

Konstrukcija i molekularna analiza soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* FF OPO8 yku70delta

Melvan, Antea

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:159:484955>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-28**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Antea Melvan
0058215899**

**Konstrukcija i molekularna analiza
kvasca *Saccharomyces cerevisiae* FF OPO8 *yku70*Δ**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Zagreb, 2023.

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

**Konstrukcija i molekularna analiza soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* FF OPO8 *yku70*Δ
Antea Melvan, 0058215899**

Sažetak: Cilj ovog rada bio je delecija gena *YKU70* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* soja FF OPO8. Delecija je postignuta korištenjem delecijske kazete *YKU70KanMX4* koja ima krajeve homologne DNA regijama koje se nalaze uzvodno i nizvodno od gena *YKU70* u genomu kvasca, što omogućava njenu integraciju u ciljno mjesto putem mehanizma ends-out homologne rekombinacije. Također, delecijaska kazeta sadrži i selektivni marker *KanMX4* koji je omogućio selekciju transformanata uzgojem na podlozi koja sadrži antibiotik geneticin. DNA je zatim izolirana iz odabranih transformanata, a uspješnost izolacije potvrđena je gel elektroforezom. PCR analiza izolirane DNA provedena je upotrebom KanIN-F i KanIN-R početnica, te *YKU70IN-F* i *YKU70IN-R* početnica kako bi se potvrdila integracija delecijske kazete *YKU70KanMX4* i delecija gena *YKU70*. Umnoženi fragmenti dobiveni PCR metodom analizirani su gel elektroforezom, čime je utvrđeno da su tri od četiri odabrana transformanta željenog genotipa.

Ključne riječi: delecija gena, *Saccharomyces cerevisiae*, ends-out homologna rekombinacija, PCR

Rad sadrži: 33 stranice, 10 slika, 1 tablica, 22 literaturna 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: 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

**Construction and molecular analysis of yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain FF OPO8 *yku70*Δ
Antea Melvan, 0058215899**

Abstract: The objective of this work was to delete the *YKU70* gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain FF OPO8. Deletion was achieved using *YKU70KanMX4* deletion cassette with ends homologous to the DNA regions flanking the *YKU70* gene which enables its integration at the target site through ends-out homologous recombination mechanism. Additionally, the cassette contains the *KanMX4* selective marker which enabled the selection of transformants through cultivation on a medium containing the antibiotic geneticin. DNA was then isolated from selected transformants and the success of the isolation was confirmed by gel electrophoresis. PCR analysis of the isolated DNA was performed using KanIN-F and KanIN-R primers or YKU70IN-F and YKU70IN-R primers to verify the integration of the *YKU70KanMX4* deletion cassette and the deletion of the *YKU70* gene. The amplified fragments obtained from the PCR were analysed by gel electrophoresis, which determined that three out of four selected transformants had the desired genotype.

Keywords: gene deletion, *Saccharomyces cerevisiae*, ends-out homologous recombination, PCR

Thesis contains: 33 pages, 10 figures, 1 table, 22 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: Marina Svetec Miklenić, PhD, Associate Professor

Thesis defended: July 14, 2023

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 2 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 3 |
| 2.2. Mehanizmi popravka dvolančanog loma u kvascu..... | 5 |
| 2.3. Gensko ciljanje u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 9 |
| 2.4. Lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i> , PCR)..... | 13 |
| 2.5. Elektroforeza nukleinskih kiselina | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 16 |
| 3.1. Materijali | 16 |
| 3.1.1. Mikroorganizam | 16 |
| 3.1.2. Transformirajuća DNA..... | 16 |
| 3.1.3. Oligonukleotidi..... | 16 |
| 3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 16 |
| 3.1.5. Otopine | 17 |
| 3.1.6. Kemikalije i enzimi | 19 |
| 3.2. Metode | 21 |
| 3.2.1. Priprema kompetentnih stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 21 |
| 3.2.2. Transformacija kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> metodom elektroporacije | 21 |
| 3.2.3. Selekcija transformanata kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 21 |
| 3.2.4. Izolacija DNA iz kulture stanica transformanata kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 22 |
| 3.2.5. Elektroforeza izolirane genomske DNA..... | 22 |
| 3.2.6. Analiza lančanom reakcijom polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i> , PCR)..... | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 24 |
| 4.1. Transformacija kvasca i selekcija transformanata..... | 25 |
| 4.2. Izolacija genomske DNA transformanata..... | 26 |
| 4.3. Molekularna analiza transformanata kvasca..... | 27 |
| 5. ZAKLJUČAK | 30 |
| 6. POPIS LITERATURE | 31 |

1. UVOD

Genetičko inženjerstvo u stalnom je razvoju od 1970-ih, te je našlo primjenu u medicini, agrikulturi i industriji. Odnosi se na tehnike manipulacije DNA koje su bazirane na izolaciji, umnažanju, sekvencioniranju i ekspresiji gena.

Genetička manipulacija obično podrazumijeva unos strane DNA u ciljnu stanicu. Strana DNA je stabilna ukoliko je ona dio vektora koji se može samostalno replicirati ili ako se može ugraditi u genom ciljne stanice mehanizmom homologne rekombinacije. Homologna rekombinacija je mehanizam popravka dvolančanog loma prema drugoj homolognoj regiji u genomu, pri kojoj može doći do recipročne razmjene dijelova genoma (Tamarin, 1999).

Modifikacija specifičnog gena postiže se genskim ciljanjem, koje se provodi u svrhu uvođenja modificiranog gena ili delecije gena. Provodi se pomoću linearnog fragmenta DNA koji sadrži krajeve koji su homologni ciljnom mjestu u genomu i selektivni biljeg za selekciju transformanata. Ovisno o orijentaciji homolognih krajeva, nakon sparivanja s regijama u genomu, može se postići integracija transformirajuće DNA u ciljnu regiju ili zamjena ciljne regije transformirajućom DNA (tzv. zamjena gena, eng. *gene replacement*). Delecija gena provodi se u svrhu njihove funkcionalne analize (Pâques i Haber, 1999).

Cilj ovog rada je korištenjem delecijske kazete *YKU70KanMX4* provesti deleciju gena *YKU70* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* soja FF OPO8. Selekcija transformanata se provodi uzgojem na selektivnoj podlozi koja sadrži antibiotik geneticin. Iz odabranih transformanata izolira se genomska DNA, te se izolacija potvrđuje gel elektroforezom. Uspješnost integracije transformirajuće DNA i delecije ciljnog gena provjerava se pomoću lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR). Korištene su početnice KanIN-F i KanIN-R za umnažanje selektivnog biljega *KanMX4*, te početnice *YKU70IN-F* i *YKU70IN-R* za umnažanje ciljnog gena. Rezultati PCR analize potvrđuju se gel elektroforezom.

Protein Yku70 stvara dimer s proteinom Yku80 koji je neophodan za popravak dvolančanog loma mehanizmom nehomolognog spajanja krajeva (eng. *non-homologous end-joining*, NHEJ). Delecijom gena *YKU70* ili *YKU80* popravak dvolančanog loma usmjeren je u homolognu rekombinaciju, čime se pospješuje integracija strane DNA upravo u ciljno mjesto u genomu. Utišavanjem ekspresije ovog gena može se utjecati i na uspješnost genske terapije na humanim stanicama, što ga čini interesantnim za daljnja istraživanja (Fattah i sur., 2008).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Učestalo korišteni modelni organizam u tehnologiji rekombinantne DNA i najbolje proučeni eukariotski organizam je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Radi se o jednostaničnom organizmu koji se može vegetativno razmnožavati i u haploidnom i diploidnom obliku. U kvascu se popravak dvolančanog loma većinom odvija mehanizmom homologne rekombinacije, što olakšava provođenje genetičkih manipulacija.

Tip parenja u *Saccharomyces cerevisiae* određen je s dva nehomologna alela MATa i MAT α koji kodiraju regulatore dva haploidna tipa parenja. U homotaličnim stanicama, u svakoj generaciji, može doći do promjene tipa parenja zamjenom alela homolognom rekombinacijom što im omogućava međusobnu konjugaciju i nastajanje diploidnog oblika sposobnog za mejozu i stvaranje spora (Haber, 2012).

Koristi se kao modelni organizam u genetičkim istraživanjima poput transkriptomskih istraživanja korištenjem DNA mikropolja, funkcionalne analize gena njihovom delecijom, istraživanja ekspresije gena, lociranja proteina, konstruiranja 2D mapa proteina, analize enzimske aktivnosti i istraživanja proteinskih interakcija pomoću sustava dva hibrida. Istraživanja se provode u svrhu razumijevanja staničnih funkcija karakterističnih za eukariote poput mitoze, mejoze, prijenosa signala, stanične diferencijacije, metaboličkih puteva i starenja, s obzirom da posjeduje sve stanične funkcije viših eukariota (Primrose i Twyman, 2006). Duljina kromosomske DNA, koja je organizirana u 16 kromosoma, je 12 071 326 parova baza. Sadrži 6579 okvira čitanja (eng. *open reading frame*, ORF), od kojih je za 80% potvrđena funkcija. Također sadrži mitohondrijsku DNA i oko 60 kopija 2 μ m plazmida (SGD, 2023a).

Geni se prikazuju s tri slova i brojem. Velika slova predstavljaju dominantni alel, a mala recesivni, simbol Δ označava deleciju gena, a simbol $::$ inserciju unutar gena. Fenotip se prikazuje s natpisima + ili -, a rezistencija ili osjetljivost na neki spoj s natpisima R ili S. Opći način prikazivanja gena je YCRXXw. Y govori da je riječ o genu kvasca, drugi član je abecedni prikaz kromosoma na kojem se gen nalazi, treći član predstavlja desnu (R) ili lijevu (L) ruku kromosoma, četvrti član je rimski brojem prikazan relativni položaj ORF-a, a posljednji označava nalazi li se gen na kodirajućem (w) ili nekodirajućem (c) lancu (Guthrie i Fink, 2002).

Sojevi korišteni u genetičkim istraživanjima su mutanti dobiveni od divljeg tipa. Mnogi su nositelji auksotrofnih biljega, biljega za termosenzitivnost i drugih genskih biljega, a konstruiraju se delecijom neesencijalnih gena.

