

Pojačana ekspresija alela YAP1C620F povećava otpornost kvasca na octenu kiselinu i 2-furaldehid

Leitner, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:299267>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Prediplomski studij Biotehnologija

Nina Leitner

7277/BT

**Pojačana ekspresija alela *YAP1*^{C620F} povećava otpornost kvasca
na octenu kiselinu i 2-furaldehid**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

Mentor: doc. dr. sc. Anamarija Štafa

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Pojačana ekspresija alela *YAP1^{C620F}* povećava otpornost kvasca na
octenu kiselinu i 2-furaldehid**
Nina Leitner, 0058208941

Sažetak:

Svjetske zalihe fosilnih goriva se smanjuju, a zbog onečišćenja okoliša uzrokovanog njihovom prekomjernom upotrebom potrebno je naći ekonomičniju i održiviju alternativu. Proizvodnja bioetanola pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, koristeći obnovljivi izvor, lignocelulozne sirovine, jedna je od alternativa za proizvodnju goriva. Kvasac ne može direktno fermentirati lignocelulozne sirovine te ih je stoga potrebno prvo hidrolizirati kako bi se oslobodili fermentabilni šećeri, ali predtretmanom lignoceluloznih sirovina nastaju i inhibitori koji usporavaju ili onemogućuju rast mikroorganizama te se stoga mnoga istraživanja temelje na konstrukciji proizvodnih sojeva otpornih na inhibitore rasta. U ovome radu transformiran je soj kvasca Žup ura- plazmidom pSP-YAP1-C620F koji omogućuje pojačanu ekspresiju konstitutivno aktivnog alela *YAP1^{C620F}*, za kojeg je pokazano da povećava otpornost nekih sojeva kvasca *S. cerevisiae* na inhibitore rasta. Konstruirani soj Žup YAP1^{C620F} pokazao je veću otpornost na octenu kiselinu i 2-furaldehid u usporedbi sa sojem koji ima pojačanu ekspresiju divljeg tipa gena *YAP1*.

Ključne riječi: kvasac, transformacija, gen *YAP1*, lignocelulozne sirovine, inhibitori rasta

Rad sadrži: 29 stranica, 7 slika, 2 tablice, 69 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

Mentor: doc. dr. sc. Anamarija Štafa

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

Datum obrane: 14. lipnja 2019

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory of Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Overexpression of the *YAP1*^{C620F} allele increases resistance of the yeast to acetic acid and 2-furaldehyde

Nina Leitner, 0058208941

Abstract:

World supplies of fossil fuels are decreasing and, due to the environmental pollution caused by their excessive use, it is necessary to find a more economical and a more sustainable alternative. Fermentation of renewable lignocellulose substrates to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the alternatives for fuel production. Since yeast cannot directly ferment lignocellulose substrates, it is first necessary to hydrolase lignocellulose in order to release fermentable sugars. Moreover, during the pretreatment of lignocellulose biomass, different inhibitors that slow down or inhibit growth of microorganisms are formed. Therefore, various attempts have been made to construct a production strain that will be resistant to those growth inhibitors. In this research, the yeast strain Žup ura- was transformed with the pSP-YAP1-C620F plasmid that enables overexpression of constitutively active gene *YAP1*^{C620F} that, for some strains of the yeast *S. cerevisiae*, increases resistance to growth inhibitors. Constructed strain with overexpression of *YAP1*^{C620F} allele indeed displayed increased resistance to acetic acid and 2-furaldehyde in comparison to a strain that has overexpression of the wild type *YAP1* gene.

Keywords: yeast, transformation, *YAP1* gene, lignocellulosic substrates, growth inhibitors

Thesis contains: 29 pages, 7 figures, 2 tables, 69 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic (pdf format) version deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Assist. Prof. Anamarija Štafa, Ph.D.

Technical support and assistance: Assist. Prof. Anamarija Štafa, Ph.D.

Defence date: 14th June 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1.1. Transformacija kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2. Lignocelulozne sirovine	5
2.3. Genetičke modifikacije kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> koje omogućuju povećanu otpornost na inhibitore rasta	7
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Plazmidi	9
3.1.2. Mikroorganizmi	9
3.1.3. Hranjive podloge i otopine	10
3.1.4. Otopine i kompleti kemikalija za izolaciju DNA	11
3.1.5. Otopine za gel-elektroforezu	12
3.1.6. Otopine za transformaciju kvasca	12
3.1.7. Otopine za molekularnu analizu hibridizacijom DNA po Southern-u	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Izolacija plazmidne DNA bakterije <i>E. coli</i>	14
3.2.2. Gel elektroforeza	14
3.2.3. Transformacija kvasca pomoću litij acetata	14
3.2.4. Izolacija genomske DNA kvasca	14
3.2.5. Hibridizacija DNA po Southern-u	15
3.2.6. Određivanje otpornosti sojeva kvasca na inhibitore rasta	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Provjera uspješnosti izolacije plazmidne DNA	17
4.2. Transformacija kvasca Žup ura- replikativnim plazmidom pSP-YAP1-C620F	18
4.3. Molekularna analiza transformanata hibridizacijom po Southern-u	19
4.4. Utjecaj pojačane ekspresije gena <i>YAP1^{C620F}</i> na rezistenciju na inhibitore rasta	20
5. ZAKLJUČAK	22
6. LITERATURA	23

1. UVOD

Smanjenje količine dostupnih fosilnih izvora energije i zagađenje okoliša povezano s njihovom upotrebom dovelo je do rastuće potrebe za proizvodnjom biogoriva iz obnovljivih izvora, kao što je na primjer proizvodnja bioetanola pomoću mikroorganizama. Iako je proizvodnja bioetanola iz sirovina bogatih škrobom relativno jednostavna, ove sirovine se koriste i u prehrambene svrhe pa je njihovo korištenje neetično. Zbog toga, naglasak je stavljen na proizvodnju bioetanola iz široko dostupnih lignoceluloznih sirovina, kao što su poljoprivredni ostaci i ostaci drvene biomase (Zaldivar i sur., 2001). Kako mikroorganizmi ne mogu direktno fermentirati lignocelulozne sirovine, ove je sirovine potrebno prvo obraditi, to jest hidrolizirati kako bi se oslobodili fermentabilni šećeri. Predobrada zahtijeva korištenje enzima ili kemikalija, što poskupljuje cijenu konačnog proizvoda, a hidrolizom nastaje i niz spojeva kao što su octena i levulinska kiselina te furaldehid koji djeluju kao inhibitori rasta i fermentacije.

