli UV svjetlošću na transiluminatoru i fotografira.

3.2.3. Izolacija fragmenta DNA iz agaroznog gela

Iz agaroznog gela DNA je izolirana prema uputama proizvođača kompleta kemikalija 'Monarch DNA Gel Extraction Kit' (New England Biolabs, SAD). Fragment DNA izdvoji se iz agaroznog gela pomoću oštrice, a zatim se prebaci u mikrocentrifugalnu kivetu od 1,5 ml i izvaže.

U kivetu s komadićem gela dodaje se 4 volumena Monarch Gel pufera za otapanje, te se uzorak inkubira na temperaturi između 37-55°C uz povremeno okretanje dok se uzorak gela potpuno ne otopi. U kivetu za sakupljanje umetne se kolona, te se uzorak nanese na kolonu. Kiveta s uzorkom okreće se 1 minutu te se izlije protočni sadržaj. Kolona se ponovno umetne u kivetu za sakupljanje, doda se 200 µL pufera za ispiranje te ponovo slijedi okretanje kivete 1 minutu; ovaj korak ponavlja se 2 puta. Kolona se zatim prebaci u čistu kivetu za mikrocentrifugiranje od 1,5 ml pri čemu se mora paziti da vrh kolone ne dođe u kontakt s protočnom fazom. U konačnici se dodaje od 6-20 µL pufera za ispiranje DNA, inkubira se 1 minutu pri sobnoj temperaturi uz okretanje kivete kako bi došlo do elucije DNA.

3.2.4. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima provedeno je prema uputama proizvođača *New England Biolabs, Ipswich*, korištenjem originalnog pufera za pojedini enzim. Restrikcijska se otopina priprema u volumenu od 10 µL; dodatkom 1 µL pufera (10x konc.), 0,3 µL restrikcijskog enzima, varijabilnog volumena suspenzije DNA te dodatkom vode do ukupnog volumena 10 µL. Svi korišteni enzimi imaju koncentraciju 20 U/µL. Restrikcija se provodi 60 minuta pri temperaturi od 37°C. Za restrikcijsku analizu plazmida korišteno je

0,2 µL plazmida pRS6FcoH i pRS52FcoH, te 0,5 µL plazmida pRS53FcoH, pRS54FcoH, pRS55FcoH i pRS56FcoH. Također, korišteno je 1 µL 10x koncentriranog cut smart pufera i 0,3 µL enzima, te vode do ukupnog volumena 10 µL.

Za linearizaciju plazmida pRS6FcoH korišteno je 0,5 µL DNA, 5 µL 10x koncentriranog pufera, 2,5 µL restrikcijskog enzima Scal, te voda do ukupnog volumena 50 µL.