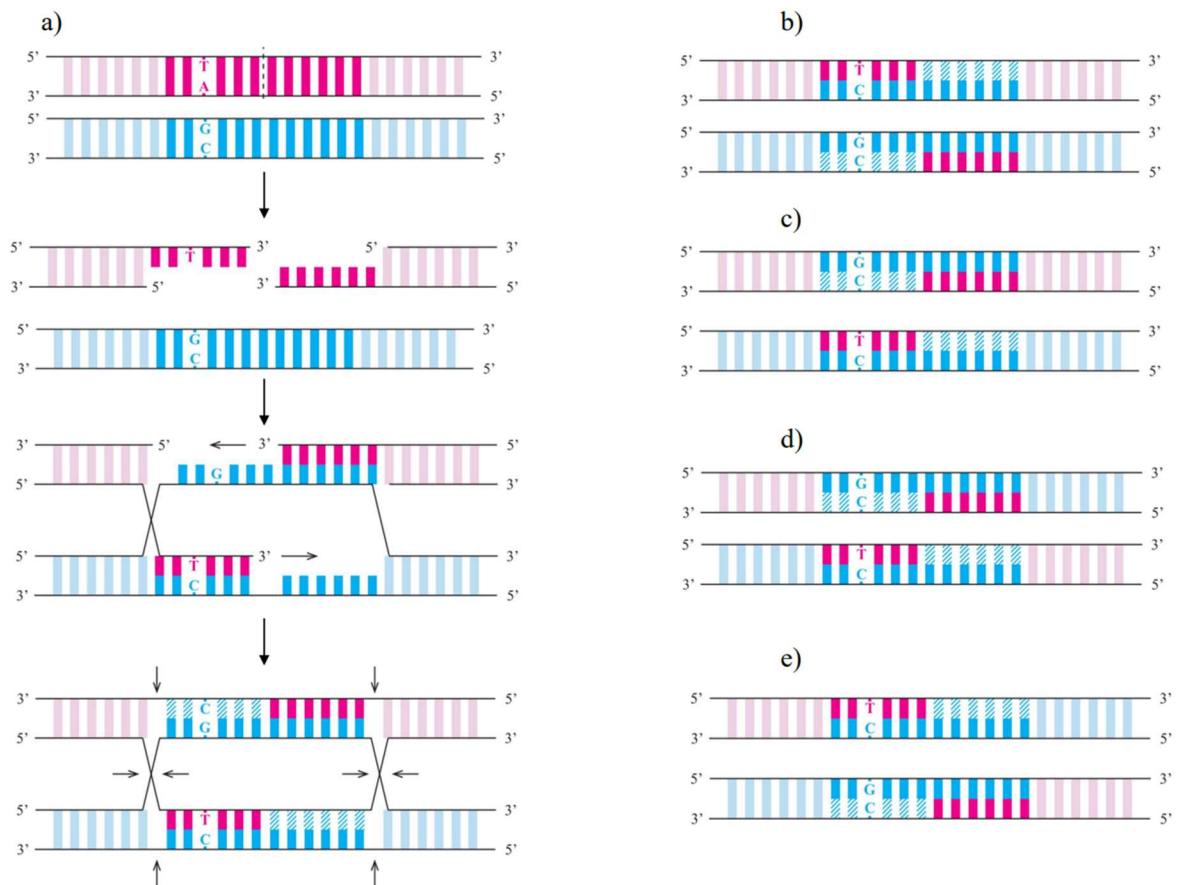
U eksperimentalne svrhe za uzgoj kvasca koristi se kompleksna kompletna podloga YDP čiji su sastojci ekstrakt kvasca, pepton, glukoza i agar, ali i minimalna ili kompletna sintetska podloga (Guthrie i Fink, 2002).

Osim u istraživačke, primjenjuje se i u industrijske svrhe zbog svojstava brzog rasta, jednostavnih nutritivnih zahtjeva, širokog raspona uvjeta rasta, otpornosti prema fagima i GRAS (eng. *generally recognized as safe*) statusa. Zbog jedinstvenih bioloških karakteristika poput fermentacijskog kapaciteta, proizvodnje alkohola i CO₂, te otpornosti prema nepovoljnim uvjetima osmolalnosti i niskog pH koristi se u proizvodnji hrane, pića i biogoriva. Genetičke modifikacije proizvodnog soja provode se u svrhu poboljšanja tolerancije prema procesnim uvjetima u bioreaktoru, povećanja produktivnosti i izazivanja ekspresije heterolognih enzima koji pospješuju proizvodnju proizvoda dodane vrijednosti. Također, zbog ostalih poželjnih karakteristika, poput sposobnosti glikozilacije proteina, odsustva pirogenih toksina, mogućnosti ostvarenja visokih prinosa rekombinantnih proteina i integracije vrlo dugih fragmenata DNA, genetičkim inženjerstvom konstruiraju se kvasci za proizvodnju rekombinantnih proteina s posttranslacijskim modifikacijama, te za proizvodnju farmaceutika i finih kemikalija (Smekenov i sur., 2020; Yang i Blenner, 2020).

2.2. Mehanizmi popravka dvolančanog loma u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

Očuvanje stabilnosti genetičkog koda nužno je za održavanje bioloških funkcija organizma i njegovo razmnožavanje. Međutim, određena razina varijabilnosti genetičke informacije u populaciji može predstavljati prednost pri preživljavanju u promjenjivom okolišu i pokretač je evolucije. Genetička varijabilnost uzrokovana je mutacijama do kojih dolazi uslijed pogrešaka prilikom replikacije DNA i popravka oštećene DNA pogreškama sklonim mehanizmima ili kao posljedica nepravilne raspodjele kromosoma tijekom diobe stanice (Skoneczna i sur., 2015).

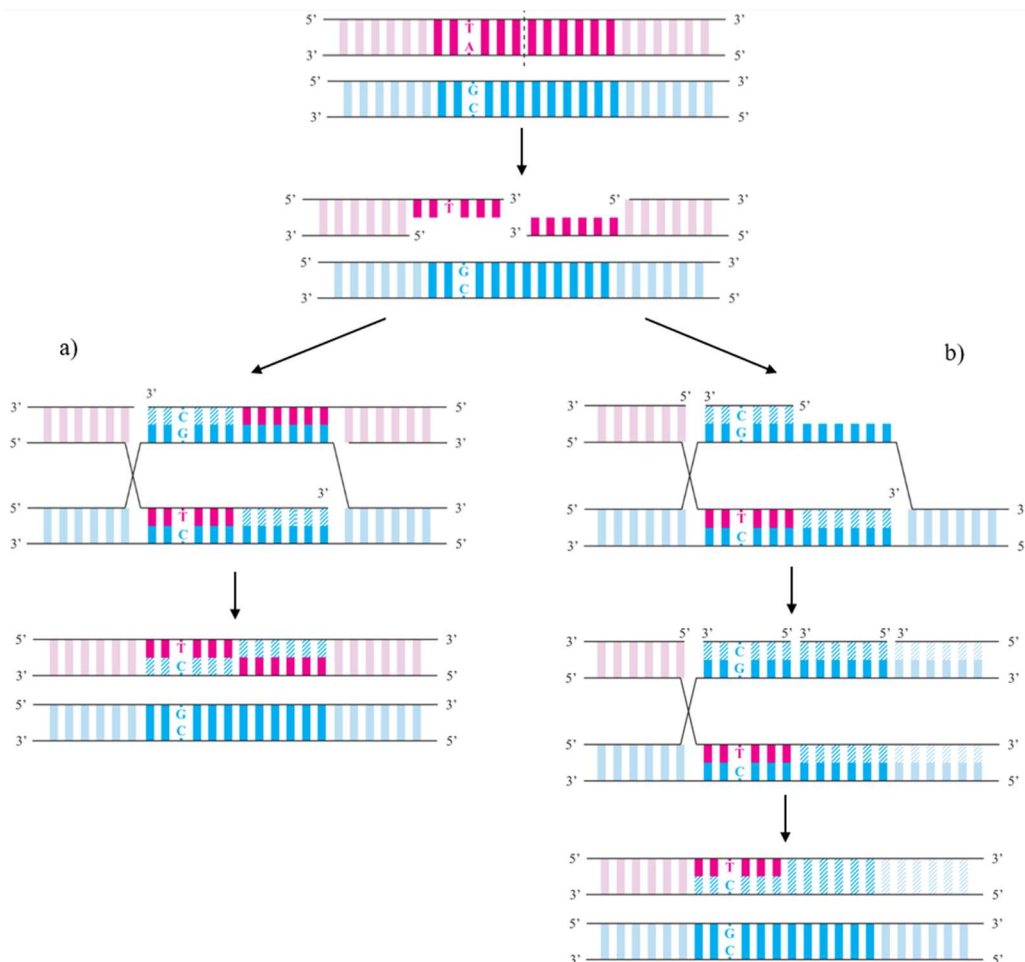
Dvolančani lom u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* najčešće se popravljiva mehanizmom homologne rekombinacije. Popravak homolognom rekombinacijom iniciran je egzozukleaznom razgradnjom 5' krajeva u dvostrukom lomu, čime nastaju dva fragmenta s 3' jednolančanim krajevima. Rad51 je protein koji se veže na 3' jednolančani kraj i katalizira njegovu invaziju u homolognu DNA sekvencu negdje drugdje u genomu, te njihovo komplementarno sparivanje. DNA polimeraza koristi invazirajući 3' kraj kao početnicu, a homolognu DNA kao kalup za sintezu. Napretkom sinteze, uz pomoć aktivnosti translokaze Rad54, drugi lanac homologne DNA je istisnut, te se komplementarno veže s dugim 3' jednolančanim krajem. Zatim DNA polimeraza koristeći taj lanac kao kalup provodi sintezu. Ligacijom novosintetiziranih lanaca s 5' krajevima nastaje četverolančana DNA molekula s dvije ukrižene Holliday-eve strukture koje mogu migrirati. Holliday-eve struktura može se razriješiti cijepanjem ukriženog ili neukriženog lanca. Ako se jedna struktura razriješi cijepanjem ukriženog lanca, a druga neukriženog, dolazi do recipročne razmjene sekvenci uzvodno ili nizvodno od homolognih regija. Na slici 1. prikazan je Holliday-ev model mehanizma homologne rekombinacije (Pâques i Haber, 1999).