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* stoljećima se koristi za proizvodnju etanola. Ova jednostanična gljiva prvi je eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran, a zbog relativno jednostavnog uvođenja ciljanih genetičkih modifikacija izrazito je pogodan za konstrukciju različitih proizvodnih sojeva. Upravo zbog toga, metodama genetičkog inženjerstva konstruiraju se proizvodni sojevi otporni na inhibitore rasta i fermentacije koji nastaju hidrolizom lignoceluloznih sirovina.

U ovome radu opisana je transformacija soja kvasca Županja ura- plazmidom pSP-YAP1-C620F koji omogućuje pojačanu ekspresiju gena *YAP1^{C620F}*. Alel *YAP1^{C620F}* kodira za konstitutivno aktivan transkripcijski faktor Yap1 koji, nekim sojevima kvasca, omogućuje povećanu otpornost na furfural i hidroksi-metil-furfural (Kim i Hahn, 2013). Prisustvo plazmida u transformantima potvrđeno je hibridizacijom po Southern-u, a konstruiranim sojevima određena je otpornost na octenu i levulinsku kiselinu te furaldehid i uspoređena je s osjetljivošću soja koji sadrži plazmid, koji ima pojačanu ekspresiju divljeg tipa gena *YAP1*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanična je gljiva iz porodice *Ascomycetes*, a od davnina se koristi za proizvodnju kruha i alkoholnih proizvoda. U dvadesetom stoljeću postao je i najjednostavniji eukariotski modelni organizam, a ujedno je i prvi eukariot kojem je genom u potpunosti sekvencioniran (Goffeau i sur., 1996). Kvasac *S. cerevisiae* brzo raste, jednostavno se uzgaja te je izrazito jednostavno unositi ciljane modifikacije u njegov genom pa tako danas postoje i knjižnice mutanata u kojima su inaktivirani pojedinačni geni.

Haploidna stanica kvasca ima 16 kromosoma te 6183 ORF-ova (Sherman, 2002). Lokus *Mating type (MAT)* na III. kvašćevom kromosomu određuje tip parenja stanica - stanice s alelom *MATa* imaju **a**-tip parenja, dok one s lokusom *MATα* imaju **α**-tipa parenja (MacKay i Manney, 1974; Strathern i sur., 1981). Ukoliko stanica sadrži oba alela *MAT* bit će **a/α** tipa parenja. Na III. kromosomu, osim lokusa *MAT*, nalaze se i utišani lokusi *HMLα* i *HMRa*, koji također sadrže informaciju za **α**-tip odnosno **a**-tip parenja (Herskowitz, 1988). Prirodni izolati kvasca homotalični su sojevi u kojima stanica majka nakon svake mijenja tip parenja. Promjena tipa parenja inducirana je endonukleazom Ho, koja uvodi dvolančani lom u lokus *MAT* pri čemu se, ako je lom uveden u lokus *MATa* kao donor informacije koristi lokus *HMLα*, a ako je lom uveden u lokus *MATα*, kao donor koristi lokus *HMRa*. Za razliku od homotaličnih sojeva, većina laboratorijskih sojeva je heterotalična, i ima stabilan tip parenja, zbog inaktivacije gena *HO* (Hicks i Herskowitz, 1976; Strathern i Herskowitz, 1979).

Kvasac *S. cerevisiae* razmnožava se pupanjem u haploidnom obliku (stanice **a**- ili **α**-tipa parenja) ili diploidnom obliku (stanice **a/α** tipa parenja) (Herskowitz, 1988). Stanice **α**-tipa parenja sadrže gene koji kodiraju za receptore za feromone koje luče stanice **a**-tipa parenja, **α1** – aktivirajući protein koji potiče transkripciju gena koji kodiraju za **α**-tip parenja (Sprague i sur., 1983) te represor **α2** koji onemogućuje transkripciju gena odgovornih za ispoljavanje svojstava **a**-tipa parenja (Hartig i sur., 1986; Wilson i Herskowitz, 1984). Stanice **a**-tipa parenja sadrže gene koji kodiraju za receptore koje luče stanice **α**-tipa parenja (Strathern i sur., 1981), a stanice **a/α** tipa parenja ne proizvode niti jedan tip receptora. Represor **α2** reprimira sintezu produkata tipičnih za stanicu **a**-tipa parenja (Herskowitz, 1988), kompleks **a1-α2** (**a1** je produkt gena *MATa*) reprimira sintezu aktivatora **α1** i haploid-specifične gene potrebne za parenje (*STE4*, *STE5* i *STE12*) (Strathern i sur., 1981). Stanice različitog tipa parenja mogu međusobno konjugirati čime nastaje diploidna stanica **a/α** tipa parenja ili svaka od stanica može ući u svoj haploidni stanični ciklus.

Stanice **a/a** tipa parenja ne mogu se pariti sa haploidnim stanicama, ali mogu ući u mejozu, čiji su rezultat četiri haploidne stanice, dvije **a**-tipa parenja te dvije **α**-tipa parenja (Herskowitz, 1988).

2.1.1. Transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Pod pojmom genetička transformacija podrazumijeva se ulazak strane DNA u stanicu koji dovodi do promjene genotipa i fenotipa stanice. Postoji više metoda za transformaciju kvasca kao što su: transformacija pomoću litij acetata, elektroporacija ili transformacija protoplastiranjem (Kawai i sur., 2010). Ovisno o tipu genetičke modifikacije, DNA koja se koristi za transformaciju može biti kružna ili linearna, a mora sadržavati biljeg za selekciju transformiranih stanica. Nakon transformacije, stanice se nacjepljuju na selektivnu podlogu i nakon rasta analiziraju molekularnim metodama (lančanom reakcijom polimeraze i/ili hibridizacijom po Southern-u).