3.2.5. Transformacija kvasca elektroporacijom

Kvasci su transformirani elektroporacijom prema protokolu za transformaciju kvasaca koji je originalno razvijen za kvasac *Brettanomyces bruxellensis* (Miklenić i sur., 2015). Kvasci se uzgoje u 400 mL tekuće kulture na tresilici pri temperaturi od 28°C dok se ne postigne koncentracija oko 10^8 stanica/mL. Koncentracija stanica odredi se brojanjem u Thomaovoj komorici. Tekuća kultura centrifugira se 4 minute pri 4000 o/min na sobnoj temperaturi. Supernatant se odlije, a talog stanica se ispiru dva puta sa 100 mL sterilne deionizirane vode te slijedi centrifugiranje pri istim uvjetima. Talog stanica se resuspendira u otopini koja se sastoji od 35 mM DDT i 100 mM LiAc, suspenzija se 45 minuta inkubira u tresilici pri 28 °C i 80 o/min. Nakon inkubacije suspenzija se centrifugira 4 minute pri 4000 o/min na 4 °C. Stanice se drže u ledu sve do koraka elektroporacije. Talog stanica ispiru se s 20 mL ledene, sterilizirane deionizirane vode, a zatim se dva puta ispiru s 20 mL ledene otopine sorbitola (1 M) uz istovremeno centrifugiranje pri istim uvjetima. Talog se resuspendira u ledenoj otopini sorbitola tako da ukupni volumen iznosi 1500 µL. U 8 uzoraka prebaci se 40 µL ugušćene suspenzije i 1 µL DNA otopljene u deioniziranoj vodi uz miješanje pipetiranjem nakon čega slijedi inkubacija 5 minuta u ledu. Uzorci se prenesu u kivete za elektroporaciju koje su prethodno držane na ledu nakon čega slijedi puls. Parametri elektroporacije su 1,8 kV i 5ms. Neposredno nakon pulsa suspenziji stanica dodaje se 1 mL smjese sorbitola (1 M) i YPD podloge u omjeru 1:1 uz inkubaciju u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzija stanica prenese se u staklenu epruvetu, doda se 1 mL YPD podloge te slijedi inkubacija u tresilici pri 180 o/min u trajanju od 3 sata na 28 °C. Nakon inkubacije, uzorci se nacijepe na prethodno pripremljene krute hranjive podloge koje sadrže antibiotik higromicin u koncentraciji od 300 mg/mL te slijedi inkubacija 2 do 3 dana na temperaturi od 28°C.

4. REZULTATI I RASPRAVA

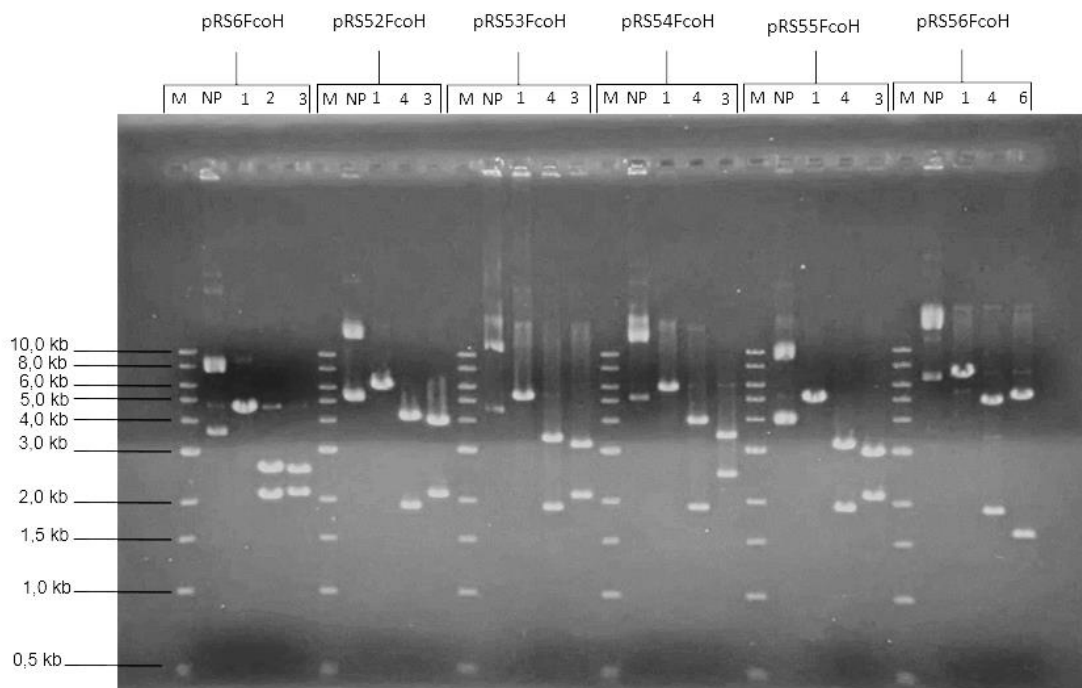
Cilj ovog rada bio je transformirati kvasac *Spathaspora passalidarum* sa 6 različitih transformirajućih molekula DNA – linearnim heterolognim fragmentom DNA koji ne sadrži kvaščevo ishodište replikacije (linearizirani plazmid, te sa 5 kružnih plazmida koji sadrže ishodišta replikacije iz različitih vrsta kvasaca. U tu svrhu, najprije je provedena restrikcijska analiza izoliranih plazmidnih molekula kako bi se provjerila njihova struktura (poglavlje 4.1.). Zatim, za pripremu linearnog transformirajućeg fragmenta plazmid je pocijepan restrikcijskim enzimom i izoliran iz agaroznog gela (pogavlje 4.2.). Na kraju, provedena je transformacija *S. passalidarum* navedenim molekulama DNA (poglavlje 4.3.).