Slika 1. Holliday-ev model mehanizma homologne rekombinacije: a) nastanak četverolančane DNA molekule s dvije Holliday-eve strukture; b) i c) razrješenje Holliday-eve strukture bez recipročne razmjene; d) i e) razrješenje Holliday-eve strukture s recipročnom razmjenom; mjesta mogućeg cijepanja lanaca prikazana su strelicama; homologne regije prikazane su tamnijom bojom; novosintetizirani lanci prikazani su šrafirano; radi ilustracije nastanka heterodupleksne DNA i moguće konverzije gena, u homolognim regijama prikazan je par baza koji je različit u originalnim lancima (vlastita fotografija)

Drugi mogući model homologne rekombinacije razlikuje se po tome što se novosintetizirani lanci odvajaju od kalupa prema kojem su sintetizirani, te se međusobno spajaju (model komplementarnog sparivanja lanaca ovisan o sintezi, eng. *synthesis dependend strand annealing*, SDSA). U ovom modelu, koji je prikazan na slici 2.a, sva novosintetizirana DNA nalazi se u molekuli u kojoj je došlo do dvostrukog loma.

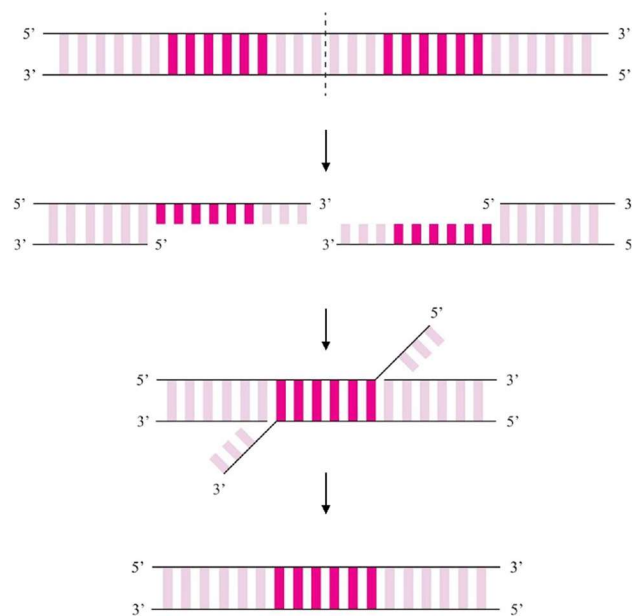
U slučaju gubitka jednog kraja loma (npr. uslijed nepravilne segregacije dijelova kromosma koji sadrži lom prilikom diobe stanice), invazija 3' kraja rezultira nastankom replikacijske vilice i sintezom ostatka fragmenta koristeći cijelu homolognu molekulu DNA kao kalup, kao što je vidljivo na slici 2.b (tzv. replikacija izazvana lomom, eng. *break induced replication*, BIR). Na 3' invazirajućem kraju provodi se sinteza vodećeg lanca, a na istisnutom lancu DNA kalupa sinteza tromog (Pâques i Haber, 1999).



Slika 2. Alternativni modeli homologne rekombinacije: a) komplementarno sparivanje lanaca ovisno o sintezi; b) replikacija izazvana lomom; homologne regije prikazane su tamnijom bojom; novosintetizirani lanci prikazani su šrafirano (vlastita fotografija)

Ako homologne regije nisu potpuno identične, njihovom homolognom rekombinacijom dolazi do nastanka heterodupleksne DNA. Ovisno o tome prema kojem lancu se obavi popravak nesparenih baza, može doći do konverzije gena.

Ukoliko se dvolančani lom dogodio između kratkih ponavljajućih sekvenci, degradacijom 5' krajeva nastaju 3' krajevi s homolognim regijama koji se mogu međusobno spariti, što rezultira, kao što je prikazano na slici 3., delecijom sekvence između ponavljajućih sekvenci (Pâques i Haber, 1999).



Slika 3. Delecija sekvence između homolognih regija na istom lancu; homologne regije prikazane su tamnijom bojom (vlastita fotografija)

Drugi mehanizam popravka dvolančanog loma je nehomologno (ilegitimno) spajanje ravnih krajeva. Ku je heterodimerni protein koji se sastoji od Yku70 i Yku80 podjedinica i potiče popravak dvolančanog loma jednostavnom ligacijom, tako da se veže se na 5' krajeve čime sprječava njihovu razgradnju i nastanak 3' jednolančanih krajeva (Skoneczna i sur., 2015).

2.3. Gensko ciljanje u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

Gensko ciljanje je tehnika kojom se potiče zamjena ciljne DNA sekvence s homolognim kalupom koji sadrži željene promjene putem mehanizma homologne rekombinacije. Popravak se potiče uvođenjem dvolančanog loma unutar homologne regije (Mourrain i Boissonneault, 2021).

Uspješni unos strane DNA u stanicu ovisi o kompetenciji stanice za transformaciju. Jedna od metoda unosa strane DNA u eukariotsku stanicu je elektroporacija, pri kojoj se stanica kratkotrajno izloži električnoj energiji visoke voltaže. Električno polje uzrokuje nastajanje mikropora u staničnoj membrani što omogućuje unos strane DNA (Tamarin, 1999).

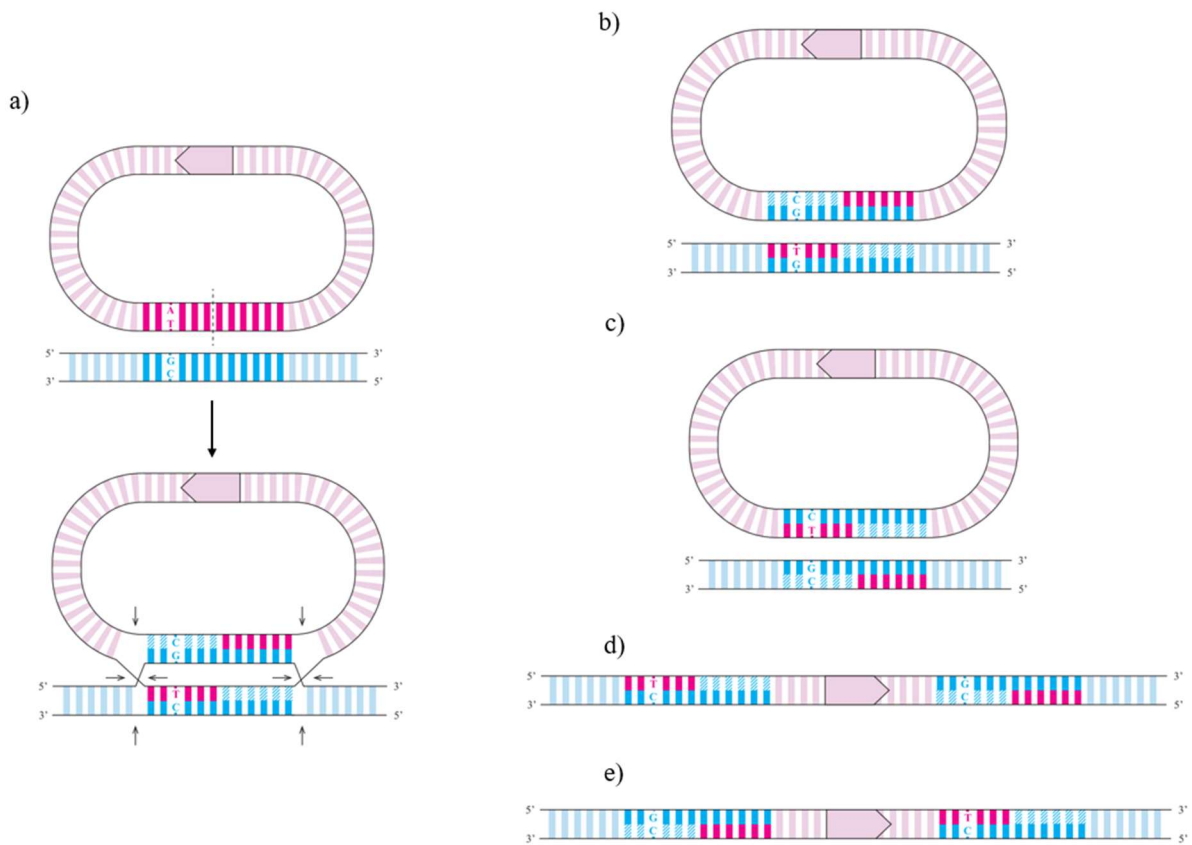
Unesena strana DNA unutar stanice domaćina može biti stabilna u obliku plazmida, integrirati se u genom domaćina ili se razgraditi. Plazmidni vektori su stabilni ako se mogu samostalno replicirati u stanici domaćina, tj. ako sadrže ishodište replikacije koje se u kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* naziva samostalno replicirajuća sekvenca (eng. *autonomously replicating sequence*, ARS). Strana DNA koja nije insertirana u vektor ili je insertirana u nereplicirajući vektor može se zadržati u stanici samo integracijom u genom. Integrira se rekombinacijom s homolognom regijom ili nepovezanimom sekvencom (Primrose i Twyman, 2006).

Integracija homolognom rekombinacijom primjenjuje se za deleciju gena u svrhu funkcionalne analize gena, modifikaciju promotora u svrhu regulacije gena, dodatak oznake na protein u svrhu lociranja i lakšeg pročišćavanja proteina ili uvođenje modificiranog gena u genom organizma (Guthrie i Fink, 2002).

Gensko ciljanje je visoko efikasno u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, s obzirom da se popravak dvolančanog loma odvija većinom mehanizmom homologne rekombinacije, dok je popravak nehomolognim spajanjem ravnih krajeva rijedak. Provodi se transformacijom linearnim, nereplicirajućim DNA fragmentom koji sadrži selektivni biljeg i krajeve homologne ciljnom dijelu genoma. Takav transformirajući DNA fragment još se naziva i delecijaska kazeta (Štafa i sur., 2014).

Selektivni biljezi mogu omogućavati rezistenciju na spojeve koji limitiraju rast kvasaca (najčešće antibiotike) ili mogu biti auktotrofni biljezi za sintezu aminokiselina ili nukleotidnih baza koji su često mutirani u laboratorijskim sojevima. Korištenje delecije sa specifičnim selektivnim auktotrofnim biljegom limitirano je na sojeve u kojima je potpuno deletiran gen koji se koristi kao selektivni biljeg. Najčešće su korištene delecije koje nose gen *KanMX4* koji kodira rezistenciju na antibiotik geneticin (Guthrie i Fink, 2002). Auktotrofni biljezi se izbjegavaju jer su, za razliku od biljega za rezistenciju na kemikalije, recesivni. Također se ponekad izbjegavaju jer mogu imati utjecaj na metabolizam stanice, koji se može zamijeniti za utjecaj delecije ciljnog gena i tako ometati funkcionalnu analizu (Fraczek i sur., 2018; Vickers i sur., 2013).