2.1.1.1. Vektori za transformaciju kvasca *S. cerevisiae*

Vektori koji se u genetičkom inženjerstvu koriste za transformaciju kvasca mogu biti replikativni i nereplikativni. Replikativni vektori sadrže ishodište replikacije te se stoga mogu samostalno replicirati u stanici. Za razliku od replikativnih, nereplikativni ili integrativni vektori, ne mogu se samostalno replicirati te se, da bi transformirali stanicu, moraju ugraditi u kvašćevu DNA.

Replikativni vektori za kvasac *S. cerevisiae* su: YEp ("Yeast Episomal plasmid"), YRp ("Yeast Replicative plasmid"), YCp ("Yeast Centromeric plasmid") i YAC ("Yeast Artificial Chromosome") (Brown, 2010, Slika 1).

➤ "Yeast Episomal plasmid" (YEp)

YEp je derivat prirodnog kvašćevog plazmida 2μm, može sadržavati cijeli plazmid 2μm ili samo dio koji uključuje ishodište replikacije. Plazmid 2μm veličine je 6 kb i u svim se kvašćevim stanicama nalazi u 70 do 200 kopija. Ovaj vektor u svojoj sekvenci sadrži i ishodište replikacije iz bakterije *Escherichia coli*, gen *LEU2* koji služi kao selekcijski biljeg te gene koji omogućuju rezistenciju bakterije *E. coli* na antibiotike (*tetA* i *bla*). Uspješnost transformacije s ovim je plazmidima između 10 000 i 100 000 transformanata po μg (Brown, 2010).

➤ "Yeast Replicative plasmid" (YRp)

Budući da YRp sadrže ishodište replikacije također se mogu samostalno replicirati. Osim ishodišta replikacije, sadrže gen *TRP1* koji služi kao selekcijski biljeg za transformaciju kvasca te gene iz plazmida pBR322 koji transformiranim bakterijama omogućuju rezistenciju na

antibiotike tetraciklin i ampicilin (*tetA* i *bla*). U stanicama se nalazi između jedne i sto kopija, a efikasnost transformacije je 1 000 do 10 000 transformanata po µg (Brown, 2010).

➤ "Yeast centromere plasmid" (YCp)

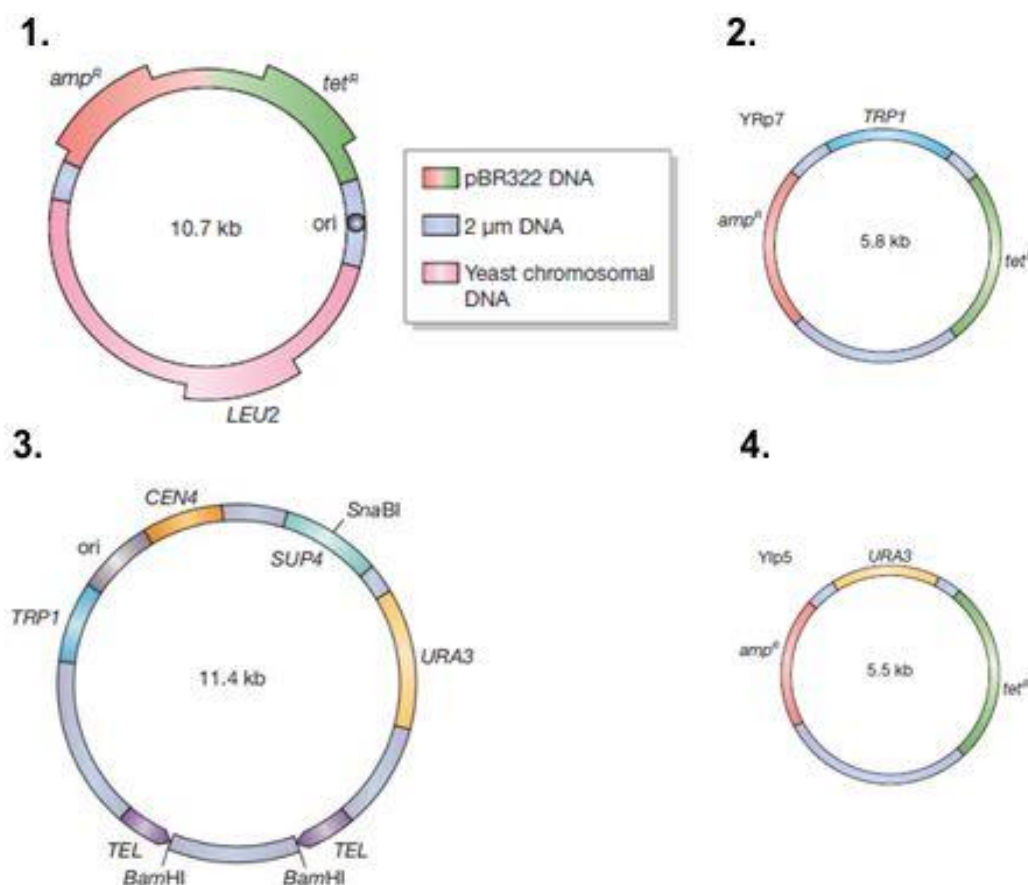
YCp u stanici dolaze u malom broju kopija i stabilni su. Ovi vektori sadrže ishodište replikacije iz kvasca *S. cerevisiae*, regiju *ARS* ("Autonomously Replicating Sequences") te centromernu regiju četvrtog kvašćevog kromosoma *CEN4*, koja omogućava pravilnu segregaciju vektora u stanice kćeri. YCp se u haploidnim stanicama nalazi u jednoj kopiji (Clarke i Carbon, 1980), a prisutnost *CEN4* sekvence omogućava veću stabilnost tijekom mitoze (Murray i Szostak, 1983; Hieter i sur., 1985). Također, primijećeno je da veličina plazmida utječe na stabilnost segregacije, što je plazmid veći manja je vjerojatnost nejednake distribucije tijekom dijeljenja stanica (Hieter i sur., 1985). Ukoliko se u jednoj stanici nalazi više kopija YCp smanjuje se stabilnost odvajanja kromosoma tijekom diobe stanica (Futcher i Carbon, 1986; Runge i sur., 1991).