4.1. Restrikcijska analiza

Provedena je restrikcijska analiza plazmida pRS6FcoH, pRS52FcoH, pRS53FcoH, pRS54FcoH, pRS55FcoH, pRS56FcoH koji su detaljno opisani u poglavlju 3.1.2. U svrhu provedbe restrikcijske analize, plazmidi su pocijepani s nekoliko restrikcijskih enzima što je prikazano u tablici 1 kao i očekivane veličine fragmenata plazmidne DNA nakon restrikcije. Svi su plazmidi pocijepani enzimom HindIII koji plazmide cijepa samo na jednom mjestu kako bi se procijenila ukupna duljina plazmida i masa transformirajuće DNA, dok ostali enzimi plazmide cijepaju na dva restrikcijska mjesta. Očekivane veličine fragmenata, sukladno restrikcijskim mapama plazmida (slika 4, poglavlje 3.1.2.) dobivene cijepanjem plazmida s odabranim restrikcijskim enzimima prikazane su u tablici 1, a rezultat cijepanja i gel elektroforeze na slici 5.

Tablica 1: Duljine fragmenata plazmidne DNA nastalih cijepanjem plazmida restrikcijskim enzimima.

	pRS6FcoH	pRS52FcoH	pRS53FcoH	pRS54FcoH	pRS55FcoH	pRS56FcoH
HindIII	4628 pb	6094 pb	5295 pb	5902 pb	5072 pb	7036 pb
SmaI	2056 pb, 2572 pb					
EcoRI	2100 pb, 2582 pb	2100 pb, 3994 pb	2100 pb, 3195 pb		2100 pb, 2972 pb	
PvuI		1916 pb, 4178 pb	1916 pb, 3379 pb	1916 pb, 3986 pb	1916 pb, 3156 pb	1916 pb, 5120 pb
MseI +EcoRV				2471 pb, 3431 pb		
Scal						1648 pb, 5388 pb



Slika 5: rezultati restrikcijske analize plazmida pRS6FcoH, pRS53FcoH, pRS53FcoH, pRS54FcoH, pRS55FcoH, pRS56FcoH. U jažicama se nalaze: **M** – marker, **NP** – ne pocijepani plazmid, **1** – plazmid pocijepan restrikcijskim enzimom HindIII, **2** – plazmid pocijepan restrikcijskim enzimom SmaI, **3** – plazmid pocijepan restrikcijskim enzimom EcoRI, **4** – plazmid pocijepan restrikcijskim enzimom PvuI, **5** – plazmid pocijepan restrikcijskim enzimom MseI + EcoRV, **6** – plazmid pocijepan restrikcijskim enzimom Scal

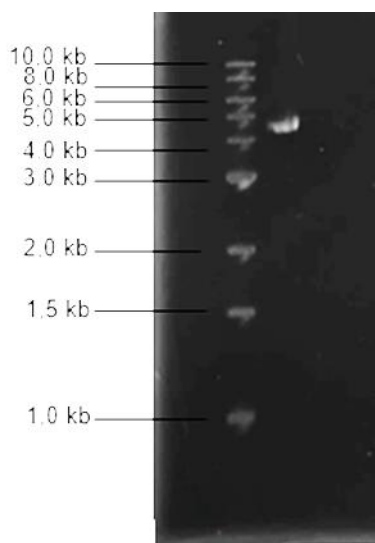
Na prikazu rezultata restrikcijske analize (slika 5) vidljivo je da svi dobiveni fragmenti DNA odgovaraju očekivanim fragmentima iz tablice 1, te na temelju ovih rezultata možemo zaključiti da je struktura plazmida sukaldna mapama plazmida (slika 4).