Linearizacija transformirajućeg DNA fragmenta unutar homologne regije potiče ends-in homolognu rekombinaciju, koja je prikazana na slici 4. Nakon sparivanja s ciljnim mjestom u genomu, homologne regije su orijentirane jedna prema drugoj. Do integracije transformirajućeg DNA dolazi ako se Holliday-eve strukture razriješe cijepanjem jednog ukriženog i jednog neukriženog lanca. Vjerojatnost ovakvog razrješenja je 2:2. Prilikom integracije dolazi do duplikacije homologne regije pa može naknadno doći do ponovne homologne rekombinacije između ovih regija i izbacivanja integriranog DNA fragmenta. Ako postoje ikakve razlike između homolognih regija, postoji mogućnost konverzije gena i uvođenja mutacije u ciljni genom. Integracija DNA fragmenta ends-in homolognom rekombinacijom može rezultirati višestrukom ugradnjom fragmenta, dok su ilegitimne ugradnje rijetke (Štafa i sur., 2014; Primrose i Twyman, 2006; Pâques i Haber, 1999; Hastings i sur., 1993).

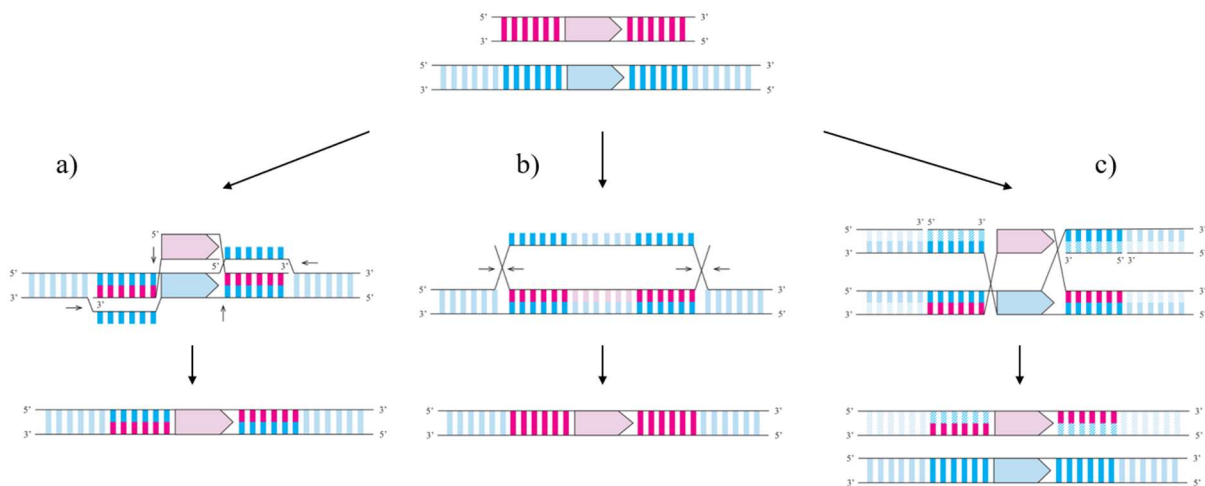


Slika 4. Ends-in homologna rekombinacija a) nastanak DNA molekule s dvije Holliday-eve strukture; b) i c) razrješenje Holliday-eve strukture bez integracije; d) i e) razrješenje Holliday-eve strukture s integracijom; mjesta mogućeg cijepanja lanaca prikazana su strelicama; homologne regije prikazane su tamnijom bojom; novosintetizirani lanci prikazani su šrafirano; radi ilustracije orijentacije fragmenta prilikom integracije prikazan je gen na transformirajućoj DNA (vlastita fotografija)

Do ends-out rekombinacije dolazi ako je transformirajući DNA fragment lineariziran van homologne regije. Ends-out rekombinacija je biološki neznatčan mehanizam, ali predstavlja koristan alat za deleciju gena, pri kojem dolazi do zamjene sekvence između homolognih regija u ciljnom genomu sa sekvencom između homolognih regija na transformirajućem DNA fragmentu. Prilikom sparivanja s ciljnim mjestom u genomu, homologne regije su orijentirane jedna od druge. Do zamjene sekvenci dolazi ako se Holliday-eve strukture razriješe tako da dođe do dvostruke recipročne razmjene. Ovaj model ends-out rekombinacije prikazan je na slici 5.a.

Drugi model, prikazan na slici 5.b, uključuje invaziju jednog od lanaca transformirajućeg DNA fragmenta u homolognu regiju, te popravak nesparenih nukleotida u korist invazirajućeg fragmenta. Također, svaki kraj transformirajućeg DNA fragmenta može inicirati replikaciju koristeći od homolognih regija uzvodni i nizvodni dio kao kalup, pri čemu nastaje kopija kromosoma koja može rekombinirati s originalnim kromosomom ili ga zamijeniti, što je prikazano na slici 5.c.

Ends-out rekombinacija može rezultirati i ilegitimnom ugradnjom ili ugradnjom blizu ciljnog gena (Štafa i sur., 2014; Primrose i Twyman, 2006; Pâques i Haber, 1999; Hastings i sur., 1993).



Slika 5. Ends-out homologna rekombinacija: a) model dvostruke recipročne razmjene; b) model integracije jednog lanca; c) model popravka zasebno svakog kraja, te replikacija kromosoma izazvana lomom; mjesta cijepanja lanaca prikazana su strelicama; homologne regije prikazane su tamnijom bojom; novosintetizirani lanci prikazani su šrafirano (vlastita fotografija)

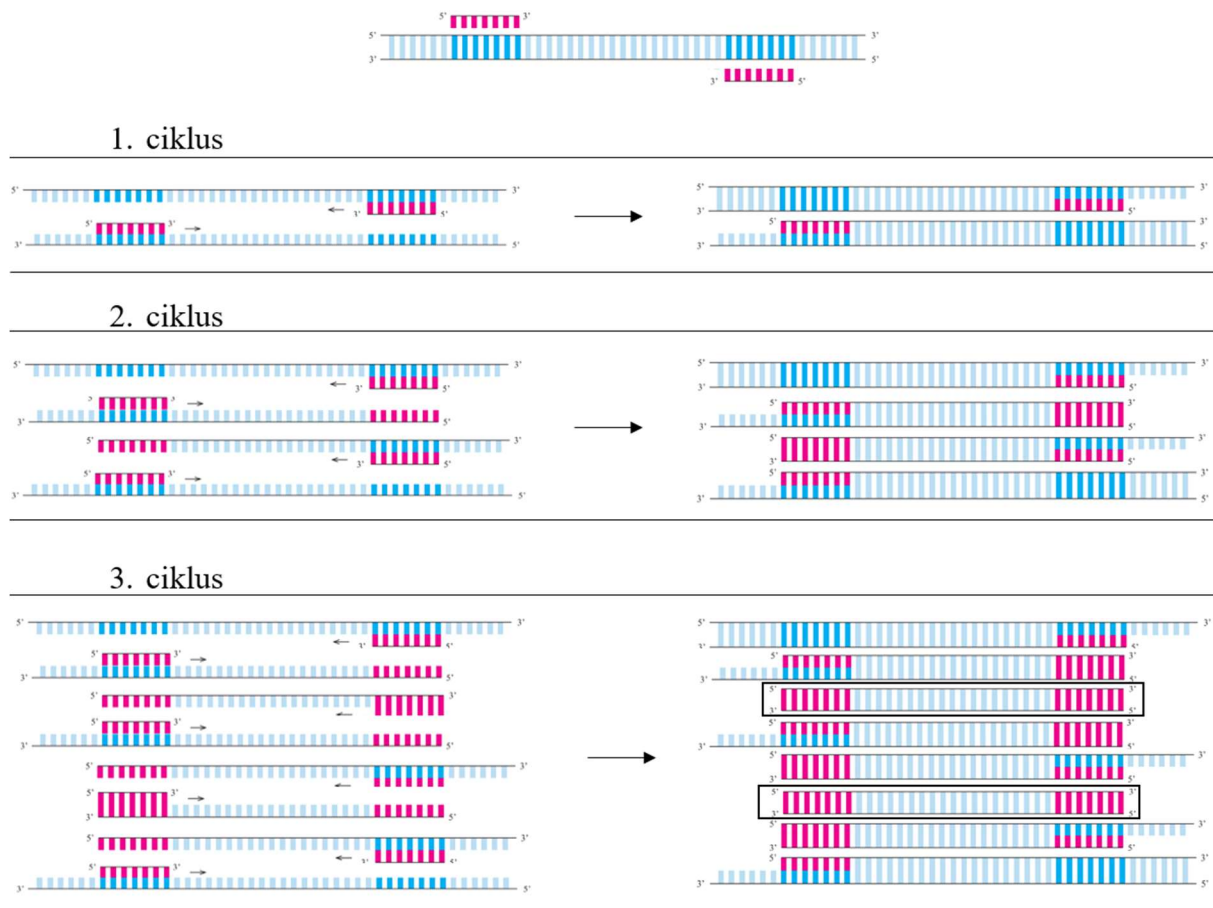
2.4. Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction, PCR*)

Tehnika lančane reakcije polimerazom omogućila je umnažanje nepoznatog DNA fragmenta iz uzorka koji sadrži male količine DNA. U teoriji, za provođenje ove metode potrebna je samo jedna molekula DNA koja sadrži fragment koji želimo umnožiti. Rezultati lančane reakcije polimerazom moraju se potvrditi i analizirati elektroforezom na agaroznom gelu.

Najvažnije komponente reakcijske smjese su oligonukleotidne početnice, DNA fragment koji se umnaža, termostabilna DNA polimeraza i smjesa koja sadrži sve nukleotide u sličnim koncentracijama. Za konstrukciju početnica potrebno je poznavati sekvence uzvodno i nizvodno od fragmenta koji se umnaža. Konstruiraju se tako da su pri komplementarnom sparivanju orijentirane s 3' krajevima jedan prema drugom, pri čemu omeđuju fragment koji se umnaža. Optimalna duljina početnica je 18 - 22 parova baza. Ne smiju sadržavati međusobno komplementarne dijelove radi sprječavanja međusobnog sparivanja i trebaju imati sličnu temperaturu sparivanja (T_m), koja ovisi o sastavu nukleotida.