➤ "Yeast Artificial Chromosome" (YAC)

YAC ili umjetni kvašćev kromosom sadrži regije *ori* i *bla* koji omogućuju replikaciju i selekciju u bakteriji *E. coli* te regije *ARS* i *CEN4* i auktotrofne biljege *URA3*, *TRP1* i *HIS4*. Također, YAC sadrži i dvije telomerne regije *TEL* koje sprječavaju razgradnju krajeva kromosoma egzozukleazama. Dodatno, ovaj vektor sadrži i gen *SUP4* koja kodira za tRNA^{Tyr}, a unutar gena se nalazi polilinker MCS (multiple cloning site). *SUP4* je supresor mutacije u genu *ade2*, ako je aktivan kolonije kvasca su bijele – YAC ne sadrži insert, a ako je inaktivan su crvene - YAC sadrži insert (Brown, 2010)

➤ "Yeast Integrative plasmid" (YIp)

YIp su nereplikativni plazmidi, koji ne sadrže ishodište replikacije, već se moraju integrirati u kvašćev kromosom. Za transformaciju se mogu koristiti kružni ili linearizirani vektori pri čemu je uspješnost transformacije veća za linearizirani YIp. Ovakvi vektori najčešće nose gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin te neki od auktotrofnih biljega koji se koriste za selekciju transformiranih stanica kvasca (Brown, 2010).

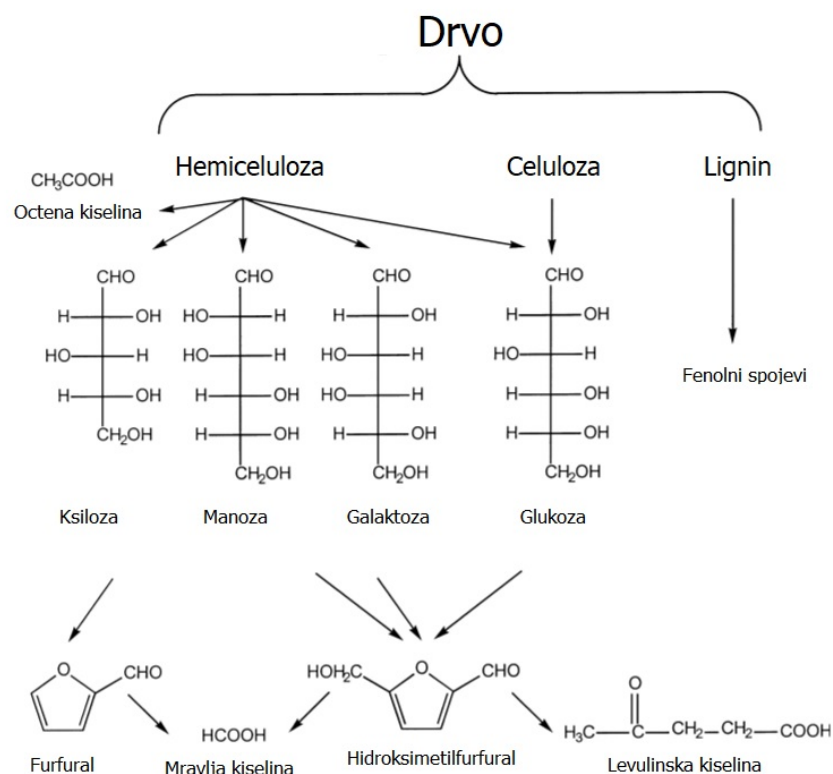


Slika 1. Shematski prikaz različitih vrsta plazmidnih vektora koji se koriste u radu s kvascem *S. cerevisiae*: 1. YEp; 2. YRp; 3. YAC; 4. YIp. Prikazane su regije bitne za replikaciju i selekciju transformanata bakterije *E. coli* i kvasca *S. cerevisiae*. Preuzeto iz Brown (2010).

2.2. Lignocelulozne sirovine

Zalihe dostupnih obnovljivih izvora energije, kao što su fosilna goriva, su ograničene, a njihovo korištenje doprinosi onečišćenju okoliša. Zbog toga se sve češće kao polazne sirovine u proizvodnji biogoriva koriste obnovljivi izvori energije. Kao alternativna sirovina za proizvodnju bioetanol koriste se lignocelulozne sirovine, ostatci drvene biomase, koji su u prirodi prisutni u velikim količinama.

Lignocelulozne sirovine sastoje se od 50-70 % hemiceluloze i celuloze koje se mogu razgraditi do fermentabilnih šećera – pentoza (ksiloza) i glukoze (Grba, 2010) telignina, polifenolnog polimera kojeg mikroorganizmi ne mogu asimilirati. Zbog složene kemijske građe, potrebno je prvo provesti predtretman lignoceluloznih sirovina, najčešće pomoću kiselinske hidrolize, čime se oslobađaju fermentabilni šećeri. Hidrolizati lignoceluloznih sirovina sadrže saharide, kiseline, alkohole, aldehide, vanilin, furfural i hidroksi-metil-furfural (HMF), a neki od ovih spojeva inhibiraju rast mikroorganizama (Delgenes i sur., 1996; Fenske i sur., 1998; Klinke i sur., 2001; Slika 2).



Slika 2. Spojevi koji nastaju hidrolizom lignoceluloznih sirovina. Preuzeto iz Palmqvist i Han-Hägerdal (2000).