4.2. Priprema transformirajuće DNA

Za transformaciju kvasca *Spathaspora passalidarum* korišten je plazmid pRS6FcoH koji je najprije lineariziran s restrikcijskim enzimom Scal. Linearni fragment DNA uspješno se integrira u genom kvasca homolognom rekombinacijom čime postaje stabilni dio genetičkog materijala za razliku od kružne DNA koja može biti izgubljena tijekom stanične diobe ako ne sadrži elemente za replikaciju i stabilnu segregaciju.

Veličina lineariziranog plazmida pRS6FcoH je 4628 pb što je vidljivo iz tablice 1. na slici 6

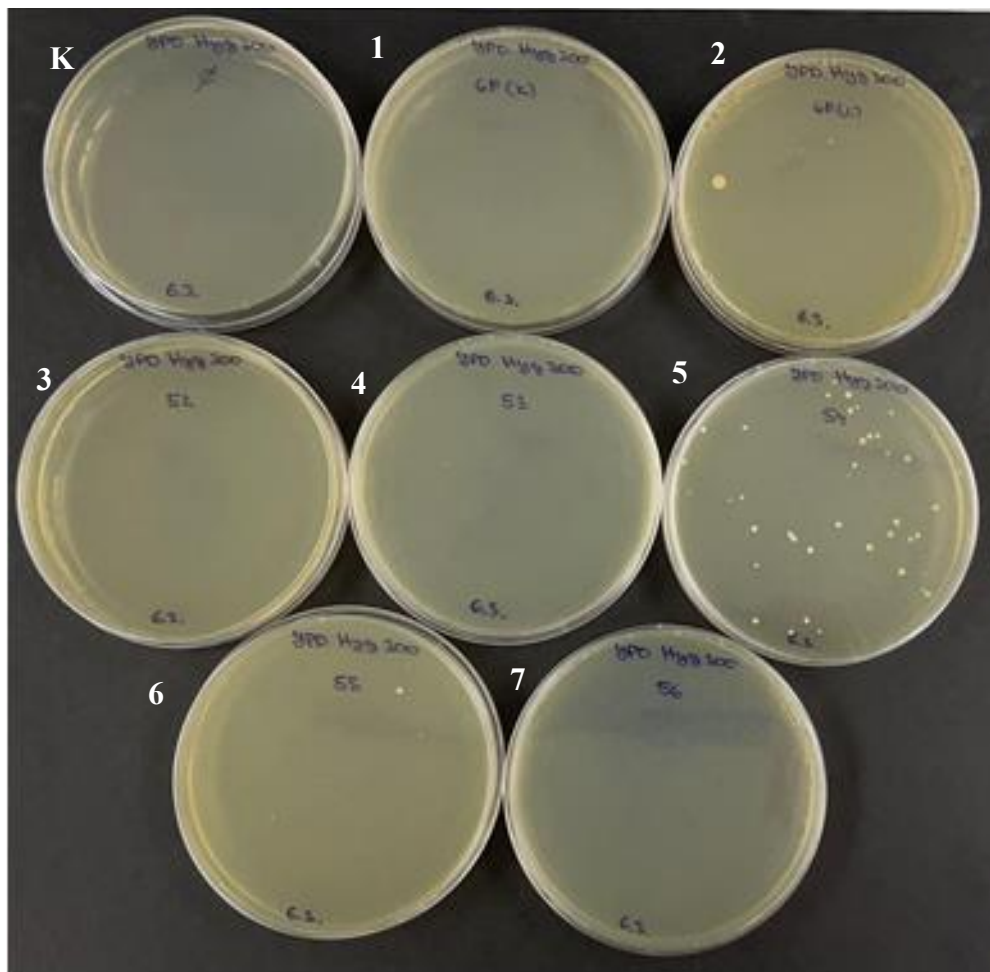
prikazan je rezultat linearizacije plazmida pomoću restrikcijskog enzima Scal.