Koraci jednog ciklusa PCR reakcije obuhvaćaju denaturaciju, komplementarno sparivanje početnica i sintezu DNA, a kontroliraju se promjenom temperature reakcijske smjese. Visoke temperature uzrokuju denaturaciju DNA fragmenta, zatim se naglim spuštanjem na temperaturu sparivanja pospješuje komplementarno vezanje oligonukleotidnih početnica i nastalih jednolančanih DNA fragmenata. Povišenjem temperature na temperaturu replikacije, DNA polimeraza sintetizira lanac od 3' kraja početnice koristeći denaturiranu jednolančanu DNA kao kalup. Ovi koraci se kontinuirano ponavljaju u 25 - 30 ciklusa, pomoću PCR uređaja koji omogućuje brzo i precizno mijenjanje temperature uzorka, te istovremenu obradu više uzoraka. U teoriji, broj umnoženih fragmenata raste eksponencijalno s brojem ciklusa. Međutim, s obzirom da se početnice ne sparuju na samom kraju i početku DNA fragmenta, duljina umnoženih fragmenata je u prva dva ciklusa varijabilna, a dvolančani DNA fragment koji želimo umnožiti može se sintetizirati tek u trećem ciklusu, kao što je prikazano na slici 6.

Zbog visokih temperatura denaturacije poželjno je korištenje termostabilnih DNA polimeraza. Često se koristi Taq polimeraza izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*. S obzirom da ona nema lektorirajuću egzonukleaznu aktivnost, primjenjuju se i druge termostabilne polimeraze s većom vjernosti replikacije (Primrose i Twyman, 2006; Analytical Methods Committee, 2014).



Slika 6. Shematski prikaz umnažanja DNA tijekom prva tri ciklusa PCR-a - početnice su prikazane u ružičastoj boji; mjesto komplementarnog sparivanja prikazano je u tamno plavoj boji; istaknut je fragment koji se umnaža (vlastita fotografija)

2.5. Elektroforeza nukleinskih kiselina

Gel elektroforeza na agaroznom gelu je najjednostavnija metoda vizualizacije i separacije DNA molekula na osnovi veličine. Agaroz je prirodni polimer koji se sastoji od podjedinica arabinoze, a dobija se izolacijom iz algi rodova *Gelidium* i *Gracilaria*. Prilikom gelacije dolazi do stvaranja kovalentnih veza i stvaranja mreže čija veličina pora ovisi o koncentraciji agaroze u otopini.

Agarozni gel nalazi se u blago lužnatom puferu, pa DNA molekule zbog fosfatnih grupa u svojoj okosnici imaju ravnomjerni negativni naboj. Kada su izložene električnoj struji, negativno nabijene molekule DNA kreću se prema pozitivno nabijenoj anodi. Manje molekule DNA lakše prolaze kroz pore, pa se brže kreću kroz gel i s vremenom se odvajaju u zasebne vrpce. Razdvajanje je najuspješnije za fragmente veličine od 100 parova baza do 25 kilobaza. Veličina razdvojenih fragmenata u vrpci se određuje usporedbom s vrpcama nastalih elektroforezom standardne smjese fragmenata DNA poznate veličine.

S uzorcima se na gel nanosi i migracijsko bojilo, koje zbog veće gustoće omogućava bolje utonjenje uzorka u gel i zbog poznate brzine prolaska kroz gel omogućava vizualizaciju napretka elektroforeze.

Brzina prolaska DNA ovisi i o konformaciji molekule DNA. Najbrže prolazi superuvijena kružna, zatim linearna, a najsporiji je prolaz relaksirane kružne DNA. Vrpce se mogu vizualizirati bojenjem etidijevim bromidom koji ima svojstvo interkaliranja s molekulom DNA i flouescencije pod UV svjetlom, ali i drugim bojama koje se vežu na DNA (Lee i sur., 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* soja FF OPO8, koji potječe od kvasca soja FF-52.

Genotip soja FF-52: *MATa, ade5, leu2-3,119, trp1-289, ura3-52, can^R*.

3.1.2. Transformirajuća DNA

Delecijska kazeta *YKU70KanMX4* koja sadrži selektivni biljeg *KanMX4*.

3.1.3. Oligonukleotidi

Nukleotidi nabavljeni od firme Sigma Aldrich čije su karakteristike prikazane u tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike korištenih oligonukleotida

| Naziv | Sekvenca | T _m [°C] |
|-----------|---------------------------|---------------------|
| KanIN-F | 5'-AAAGGTTAGGATTTGCCAC-3' | 51 |
| KanIN-R | 5'-CGAGCATCAAATGAAACTG-3' | 51 |
| YKU70IN-F | 5'-TGAAAAGCAAGTGCGC-3' | 52 |
| YKU70IN-R | 5'-ACGGAACCCAATAATCTTC-3' | 50 |

3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

YPD podloga (tekuća)

| | | |
|---------|------------------|----------|
| Sastav: | bacto pepton | 20 g/L |
| | kvašćev ekstrakt | 10 g/L |
| | glukoza | 20 g/L |
| | destilirana voda | do 50 mL |

Sterilizacija u autoklavu (120 °C/15 min), čuvanje na sobnoj temperaturi.

YPD podloga s dodatkom geneticina (tekuća)

| | | |
|---------|------------------|----------|
| Sastav: | bacto pepton | 20 g/L |
| | kvašćev ekstrakt | 10 g/L |
| | glukoza | 20 g/L |
| | destilirana voda | do 50 mL |

Sterilizacija u autoklavu (120 °C/15 min), dodatak 200 mL otopine geneticina koncentracije 50 mg/mL netom prije nacjepljivanja.

YPD podloga s dodatkom geneticina (kruta)

| | | |
|---------|------------------|-----------|
| Sastav: | bacto pepton | 20 g/L |
| | kvašćev ekstrakt | 10 g/L |
| | glukoza | 20 g/L |
| | agar | 20 g/L |
| | destilirana voda | do 250 mL |

Sterilizacija u autoklavu (120 °C/15 min), dodatak 1 mL otopine geneticina koncentracije 50 mg/mL.

3.1.5. Otopine

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

| | | |
|---------|------------------------|--------|
| Sastav: | EDTA×2H ₂ O | 86,1 g |
| | deionizirana voda | 80 mL |

Podešavanje pH dodatkom NaOH, dopuna destiliranom vodom do 100 mL.

SCE pufer

| | | |
|---------|-----------------|--------|
| Sastav: | sorbitol | 1 M |
| | natrijev citrat | 0,1 M |
| | EDTA (pH 8.0) | 0,12 M |

Priprema iz sterilnih otopina.

Otopina zimoliaze

| | | |
|---------|----------------------|--------|
| Sastav: | Zymolyase 20-T | 15 mg |
| | glicerol (400 mg/mL) | 2,4 mL |
| | deionizirana voda | 600 µL |

Čuvanje na -20°C.

Tris-HCl (1 M, pH 8.0)

| | | |
|---------|-------------------|--------|
| Sastav: | Tris | 12,1 g |
| | deionizirana voda | 80 mL |

Podlašavanje pH dodatkom HCl, dopuna destiliranom vodom do 100 mL.

STE pufer

| | | |
|---------|-------------------|---------|
| Sastav: | SDS | 5 g/L |
| | Tris-HCl (pH 8.0) | 0,1 M |
| | EDTA (pH 8.0) | 0,005 M |

Priprema iz sterilnih otopina.

Otopina kalijevog acetata (3 M, pH 4.8)

| | | |
|---------|------------------------|---------|
| Sastav: | kalijev acetat (5 M) | 60 mL |
| | ledena octena kiselina | 11,5 mL |
| | deionizirana voda | 28,5 mL |

Sterilizacija filtracijom, čuvanje na 4°C.

TE pufer (pH 8.0)

| | | |
|---------|-------------------|-------|
| Sastav: | Tris-HCl (pH 8.0) | 10 mM |
| | EDTA (pH 8.0) | 0,5 M |

Priprema iz sterilnih otopina.

Otopina ribonukleaze A

| | | |
|---------|-------------------|-------|
| Sastav: | ribonukleaza A | 0,3 g |
| | TE pufer (pH 8.0) | 15 mL |

Zagrijavanje u kipućoj vodi (15 minuta), hlađenje na sobnu temperaturu, čuvanje na -20°C.

Otopina amonijevog acetata (8 M)

| | | |
|---------|-------------------|---------|
| Sastav: | amonijev acetat | 61,66 g |
| | deionizirana voda | 100 mL |

Sterilizacija filtracijom, čuvanje na 4°C.

TBE pufer (10× koncentriran):

| | | |
|---------|--------------------|------------|
| Sastav: | Tris | 108 g |
| | borna kiselina | 55 g |
| | EDTA (0.5 M, pH 8) | 40 mL |
| | deionizirana voda | do 1000 mL |

Priprema u koncentriranom obliku, naknadno se razrjeđuje deioniziranom vodom do željene koncentracije, sterilizacija nije potrebna.

Agarozni gel (0,8%)

| | | |
|---------|----------------|--------|
| Sastav: | agaroz | 0,8 g |
| | TBE pufer (1×) | 100 mL |

Otapanje agaroze grijanjem u mikrovalnoj pećnici uz povremeno miješanje.

"Migracijsko bojilo"

| | | |
|---------|-------------------|----------|
| Sastav: | brom-fenol plavo | 2,5 g/L |
| | ksilen cijanol FF | 2,5 g/L |
| | glicerol | 300 mL/L |
| | deionizirana voda | 700 mL/L |

Čuvanje pri 4°C, nije potrebna sterilizacija.

Otopina etidijevog bromida (koncentrirana)

| | | |
|---------|---------------|----------|
| Sastav: | etidij-bromid | 10 mg/mL |
|---------|---------------|----------|

Priprema dodatkom 50 µL koncentrirane otopine u 1 L deionizirane vode, čuvanje u tamnoj boci.