➤ Furfural

Furfural (2-furaldehid), aldehidni je derivat furana koji nastaje degradacijom pentoza i heksoza te usporava rast stanica (Azhar i sur., 1981; Boyer i sur., 1992). Furfural utječe na aktivnost enzima glikolize, citratnog ciklusa i oksidativne dekarboksilacije i uzrokuje oksidativni stres (Iwaki i sur., 2013), a najjači inhibitorski utjecaj ima na alkohol, aldehyd i piruvat dehidrogenazu (Modig i sur., 2002).

➤ Karboksilne kiseline

Octena, levulinska i mravlja kiselina karboksilne su kiseline koje nastaju predobradom lignoceluloznih sirovina. Mravlja kiselina nastaje kao produkt razgradnje furfurala i 5-hidroksimetilfurfurala, a levulinska kiselina nastaje razgradnjom 5-hidroksimetilfurfurala. Pri nižim koncentracijama karboksilne kiseline pozitivno djeluju na proizvodnju etanola dok pri višim koncentracijama djeluju toksično (Larsson i sur., 1999). Naime, nedisocirane slabe kiseline topljive su u mastima i mogu slobodno difundirati u stanicu, a inhibitorski efekt uzrokovan je ulaskom nedisociranih kiselina u citosol gdje, zbog neutralnog pH, disociraju i smanjuju intracelularni pH (Ulbricht i sur., 1984).

Octena kiselina u visokim koncentracijama inhibira korištenje glukoze kao izvora ugljika i proizvodnju etanola. Kako u takvim uvjetima stanice kvasca nemaju dovoljnu količinu

ugljikohidrata na raspolaganju, stanice počnu degradirati glikogen, što kod kvasaca to izaziva gladovanje, manjak energije, a može dovesti i do apoptoze (Ludovico i sur., 2002; Pereira i sur., 2007).

2.3. Genetičke modifikacije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koje omogućuju povećanu otpornost na inhibitore rasta

Kako bi se pojednostavila proizvodnja bioetanol, tj. povećala otpornost kvasca *S. cerevisiae* na inhibitore rasta nastale hidrolizom lignoceluloznih sirovina, u kvascu *S. cerevisiae* eksprimirani su različiti geni.

Gen *YAP1* kodira za transkripcijski faktor koji je glavni regulator odgovora na oksidativni stres te je ključan za stvaranje otpornosti na hidroksi-metil-furfural (HMF). Pojačana ekspresija gena *YAP1* povećava toleranciju na HMF, kiseline i koniferilaldehid (Alriksson i sur., 2010) koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina. Transkripcijski faktor (Coleman i sur., 1997) Yap1p se, u normalnim uvjetima, transportira iz jezgre, dok je tijekom oksidativnog stresa spriječen njegov transport. Time se Yap1p akumulira u jezgri te dolazi do transkripcije ciljnih gena (Wiatrowski i Carlson, 2003; Isoyama i sur., 2001) kao što su geni za regeneraciju glutationa (*GSH1*, *GSH2*, *GPX2* i *GLR1*), geni za tioredoksin (*TRX2*) i tioredoksin reduktazu (*TRR1*) (Dumond i sur., 2000; Maeta i sur., 2004). Dodatno, Yap1p sudjeluje i u indukciji ekspresije drugih gena - *SOD1*, *CTT1*, *TSA1*, *GRX1*, *SSA1*, *YCF1*, *FLR1*, *ATR1* (Coleman i sur., 1997; Jungwirth i sur., 2000; Dumond i sur., 2000; Lucau-Danila i sur., 2005). Pokazalo se da pojačana ekspresija gena *YAP1* u kvascu *S. cerevisiae* povećava rezistenciju na cikloheksimid, 3-aminotioakridon, 4-nitokinolinoksid i tetrabutilhidroperoksid (Coleman i sur., 1997; Akada i sur., 2002; Nguyễn i sur., 2001).

Atr1p je hidrofoban membranski protein koji sudjeluje u transmembranskom transportu i izbacivanju 3-aminotioakridona iz stanice (Coleman i sur., 1997; Kanazawa i sur., 1988). Pojačanom ekspresijom gena *ATR1* u kvascu *S. cerevisiae* dobiveni su sojevi otporniji na inhibitore 3-aminotioakridon, 4-nitokinolinoksid i koniferilaldehid koji nastaju obradom lignoceluloznih sirovina (Coleman i sur., 1997; Kanazawa i sur., 1988; Mack i sur., 1988).

Flr1p je transportni protein koji se nalazi u citoplazmi (Jungwirth i sur., 2000; Tenreiro i sur., 2001) i bitan je za otpornost na cikloheksimid, 4-nitokinolinoksid ali i još neke toksične spojeve (Jungwirth i sur., 2000; Brôco i sur., 1999; Oskouian i Saba, 1999).

Sukladno s time, povećana ekspresija gena *FLR1* u kvascu *S. cerevisiae* doprinijela je povećanoj rezistenciji konstruiranog soja na cikloheksimid, 4-nitokinolinoksid te HMF i koniferilaldehid koji nastaju predtretmanom lignoceluloznih sirovina (Alriksson i sur., 2010).

Gen *ZWF1* kodira za enzim glukoza-6-fosfat dehidrogenazu, koji sudjeluje u regeneraciji NADPH u pentoza fosfatnom putu. Pojačana ekspresija ovog gena u kvascu *S. cerevisiae* također povećava njegovu otpornost na HMF i 2-furfural (Gorsich i sur., 2006).

Gen *GSH1* kodira za γ -glutamilstein sintetazu. Pojačanom ekspresijom gena *GSH1* dolazi do povećane sinteze tripeptida glutaciona, koji unutar stanice djeluje kao redoks-pufer i štiti stanicu od oksidativnog stresa (Grant i sur., 1996) i dovodi do veće otpornosti kvasca *S. cerevisiae* na furfural, ali ne i na HMF (Kim i Hahn, 2013).