Slika 6: Rezultat linearizacije plazmida pRS6FcoH pomoću restrikcijskog enzima Scal.

4.3. Transformacija kvasca *Spathaspora passalidarum*

Kvasac *Spathaspora passalidarum* transformiran je elektroporacijom prema protokolu za transformaciju kvasca što je opisano u poglavlju 3.2.5. Materijali i metode. Za transformaciju je korišten nereplikativni plazmid pRS6FcoH lineariziran cijepanjem restrikcijskim enzimom Scal, te kružni plazmidi pRS52FcoH, pRS53FcoH, pRS54FcoH, pRS55FcoH i pRS56FcoH. Prilikom svake transformacije napravljen je i kontrolni uzorak s kojim je proveden cjeloukupni postupak transformacije, ali je umjesto DNA dodan jednak volumen sterilne vode. U okviru transformacije, na jedan set ploča nacijejpljena je jedna desetina ukupnog volumena, dok je na drugi set ploča nacijejpljen ostatak volumena. Ova raspodjela je napravljena zbog nepoznate efikasnosti postupka. U tablici 2. prikazane su mase transformirajuće DNA, brojevi transformiranih stanica te vrijednosti efikasnosti transformacije za sve korištene plazmide. Na slici 7 prikazane su krute hranjive podloge na kojima su izrasli transformanti kvasca *S. passalidarum*.



Slika 7: Krute selektivne podloge s antibiotikom higromicinom s poraslim transformantima kvasca *Spathaspora passalidarum*. K – negativna kontrola bez dodane DNA; 1 – stanice kvasca transformirane kružnim plazmidom pRS6FcoH; 2 – stanice kvasca transformirane lineariziranim plazmidom pRS6FcoH pocijepanim enzimom Scal; 3 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS52FcoH; 4 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS53FcoH; 5 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS54FcoH; 6 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS55FcoH; 7 – stanice kvasca transformirane plazmidom pRS56FcoH.

Tablica 2: Rezultati transformacije kvasca *S. passalidarum*.

	m (DNA) [ng]	Ukupni broj dobivenih transformanata	Efikasnost transformacije [broj transformanata μg^{-1} DNA]
Kontrola – bez DNA	0	0	/
pRS6FcoH(k)	3750	0	/
pRS6FcoH(l)	450	1	2,22
pRS52FcoH	1875	0	/
pRS53FcoH	500	0	/
pRS54FcoH	500	46	92
pRS55FcoH	750	3	4
pRS56FcoH	500	0	/

Iz priloženih rezultata je vidljivo da, iako je efikasnost mala, kvasac *Spathaspora passalidarum* uspješno je transformiran s lineariziranim plazmidom pRS6FcoH, te kružnim plazmidima pRS54FcoH koji sadrži ishodište replikacije iz kvasca *Scheffesomyces stipitis* i pRS55FcoH koji sadrži ishodište replikacije iz kvasca *Meyerozyma guilliermondi*. Pri tome, efikasnost transformacije s linearnim fragmentom, te plazmidom koje sadrži ishodište replikacije iz *M guilliermondi* bila je vrlo niska, 2-4,4 transformanta /mg, dok je efikasnost s kružnim plazmidom koje nosi ishodište iz kvasca *S. stipitis* bila bitno veća, točnije iznosila je 92 transformanta/mg. Iz toga se može zaključiti da se *S. spathaspora* može transformirati istom metodom koja je ranije razvijena za kvasac *D. bruxellensis* (Miklenić i sur.,2015.) , ali i da je uspješnost ugradnje heterologne linearne DNA ilegitimnom rekombinacijom vrlo niska. Također, sukladno dobivenim rezultatima, može se pretpostaviti da ishodište replikacije iz kvasca *S. stipitis* omogućava održavanje plazmida u kružnom obliku nakon transformacije, ali stabilnost takvih plazmida trebala bi se odrediti dodatnim eksperimentima.