3.1.6. Kemikalije i enzimi

Sorbitol: Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Natrijev citrat: Acros Organics, New Jersey, SAD

Izopropanol: Gram-mol, Zagreb, Hrvatska

Etanol (96%): Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija

Tris: Acros Organics, New Jersey, SAD

| | |
|------------------------------|--|
| Glicerol: | Gram-mol, Zagreb, Hrvatska |
| Kalijev acetat: | Acros Organics, New Jersey, SAD |
| Octena kiselina: | Acros Organics, New Jersey, SAD |
| Amonijev acetat: | Lach-ner, Neratovice, Češka |
| SDS: | Merck, Hohenbrunn, Njemačka |
| Borna kiselina: | Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija |
| Agaroz (Agarose NA): | Pharmacia, Kopenhagen, Danska |
| Zimoliaza (Zymolyase 20-T): | Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan |
| Ribonukleaza A: | Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD |
| Brom-fenol plavo: | Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD |
| Ksilen cijanol FF: | Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD |
| Etidij-bromid: | Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Njemačka |
| Geneticin (G-415 Sulphate) : | Life Tehnologies, Carlsbad, SAD |
| EDTA: | Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija |
| Sastojci hranjive podloge: | Biolife, Milan, Italija |
| | Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija |
| Standard za elektroforezu | |
| (1 kb DNA Ladder): | New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD |
| Komplet kemikalija za PCR: | New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD |

3.2. Metode

3.2.1. Priprema kompetentnih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Alikvotom prethodno uzgojene kulture stanica *Saccharomyces cerevisiae* inokulira se tekuća YPD hranjiva podloga volumena 500 mL, te se inkubira na tresilici preko noći pri 28 °C i 250 o/min do koncentracije $\sim 1 \times 10^8$ stanica/mL (vrijeme udvostručenja kvasca je 2 sata pri 30 °C). Kultura stanica hladi se u ledu 15 minuta u svrhu zaustavljanja rasta. Kultura se zatim podijeli u dvije sterilne boce za centrifugiranje od 250 mL, te se stanice centrifugiraju 5 minuta pri 3000×g pri 4 °C. Supernatant se odlije, a talog stanica se resuspendira u 250 mL ledene vode, homogenizira, pa se zatim ponovno centrifugira. Supernatant se odlije, a postupak ispiranja s ledenom vodom ponovi se još jednom. Talog stanica se resuspendira u 20 mL ledene otopine 1 M sorbitola, homogenizira, te se još jednom centrifugira 5 minuta pri 3000×g pri 4 °C. Talog stanica se resuspendira u 0,5 mL ledene otopine 1 M sorbitola. Krajnja suspenzija ima volumen $\sim 1,3$ mL i koncentraciju $\sim 1 \times 10^{10}$ stanica/mL. Čuva se u ledu do elektroporacije.

3.2.2. Transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* metodom elektroporacije

Elektroporacija se provodi pomoću uređaja Bio-Rad Micropulser. Uzorak transformirajuće DNA volumena 5 µL u kojem se nalazi 5 - 100 ng DNA se otpipetira u mikrokivetu volumena 1,5 mL i stavi u led. Doda se 40 µL prethodno pripravljene suspenzije kompetentnih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Lagano se promiješa okretanjem mikrokivete i inkubira u ledu ~ 5 minuta. Uređaj za elektroporaciju namjesti se na program Sc2 (jedan visokovoltazni puls od 2,5 kV u trajanju od 5 milisekunda). Smjesa transformirajuće DNA i kompetentnih stanica kvasca prebaci se u kivetu za elektroporaciju debljine stijenki 0,2 cm koja je prethodno ohlađena u ledu. Kiveta se umetne u otvor za kivetu u uređaju za elektroporaciju. Pulsira se jednom, odmah doda 1 mL ledene otopine 1 M sorbitola i prebaci u sterilnu epruvetu.

3.2.3. Selekcija transformanata kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Transformirane stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* selekcioniraju se nacjepljivanjem na krutu YPD hranjivu podlogu s dodatkom geneticina. Podloge se inkubiraju 48 - 72 sata pri 28 °C. Četiri nasumična transformanta se nacjepljuju u tekuću YPD hranjivu podlogu s dodatkom geneticina volumena 3 mL, te se inkubiraju na tresilici 48 - 72 sata pri 28 °C i 250 o/min.

3.2.4. Izolacija DNA iz kulture stanica transformanata kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Iz kulture transformanata uzgojenih u tekućoj podlozi se izdvajaju stanice transformanata. U mikrokivetu se otpipetira 1,5 mL homogenizirane kulture transformanata, pa se centrifugira 3 minute pri 5000 o/min. Supernatant se odlije, te se u mikrokivetu doda još 1,5 mL kulture transformanata. Suspenzija se homogenizira, pa se zatim ponovno centrifugira pri istim uvjetima. Supernatant se odlije, a talog se ispiri dodatkom 1 mL vode, homogenizira i centrifugira pri istim uvjetima. Supernatant se odlije, te se postupak ispiranja vodom ponovi još jednom. Talog se zatim na isti način dva puta ispiri s 1 mL SCF pufera. Talog se resuspendira u 200 μ L SCF pufera. Liza stanica se provodi dodatkom 20 μ L enzima zimolijaze. Suspenzija se lagano promiješa okretanjem kivete i inkubira 1 sat na 37 °C. Zatim se doda 800 μ L STE pufera, ponovno se lagano promiješa okretanjem kivete, te se inkubira još 20 minuta na 70 °C. Enzimska reakcija se zaustavlja hlađenjem u ledu 10 minuta. Proteini se iz suspenzije uklanjaju taloženjem. Lizatu stanica se doda 200 μ L kalijevog acetata, lagano se promiješa okretanjem kivete i inkubira preko noći na 4 °C. Proteini se talože centrifugiranjem 20 minuta na 12000 o/min pri 4 °C. U novu kivetu se pažljivo otpipetira 930 μ L supernatanta pazeći da u njemu nema vidljivog taloga proteina, te se nukleinske kiseline talože dodatkom 660 μ L izopropanola i centrifugiranjem 20 minuta pri 12000 o/min i 4 °C. Supernatant se odlije i ostatak tekućine pažljivo ukloni vakuum sisaljkom. Talog se resuspendira u 300 μ L TE pufera, te se RNA uklanja dodatkom 1 μ L otopine ribonukleaze A. Inkubira se na 70 °C dok se talog potpuno ne otopi. Dodaje se 100 μ L amonijevog acetata i 800 μ L 96 %-tnog etanola, te se promiješa okretanjem mikrokivete. DNA se taloži minimalno 2 sata pri 4 °C, pa se zatim centrifugira 20 minuta pri 12000 o/min i 4 °C. Supernatant se odlije, ostatak tekućine se ukloni pomoću vakuum sisaljke, a talog se suši u otvorenoj mikrokiveti u blizini plamenika. Osušeni talog se otopi u 50 μ L TE pufera.

3.2.5. Elektroforeza izolirane genomske DNA

Elektroforeza se provodi na agaroznom gelu pomoću uređaja Mini-sub cell GT tvrtke Bio Rad. Pripremljena otopina 0,8 %-tnog agaroznog gela u TBE puferu se, nakon otapanja agaroze zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici do vrenja uz povremeno miješanje, ohladi na 60 °C. Nosač agaroznog gela pripremi se tako da se otvoreni krajevi nosača oblijepe ljepljivom trakom, te se umetne "češalj" za formiranje jažica.

U nosač se ulije pripremljena otopina agaroznog gela do debljine oko 5 mm. Kada se gel skrutne treba pažljivo ukloniti ljepljivu traku s nosača i postaviti ga u kadicu za elektroforezu. Zatim se ukloni "češalj" za formiranje jažica i u kadicu se ulije 1× koncentrirani TBE pufer tako da ispuni jažice i prekrije gel. Mikropipetom se uzorci izoliranih genomskih DNA pomiješaju s migracijskim bojilom u omjeru 6:1 i nanose u jažice gela. U prvu jažicu nanese se standard Quick-Load® 1 kb DNA Ladder tvrtke New England Biolabs. Kadica za elektroforezu se poklopi, priključe se elektrode i uključi struja. Elektroforeza se provodi pri 8 - 12 V/cm, a trajanje se procjenjuje praćenjem kretanja komponenti migracijskog bojila. DNA se vizualizira inkubiranjem gela 20 minuta u otopini etidijevog bromida i osvjetljivanjem UV svjetlom u transiluminatoru. Gel se može fotografirati kroz crveni filter.

3.2.6. Analiza lančanom reakcijom polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR)

Koristi se DNA polimeraza tvrtke New England Biolabs - Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491). U mikrokiveti se pripremi reakcijska otopina za PCR ukupnog volumena 50 µL prema uputama proizvođača. Doda se 32,5 µL vode, 10 µL 10× koncentriranog pufera, 1 µL otopine izolirane genomske DNA, 1 µL smjese dNTP u kojoj je koncentracija svakog pojedinog nukleotida 2 mM, 2,5 µL otopina početnice F i početnice R koncentracije 10 µM i 0,5 µL Q5 DNA polimeraze. Zasebna reakcijska smjesa pripravlja se za izoliranu genomsku DNA sva četiri transformanta, prvo s KanIN-F i KanIN-R početnicama, pa zatim s YKU70IN-F i YKU70IN-R početnicama. PCR analiza se provodi u uređaju Mastercycler personal s grijanim poklopcem (Eppendorf, Hamburg). Reakcijske smjese se dobro promiješaju i stave u uređaj, te se pokrene unaprijed isprogramiran ciklus. Nakon početne denaturacije pri 98 °C u trajanju 30 sekundi obavlja se 30 ciklusa denaturacije pri 98 °C u trajanju 10 sekundi, sparivanja početnica pri 55 °C u trajanju 20 sekundi i sinteze DNA pri 72 °C u trajanju 60 sekundi. Ciklus se završava završnom sintezom DNA pri 72 °C u trajanju 120 sekundi i hlađenjem. Uzorci umnoženi PCR metodom analiziraju se elektroforezom na agaroznom gelu (po istom postupku kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je delecija gena *YKU70* u genomu kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Sistemsko ime ovog gena je YMR284W, nalazi se na kromosomu XIII, a ORF ovog gena je dug 1809 parova baza. Kodira podjedinicu Ku kompleksa čija je funkcija poticanje popravka dvolančanog loma mehanizmom nehomolognog spajanja krajeva i održavanje stabilnosti telomera. Manjak kompleksa Ku u stanici rezultira aktivacijom mehanizama popravka s velikom vjerojatnošću pogreške, te skraćivanjem telomera (SGD, 2023b; Boulton i Jackson, 1996).