Ace2p i Sfp1p transkripcijski su faktori koji reguliraju odgovor na stres izazvan prisustvom octene kiseline i furfurala (King i Butler, 1998). Ace2p aktivira transkripciju gena koji omogućuju odvajanje stanice kćeri od stanice majke. Sfp1p regulira ekspresiju skoro 10 % kvašćevih gena, pri čemu većina sudjeluje u biogenezi ribosoma i regulaciji veličine stanice (Marion i sur., 2004). Pojačanom ekspresijom gena *SFP1* u *S. cerevisiae* povećana je otpornost na furfural i octenu kiselinu, a gena *ACE2*, uz navedene inhibitore rasta, povećana je otpornost još i na HMF. Također, pojačanom ekspresijom gena *SPF1* i *ACE2* povećana je i produktivnost proizvodnje etanola (Chen i sur., 2016).

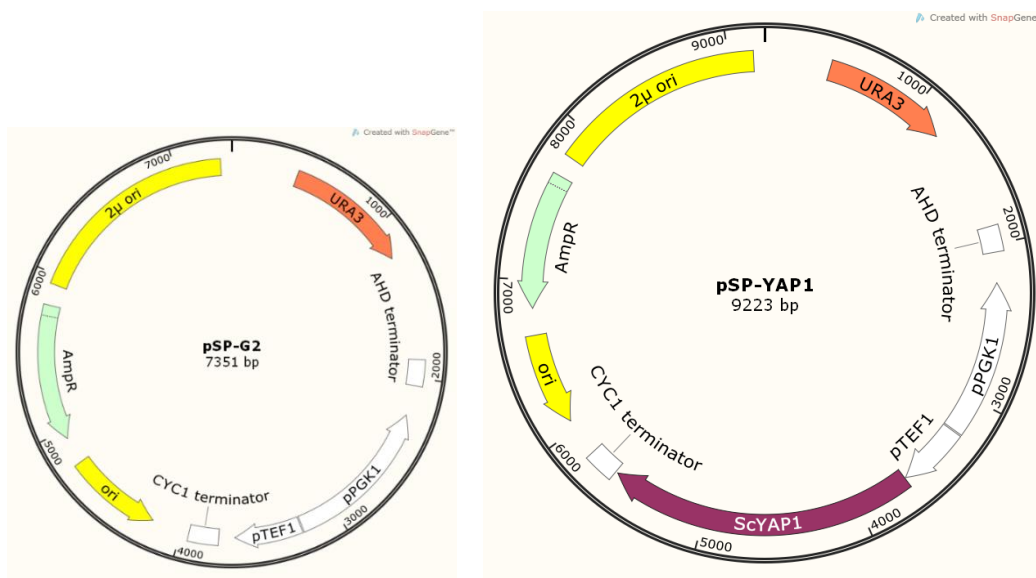
Sojeve kvasca otporne na inhibitore rasta, moguće je konstruirati i transformacijom vektorima koji omogućuju pojačanu ekspresiju gena *ADH6*, *ADH7* i *ALD6* (Almeida i sur., 2008; Park i sur., 2011; Petersson i sur., 2006). Toksične aldehidne grupe furfurala i hidroksimetilfurfurala mogu biti reducirane do hidroksilnih alkohol dehidrogenazama (Adh1, Adh6 i Adh7) (Almeida i sur., 2008; Liu i sur., 2008), aldehid reduktazom (Ari1) (Liu i Moon, 2009) i metilglioksal reduktazom (Gre2 i Gre3) (Heer i sur., 2009; Liu i Moon, 2009; Liu, 2011; Park i sur., 2011).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Plazmidi

U ovome radu korišteni su plazmidi pSP-G2, pSP-YAP1 i pSP-YAP1-C620F koji se mogu umnožiti u bakteriji *E. coli* zahvaljujući sekvenciji *ori* (ishodište replikacije), a kako sadrže i gen *bla* (kodira za enzim β -laktamazu koja razgrađuje antibiotik ampicilin), bakterije koje ih sadrže moguće je selekcionirati na hranjivim podlogama uz dodatak ampicilina (Slika 3). Plazmid pSPG2 polazni je vektor iz kojeg je ugradnjom gena *YAP1* konstruiran plazmid pSP-YAP1 (Štafa i sur., 2019). Plazmid pSP-YAP1-C620F konstruiran je uvođenjem točkaste mutacije na položaju zahvaljujući kojoj je 620. cisteinski aminokiselinski ostatak zamijenjen fenilalaninskim (Štafa, usmeno priopćenje).



Slika 3. Plazmidi pSP-G2 i pSP-YAP1. Prikazane su regije i geni bitni za ovaj rad.

3.1.2. Mikroorganizmi

Za umnažanje dvolančanih plazmida korištena je bakterija *Escherichia coli*, soj DH5 α genotipa *F'/endA1 hsdR17(rk⁻, mK⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Na^R) relA1 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR(ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)* ("New England Biolabs", Ipswich, MA, SAD).

Za istraživanje utjecaja pojačane ekspresije gena *YAP1*^{C620F} na rezistenciju kvasca na inhibitore rasta, korišten je soj Žup ura⁻, auksotrofni mutant ovisan o uracilu, iz zbirke Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Soj Žup ura⁻ konstruiran je iz prototrofnog soja Županja, izoliranog iz pogona Sladorana d.o.o, inaktivacijom svih kopija gena *URA3* tehnikom CRISPR/Cas9 teje u prethodnim istraživanjima

transformiran plazmidima pSP-G2 i pSP-YAP1, dok je u ovom istraživanju transformiran plazmidom pSP-YAP1-C620F (Tablica 1).

Tablica 1. Sojevi kvasca korišteni u ovom radu

Soj kvasca	Sadrži plazmid	Literaturni navod
Žup ura-	-	Štafa, usmeno priopćenje
Žup pSP	pSP-G2	Djedović, završni rad
Žup YAP1	pSP-YAP1	Djedović, završni rad
Žup YAP1 ^{C620F} 15	pSP-YAP1-C620F (transformant 15)	Ovaj rad
Žup YAP1 ^{C620F} 24	pSP-YAP1-C620F (transformant 24)	Ovaj rad

3.1.3. Hranjive podloge i otopine

U ovome radu korištene su hranjive podloge za uzgoj bakterije *E. coli* i kvasca *S. cerevisiae*. Sve su podloge sterilizirane autoklaviranjem pri 121 °C i jedan nadtlak atmosfere.