Također, relevantan je rezultat i to što nakon provedenog postupka transformacije s pojedinim kružnim plazmidima nije došlo do porasta transformanata na hranjivoj podlozi. Naime, u ranijim eksperimentima u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Matanović, usmeno priopćenje) u kojima je transformiran kvasac *S. passalidarum*

vektorima koji su sadržavale i regiju f1 ori pokazano je da se kvasac uspješno transformira sa svim plazmidima, neovisno o prisutstvu određenog ishodišta replikacije, te da su nastali transformanti vrlo nestabilni. Regija f1 ori je uobičajena na okosnici standardnih vektora u genetičkom inženjerstvu, a omogućava izolaciju plazmida u jednolančanom obliku iz bakterije *Escherichia coli*. Pretpostavilo se da upravo ova regija djeluje kao nestabilno ishodište replikacije u kvascu *S. passalidarum*, a rezultati ovog rada to i potvrđuju.

5. ZAKLJUČAK

1. Kvasac *Spathaspora passalidarum* može se transformirati metodom elektroporacije koja je prethodno razvijena za kvasac *Brettanomyces bruxellensis*.
2. Najviša efikasnost transformacije, od svih testiranih plazmidnih molekula, postiže se sa plazmidom koji nosi ishodište replikacije iz kvasca *Scheffersomyces stipits*.
3. Regija f1 ori koja omogućava izolaciju plazmida u jednolančanom obliku iz bakterije *Escherichia coli*, djeluje kao nestabilno ishodište replikacije u kvascu *Spathaspora passalidarum*.

6. POPIS LITERATURE

Białkowska AM (2016) Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. *World J Microbiol Biotechnol* 32

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., & Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2, 95–113

Burgers PMJ, Percival KJ (1987) Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. *Anal Biochem* 163, 391–397. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90240-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90240-5)

Carter, M., Shieh, J. (2015) *Gene Delivery Strategies, Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)*, 239-252.

Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119–122. [https://doi.org/10.1016/03781119\(92\)90454-W](https://doi.org/10.1016/03781119(92)90454-W)

Del Solar, G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarría, M. Espinosa, and R. Díaz-Orejas. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids.

Foureau E, Courdavault V, Navarro Gallón SM, Besseau S, Simkin AJ, Crèche J, i sur. (2013) Characterization of an autonomously replicating sequence in *Candida guilliermondii*. *Microbiol Res* 168, 580–588. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.04.006>

Gietz RD, Woods RA (2001) Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* 30, 816–831. <https://doi.org/10.2144/01304RV02>

Gomes AC, Moura GR, Santos MA (2011) The genetic code of the *Candida* CTG clade. In: *Candida and Candidiasis, Second Edition*, ASM Press, p 45-55.

Gurpilhares D. B., Hasmanna, F. A., Pessoa, A., Roberto, I. C. Optimization of glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from *Candida guilliermondii* by disruption with glass beads. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 591-595.

Hooykaas, P. J. J., van Heusden, G. P. H., Niu, X., Reza Roushan, M., Soltani, J., Zhang, X.,

van der Zaal, B. J. (2018). Agrobacterium-Mediated Transformation of Yeast and Fungi. Current Topics in Microbiology and Immunology

Ishchuk OP, Zeljko TV, Schifferdecker AJ, Wisén SM, Hagström ÅK, Rozpędowska E, i sur. (2016) Novel Centromeric Loci of the Wine and Beer Yeast *Dekkera bruxellensis* CEN1 and CEN2. PLoS One 11, e0161741. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0161741>

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J Bacteriol 153, 163. <https://doi.org/10.1128/JB.153.1.163-168.1983>