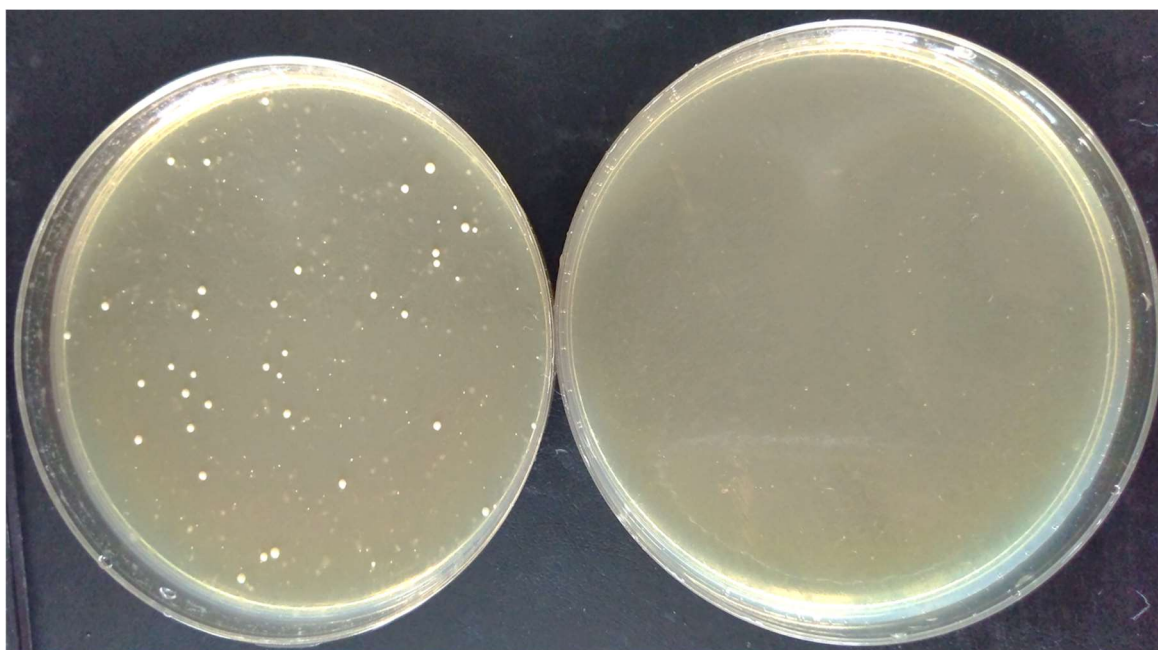
Korišteni soj FF OPO8 dobiven je transformacijom soja FF18-52 plazmidom pAB218-2 kao što je opisano u radu Lisnić i sur. (2009). Genotip korištenog soja naveden je u poglavlju 3.1.1. Radi se o haploidnom obliku kvasca tipa parenja MATa, s auksotrofnim mutacijama u genima za sintezu adenina, leucina, triptofana i uracila, koji je osjetljiv na antibiotik geneticin.

Delecija je provedena pomoću delecijске kazete *YKU70KanMX4* koja sadrži selektivni biljeg *KanMX4* koji omogućava selekciju transformanata pomoću antibiotika geneticina, te krajeve homologne regijama DNA koje se nalazi uzvodno i nizvodno od ORF-a gena *YKU70* u genomu kvasca. Postupak konstrukcije opisan je u završnom radu Potkonjak (2022). Konstruirana je pomoću PCR-a, korištenjem DNA izolirane iz soja kvasca u kojem je u gen *YKU70* insertiran selektivni biljeg *KanMX4*, te je umnažanje provedeno pomoću početnica koje se komplementarno sparuju s regijama uzvodno i nizvodno od ORF-a gena *YKU70* u genomu kvasca.

Rezultati transformacije kvasca FF OPO8 navedenom delecijском kazetom opisani su u poglavlju 4.1. Nakon toga je iz nekoliko odabranih transformanata izolirana genomska DNA (poglavlje 4.2.), a zatim je provedena molekularna analiza pomoću PCR-a s ciljem da se utvrdi je li ciljni gen *YKU70* uspješno deletiran iz genoma kvasca (poglavlje 4.3.).

4.1. Transformacija kvasca i selekcija transformanata

Kao što je već navedeno, kvasac *S. cerevisiae*, soj FFOPO8 transformiran je delecijском kazetom *YKU70KanMX4*. Nakon pripreme kompetentnih stanica kvasca, po postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. i provedbe transformacije po postupku opisanom u poglavlju 3.2.2., potrebno je provesti selekciju transformanata. Selekcija se vrši naciepljivanjem na krutu hranjivu podlogu koja sadrži antibiotik geneticin (po postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.), obzirom da transformirajuća DNA sadrži selektivni biljeg *KanMX4* koji je zaslužan za rezistenciju na antibiotik geneticin. Također, provedena je kontrola tako da je postupak transformacije ponovljen bez dodatka transformirajuće DNA, te je suspenzija tih stanica kvasca također naciepljena na hranjivu podlogu koja sadrži geneticin. Za očekivati je da će doći do rasta samo na podlozi na koju je naciepljena suspenzija stanica transformiranih metodom elektroporacije uz prisutnost delecijske kazete *YKU70KanMX4*. Rezultati transformacije prikazani su na slici 7.

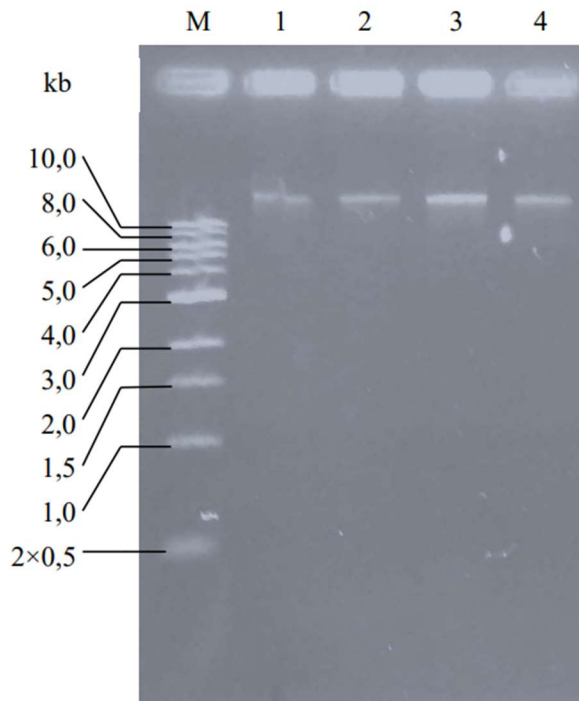


Slika 7. Rezultat transformacije kvasca *S. cerevisiae* FF OPO8 s delecijском kazetom *YKU70KanMX4*. Nakon provedenog postupka transformacije, transformacijska smjesa naciepljena je na YPD podlogu s dodatkom geneticina; selekcionirani transformanti (lijevo); kontrola bez dodatka transformirajuće DNA (desno) (vlastita fotografija)

Kao što je vidljivo na slici 7., do rasta je došlo samo na podlozi na koju je naci jepljena suspenzija stanica transformiranih metodom elektroporacije uz prisutnost delecije kazete *YKU70KanMX4*. Iz broja izraslih kolonija je vidljivo da je, sukladno očekivanjima, samo manji broj stanica u suspenziji s kojom smo naci jepili podlogu uspješno transformiran. Nakon toga, odabrani transformanti se naci jepuju na tekuću hranjivu podlogu koja sadrži genetin u svrhu uzgoja čiste kulture transformanata.

4.2. Izolacija genomske DNA transformanata

Iz odabranih transformanata izolira se DNA, po postupku koji je opisan u poglavlju 3.2.4., te se uspješnost izolacije mora potvrditi elektroforezom uzorka na agaroznom gelu, kao što je opisano u poglavlju 3.2.5. Rezultat izolacije genomske DNA iz četiri nasumično odabrana transformanta prikazan je na slici 8.



2

Slika 8. Rezultat izolacije genomske DNA iz odabranih transformanata. Uzorci prikazani na gelu: M – standard (Quick-Load® 1 kb DNA Ladder tvrtke New England Biolabs); 1-4 – uzorci izolirane DNA iz četiri različita transformanta (vlastita fotografija)

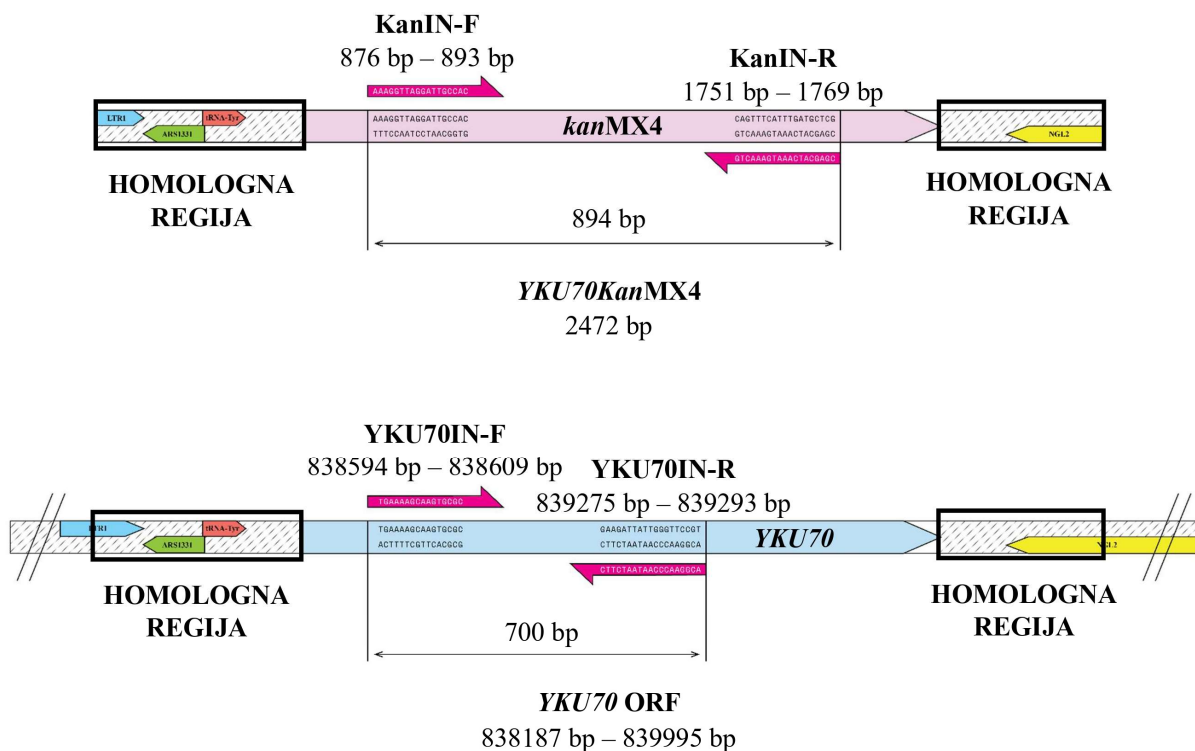
Na slici 8. vidljivo je da je genomski DNA uspješno izolirana iz sva četiri odabrana transformanta. Uslijed mehaničkih sila tijekom postupka izolacije, genomski DNA se nasumično kida na fragmente duljina 40-50 kb (Sambrook and Russel, 2001). Obzirom da su to veliki fragmenti koji se ne razdvajaju u standardnoj 0,8% agaroznoj elektroforezi, očekivani rezultat izolacije genomski DNA je jedna vrpca sabijena u gornjem dijelu gela, kao što je i vidljivo na slici 8.