3.1.3.1. Hranjiva podloga za uzgoj bakterije *E. coli*

Kompleksna podloga (LB):

tripton	10,00 gL ⁻¹
kvašćev ekstrakt	5,00 gL ⁻¹
natrijev klorid	10,00 gL ⁻¹

LB podloga s ampicilinom: ampicilin se dodaje u sterilnu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracije 20,0 mgmL⁻¹) do konačne koncentracije od 50,0 µgmL⁻¹ u krutoj i 100,0 µgmL⁻¹ u tekućoj podlozi.

3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*

Kompleksna hranjiva podloga (YPD) (Sherman, 2002):

Ekstrakt kvasca	10,00 gL ⁻¹
Bakto-pepton	20,00 gL ⁻¹
Glukoza	20,00 gL ⁻¹
Agar	20,00 gL ⁻¹

Kemijski definirana podloga bez uracila (Sherman, 2002):

izvor dušika koji ne sadrži aminokiseline i amonijev sulfat	1,68 gL ⁻¹
amonijev sulfat	4,80 gL ⁻¹
smjesa nukleinskih baza i aminokiselina (bez uracila)	1,30 gL ⁻¹
D-glukoza	20,00 gL ⁻¹
agar	25,00 gL ⁻¹

Smjesa nukleinskih baza i aminokiselina:

adenin sulfat	2,50 g
L-arginin-klorid	1,20 g
L-asparaginska kis.	6,00 g
L-glutaminska kis.	6,00 g
L-histidin-klorid	1,20 g
L-leucin	3,60 g
L-lizin-klorid	1,80 g
L-metionin	1,20 g
L-fenilalanin	3,00 g
L-serin	22,50 g
L-treonin	12,00 g
L-triptofan	2,40 g
L-tirozin	1,80 g
L-valin	9,00 g

U kemijski definirane podloge dodani su odgovarajući volumeni 2 M matičnih otopina inhibitora rasta (octene, levulinske kiseline i 2-furaldehida).

3.1.4. Otopine i kompleti kemikalija za izolaciju DNA

Za izolaciju plazmidne DNA iz *E. coli* korišten je New England Biolabs Monarch® Plasmid Miniprep Kit prema uputama proizvođača.

Za izolaciju DNA iz kvasca korištene su otopine pripremljene u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

SCE:

Sorbitol	0,10 g
Na-citrat	14,70 g
EDTA (kompleksal III)	22,33 g
Destilirana voda do	500,00 mL

Zimoliza:

Zimoliza 20-T	0,015 g
Destilirana voda	0,60 mL
Glicerol 50%	2,40 mL

STE:

SDS 10%	5,00 mL
Tris HCl pH 8,0 1M	10,00 mL

EDTA pH 8,0 0,5M	10,00 mL
Destilirana voda	75,00 mL
RNaza A:	
RNaza A	10,00 mgmL ⁻¹
Tris HCl pH 7,5 1M	10,00 mM
NaCl	15,00 mM

3.1.5. Otopine za gel-elektroforezu

Agarozni gel:

priprema se otapanjem agaroze u TBE puferu (1 x) koji se pripremi razrjeđivanjem TBE pufera (10 x).

TBE pufer (10 x):

Tris	108,00 gL ⁻¹
borna kiselina	55,00 gL ⁻¹
EDTA pH 8,0 0,5 M	40,00 mL ⁻¹

Boja za nanošenje uzorka (6 x):

bromfenol plavo 0,03 %
ksilen cijanol FF 0,03 %
glycerol 60 %
SDS 1 %
EDTA pH 8,0 100 mM

Etidij-bromid: 10,00 mgmL⁻¹

3.1.6. Otopine za transformaciju kvasca

Trafo-Mix:

PEG ₄₀₀₀	32,00 mL
LiAC pH 7,0-7,1 1M	10,00 mL
Tris-HCl pH 7,5 1M	0,40 mL
EDTA pH 8,0 0,5M	0,08 mL
Destilirana voda	do 50,00 mL

3.1.7. Otopine za molekularnu analizu hibridizacijom DNA po Southern-u

Predhibridizacijska otopina:

DIG DNA blocking reagent	1,00 g
SSC 20x	25,00 mL
Natrijev-lauril sarkozin	1,00 mL
SDA 10 %	200,00 µL
Destilirana voda do	100,00 mL

Hibridizacijska otopina se priprema iz predhibridizacijske dodatkom DIG-obilježene probe i DNA nosača.

Otopina A:

SSC 20x	20,00 mL
SDS 10 %	2,00 mL
Destilirana voda	178,00 mL

Otopina B:

SSC 20x	0,50 mL
SDS 10 %	1,00 mL
Destilirana voda do	100,00 mL

Otopina P1:

Tris HCl pH 7.4 1M	100,00 mL
NaCl 5M	30,00 mL
Destilirana voda	870,00 mL

Otopina P2:

Blocking reagent	1,00 g
Otopina P1	100,00 mL

Otopina P3:

Tris pH 9,7 1M	10,00 mL
NaCl 5M	2,00 mL
MgCl ₂ 1M	5,00 mL
Destilirana voda	83,00 mL

Otopina za detekciju:

Otopina P3	5,00 mL
NBT	22,50 µL
X-Fosfat	17,50 µL

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija plazmidne DNA bakterije *E. coli*

Pojedinačne kolonije bakterije *E. coli*, naciepljene su u 5 mL tekuće hranjive LB podloge s antibiotikom ampicilinom i inkubirane preko noći na 37 °C na tresilici. Bakterijske kulture prenijete su u mikrokivete i centrifugirane na 9000 min⁻¹ kroz 2 minute, nakon čega je uklonjen supernatant. Za daljnji postupak izolacije plazmidne DNA iz bakterijskih stanica korišten je New England Biolabs Monarch® Plasmid Miniprep Kit prema uputama proizvođača.