Kargbo H, Harris JS, Phan AN (2021) “Drop-in” fuel production from biomass: Critical review on techno-economic feasibility and sustainability. Renew Sustain Energy Rev 135

Kawai S, Hashimoto W, Murata K (2010) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: Methods and possible underlying mechanism. Bioeng Bugs 1, 395. <https://doi.org/10.4161/BBUG.1.6.13257>

Liachko I, Dunham MJ (2014) An autonomously replicating sequence for use in a wide range of budding yeasts. FEMS Yeast Res 14, 364–367. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12123>

Liu ZL (2006) Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. Appl Microbiol Biotechnol 73(1), 27-36.

Löbs AK, Schwartz C, Wheeldon I (2017) Genome and metabolic engineering in nonconventional yeasts: Current advances and applications. Synth Syst Biotechnol 2, 198–207. <https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2017.08.002>

Martinez-Jimenez FD, Neitzel T, Biazi LE, Pereira IO, dos Santos LV, da Costa AC, i sur. (2021) Exploiting the Non-conventional Yeast *Spathaspora passalidarum* as a Platform for Hemicellulosic Hydrolysate Conversion into Bioproducts: a Mini Review. Bioenergy Res 14, 689–708. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10257-5>

Matanović A, Arambašić K, Žunar B, Štafa A, Miklenić MS, Šantek B, i sur. (2022) Toolbox for genetic transformation of non-conventional *Saccharomycotina* yeasts: High efficiency transformation of yeasts belonging to the *Schwanniomyces* genus. J Fungi 8. <https://doi.org/10.3390/jof8050531>

Meilhoc, E., Masson, J. M., Teissie, J. (1990) High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Biotechnology (NY)* 8: 223-227.

Miklenić M, Žunar B, Štafa A, Svetec IK (2015) Improved electroporation procedure for genetic transformation of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Res* 15, 96. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOV096>

Mittelman K, Barkai N (2017) The genetic requirements for pentose fermentation in budding yeast. *G3* 7(6), 1743–1752. <https://doi.org/10.1534/g3.117.039610>

Mubeen H, Zahra Naqvi R, Masood A, Shoaib MW, Raza S (2016) Gene transformation: Methods, Uses and Applications. *J Pharm Biol Sci* 1–4

Ndubuisi IA, Amadi CO, Nwagu TN, Murata Y, Ogbonna JC (2023) Non-conventional yeast strains: Unexploited resources for effective commercialization of second generation bioethanol. *Biotechnol Adv* 63, 108100. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2023.108100>

Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E (2020) *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications

Redman M, King A, Watson C, King D (2016) What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 101, 213–215. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459>

Rivera, A. L., Magana-Ortiz, D., Gomez-Lim, M., Fernandez, F., Loske, A. M. (2014) Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews* 11: 184-203

Santos MAS, Tuite MF (1995) The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 23(9), 1481-1486.

Selim KA, Easa SM, El-Diwany AI (2020) The xylose metabolizing yeast *Spathaspora passalidarum* is a promising genetic treasure for improving bioethanol production. *Fermentation* 6, 1–12. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6010033>

Spencer J, Ragout de Spencer A, Laluce C (2002) Non-conventional yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 147–156. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0834-2>

Stöckmann C, Scheidle M, Dittrich B, Merckelbach A, Hehmann G, Melmer G, i sur. (2009) Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*, a re-assessment. *Microb Cell Fact* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-22/FIGURES/5>

Turner SA, Butler G (2014) The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019778>

Yang VW, Marks JA, Davis BP, Jeffries TW (1994) High-efficiency transformation of *Pichia stipitis* based on its URA3 gene and a homologous autonomous replication sequence, ARS2. *Appl Environ Microbiol* 60, 4245–4254. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.12.4245-4254.1994>

Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand,

Izjava o izvornosti

Ja Lea Smolec izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Lea Smolec

Vlastoručni potpis