4.3. Molekularna analiza transformanata kvasca

Nakon potvrde uspješne izolacije DNA iz odabranih transformanata, pristupa se analizi izolirane DNA u svrhu potvrde uspješne delecije gena *YKU70* i ugradnje selektivnog biljega *KanMX4*. Analiza se provodi PCR metodom, po postupku opisanom u poglavlju 3.2.6., pri čemu se koriste početnice KanIN-F i KanIN-R koje se komplementarno sparuju sa sekvencama unutar selektivnog biljega *KanMX4*, te početnice YKU70IN-F i YKU70IN-R koje se komplementarno sparuju sa sekvencama unutar gena *YKU70* u genomu kvasca.

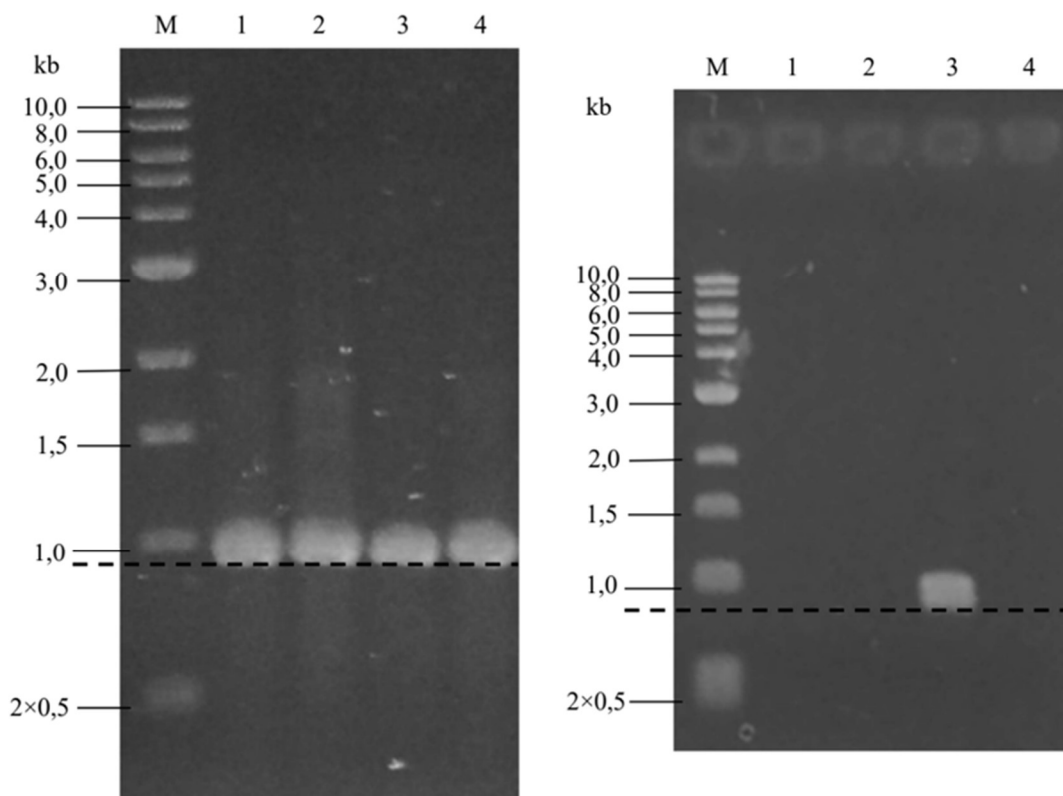
Rezultati PCR analize provjeravaju se elektroforezom na agaroznom gelu. Ako je na gelu vidljiva vrpca, može se zaključiti da se gen, s kojim se korištene sekvence komplementarno sparuju i koji sadrži umnoženu sekvencu, nalazi negdje u izoliranoj genomskoj DNA u ispitivanom uzorku. S obzirom da je duljina umnožene sekvence poznata, usporedbom položaja nastale vrpce s vrpcama nastalih elektroforezom standarda potvrđuje se da se u izoliranoj vrpici zaista nalazi očekivana umnožena sekvencu. Ponovno je korišten isti standard Quick-Load® 1 kb DNA Ladder koji sadrži DNA fragmente poznatih duljina u rasponu od 500 bp do 10 kb.

Delecijska kazeta *YKU70KanMX4* i dio kromosoma XIII na kojem se nalazi ORF gena *YKU70* kao i regije međusobne homologije prikazane su na slici 9. Također, prikazana su mjesta komplementarnog sparivanja početnica i očekivane duljine PCR metodom umnoženih fragmenata.



Slika 9. Shematski prikaz delecijske kazete *YKU70KanMX4* (gore) i ORF-a gena *YKU70* na kromosomu XIII (dolje) (vlastita fotografija)

Za očekivati je da će rezultat PCR analize uz korištenje početnica koje se komplementarno sparuju unutar selektivnog biljega *KanMX4* biti pozitivan za sve transformante zbog toga što su već prethodno selekcionirani uzgojem na podlozi s dodatkom genicina. Također, očekuje se negativan rezultat PCR analize uz korištenje početnica koje se komplementarno sparuju unutar gena *YKU70*, s obzirom da je korištena delecijaska kazeta *YKU70KanMX4* konstruirana tako da sadrži krajeve homologne sekvencama uzvodno i nizvodno od gena *YKU70*, što znači da je za očekivati da će ugradnja selektivnog biljega *KanMX4* rezultirati istovremenom delecijom gena *YKU70*. Rezultat molekularne analize transformanata pomoću PCR-a prikazan je na slici 10.



Slika 10. Rezultat molekularne analize transformanata pomoću PCR-a. Uzorci u jažicama: M – standard (Quick-Load® 1 kb DNA Ladder tvrtke New England Biolabs); 1-4 – uzorci izolirane DNA iz četiri različita transformanta umnoženi PCR metodom uz korištenje početnica KanIN-F i KanIN-R (lijevo); početnica YKU70IN-F i YKU70IN-R (desno) (vlastita fotografija)

U skladu s očekivanjima, na gelu s uzorcima koju su umnoženi PCR metodom uz korištenje početnica KanIN-F i KanIN-R, vidljive su vrpce koje odgovaraju očekivanim fragmentima. Može se zaključiti da je u svim analiziranim transformantima zaista došlo do integracije transformirajuće DNA u genom kvasca. Međutim, kao što je vidljivo na slici 10., u trećem transformantu nije došlo do istovremene delecije gena *YKU70*. Stoga je moguće da je u navedenom transformantu došlo do ilegitimne integracije transformirajuće DNA ili do duplikacije ciljnog kromosoma, pri čemu je samo na jednoj kopiji kromosoma došlo do uspješne zamjene gena. Analizom pomoću PCR metode provedene u ovom radu nije moguće zaključiti na kojem mjestu je došlo do integracije transformirajuće DNA, niti je li došlo do višestuke ugradnje u genom kvasca, pa će stoga navedeni transformanti biti podvrgnuti daljnjim molekularnim analizama. Međutim, najveća je vjerojatnost da tri od četiri transformanta zaista imaju željeni genotip.

5. ZAKLJUČAK

Soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* FF OPO8 *yku70*Δ uspješno je konstruiran.

6. POPIS LITERATURE

Analytical Methods Committee (2014) PCR-the polymerase chain reaction. *Analytical Methods* **6**, 333–336. <https://doi.org/10.1039/c3ay90101g>

Boulton SJ, Jackson SP (1996) Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* **24**, 4639. <https://doi.org/10.1093/NAR/24.23.4639>

Fattah,F.J., Lichter, N.F., Fattah,K.R., Oh,S., Hendrickson,E.A. (2008) Ku70, an essential gene, modulates the frequency of rAAV-mediated gene targeting in human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 8703–8708. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712060105>

Fraczek MG, Naseeb S, Delneri D (2018) History of genome editing in yeast. *Yeast* **35**, 361–368. <https://doi.org/10.1002/yea.3308>

Guthrie Christine, Fink GR (2002) Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. Part B, 1. izd. Academic Press, Amsterdam.

Haber JE (2012) Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 33–64. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.134577>

Hastings PJ, McGill C, Shafer B, Strathern JN (1993) Ends-in Vs. Ends-Out Recombination in Yeast. *Genetics* **135**, 973. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/135.4.973>

Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp* 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>

Lisnić B, Svetec IK, Štafa A, Zgaga Z (2009) Size-dependent palindrome-induced intrachromosomal recombination in yeast. *DNA Repair (Amst)* **8**, 383–389. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2008.11.017>

Mourrain L, Boissonneault G (2021) Dna repair in haploid context. *Int J Mol Sci* **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms222212418>

Pâques F, Haber JE (1999) Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 349. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.349-404.1999>

Potkonjak L (2022) Uporaba lančane reakcije polimerazom u sintezi fragmenta DNA za inaktivaciju kvašičevog gena YKU70 (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Primrose SB, Twyman RM (2006) Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7. izd. Blackwell Publishing, Oxford.

Sambrook JF, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 izd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Skoneczna A, Kaniak A, Skoneczny M (2015) Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms. *FEMS Microbiol Rev* **39**, 917–967. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv028>

Smekenov I, Bakhtambayeva M, Bissenbayev K, Saparbayev M, Taipakova S, Bissenbaev AK (2020) Heterologous secretory expression of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian Journal of Microbiology* **51**, 107–123. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00192-1>

Štafa A, Miklenić M, Žunar B, Lisnić B, Symington LS, Svetec IK (2014) Sgs1 and Exo1 suppress targeted chromosome duplication during ends-in and ends-out gene targeting. *DNA Repair (Amst)* **22**, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.07.004>

Tamarin RH (1999) Principles of genetics, 6. izd., WCB/McGraw-Hill, Boston.

Vickers CE, Bydder SF, Zhou Y, Nielsen LK (2013) Dual gene expression cassette vectors with antibiotic selection markers for engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* **12**. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-96>

Yang Z, Blenner M (2020) Genome editing systems across yeast species. *Curr Opin Biotechnol* **66**, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.011>

Saccharomyces Genome Database (2023a) *Saccharomyces cerevisiae* Genome Overview
SGD. <https://www.yeastgenome.org/genomesnapshot>. Pristupljeno 3. lipnja 2023.

Saccharomyces Genome Database (2023b) YKU70 | SGD.
<https://www.yeastgenome.org/locus/S000004897>. Pristupljeno 4. lipnja 2023.

Izjava o izvornosti

Ja, Antea Melvan, 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.


Vlastoručni potpis