3.2.2. Gel elektroforeza

Nakon izolacije i pročišćavanja plazmidne DNA, napravljena je gel elektroforeza u 0,8 % agaroznom gelu za provjeru uspješnosti izolacije plazmidne DNA. Gel elektroforeza provedena je u 1x TBE puferu, a za vizualizaciju DNA korišten je etidij bromid.

3.2.3. Transformacija kvasca pomoću litij acetata

Jedna kolonija kvasca naciepljena je u 200 mL tekuće YPD podloge i uzgajana do stacionarne faze (150-160 stanica po velikom kvadratu u Thoma-ovoj komorici) pri temperaturi od 28 °C. Kultura je prebačena u kivete i centrifugirana na 4000 okretaja min⁻¹ kroz 3 minute kako bi se istaložile stanice. Nakon centrifugiranja, talog je resuspendiran u 50 mL vode i ponovno centrifugiran 3 minute pri 4000 okretaja min⁻¹. Talog je zatim resuspendiran u 20 mL sterilne vode, ponovno centrifugiran na 4000 okretaja min⁻¹ kroz 3 minute te resuspendiran u 600 µL vode. Po 100 µL uzorka podijeljeno u šest mikrokiveta koje su centrifugirane pri 4000 okretaja min⁻¹ kroz 3 minute. Iz svake kivete uklonjeno je 85 µL supernatanta te je dodano do 10 µL plazmidne DNA te 350 µL Trafo-Mixa. Stanice su prvo inkubirane 40 min na 28 °C, a zatim opet 40 min na 42 °C. Nakon inkubacije, stanice su centrifugirane 5 min na 3000 okretaja min⁻¹, supernatant je uklonjen i transformirane stanice su resuspendirane u 180 µL tekuće YPD hranjive podloge kroz 45 min. Nakon inkubacije u kompletnoj YPD podlozi, stanice su centrifugirane pri 3000 okretaja min⁻¹ kroz 5 min i uklonjen je supernatant. Zatim su stanice resuspendirane u 180 µL sterilne deionizirane vode. Po 105 µL suspenzije stanica naciepljeno je na krutu hranjivu podlogu koja ne sadrži uracil te je inkubirano na 28 °C kroz 2-3 dana.

3.2.4. Izolacija genomske DNA kvasca

Pojedinačni transformanti uzgajani su u 4 mL kemijski definirane hranjive podloge, koja ne sadrži uracil, tijekom dva dana na tresilici na 28 °C. Svaki uzorak centrifugiran je 5 min na 5000 okretaja min⁻¹.

Odliven je supernatant, talog je resuspendiran u 1 mL destilirane vode, a resuspendirani talozi stanica kvasca ponovo su centrifugirani na 5000 okretaja min^{-1} i 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon završenog centrifugiranja, odliven je supernatant, a talog je resuspendiran u 3 mL SCE pufera i vorteksiran. Postupak centrifugiranja na 5000 okretaja min^{-1} 5 min pri sobnoj temperaturi opet je ponovljen te su talozi resuspendirani u 130 μL SCE pufera. Uzorcima je dodano 20 μL zimolijaze i inkubirani su sat vremena na 37 °C. Nakon inkubacije uzorcima je dodano je 800 μL STE pufera i sadržaj je promiješan okretanjem. Uzorci su stavljani u vodenu kupelj na 20 minuta i 70 °C te potom 10 minuta na led nakon čega je dodano 200 μL 5 M kalijevog acetata pH 4,8 kako bi se preko noći istaložili proteini. Proteini su taloženi centrifugiranjem 15 min na 11000 okretaja min^{-1} . 970 μL supernatanta prebačeno je u novu mikrokvetu u koju je dodano 630 μL izopropanola. Sadržaj je promiješan okretanjem, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje 15 min na 11000 okretaja min^{-1} . Odliven je supernatant, a ostatak supernatanta je uklonjen vakuum sisaljkom. Osušen talog otopljen je u 300 μL TE pufera uz dodatak 1 μL RN-aze tijekom 20 min na 70 °C. Otopljena DNA pročišćena je taloženjem dodatkom 100 μL 8 M amonijevog acetata i dva volumena 96 %, kroz dva sata na -20 °C. Uzorci su centrifugirani 20 min na 14000 okretaja min^{-1} te otopljeni u 10 μL TE pufera.

3.2.5. Hibridizacija DNA po Southern-u

Hibridizacija DNA po Southern-u koristi za utvrđivanje prisustva određene sekvence DNA u nekom uzorku. Tehnika se sastoji od: gel elektroforeze, kojom se fragmenti DNA razdvajaju po veličini, prijenosa fragmenata DNA iz gela na membranu i hibridizacije DNA s obilježenom komplementarnom probom. Budući da se metoda temelji na formiranju DNA-DNA hibrida između dva komplementarna lanca, DNA treba biti jednolančana tj. denaturirana.

3.2.5.1. Transfer

Nakon gel elektroforeze, gel je bojan etidij bromidom, fotografiran i inkubiran 25 minuta u 0,25 M HCl (apurinacija DNA) zatim ispran u destiliranoj vodi te inkubiran u smjesi 1 M amonijevog acetata i 0,4 M natrijevog hidroksida na 30 minuta (denaturacija DNA).

Gel je stavljen na pozitivno nabijenu membranu na vakuum blotteru, uključen je vakuum i nakon toga membrana i gel su prelivani s 0,4 M natrijevim hidroksidom. Nakon sat vremena blotter je isključen, gel je skinut s membrane, a membrana je inkubirana 15 min u 1 M amonijevom acetatu. Kako bi se spriječilo odvajanje DNA od membrane, tj. kako bi dodatno fiksirali DNA, membrana je osušena u suhom sterilizatoru na 120 °C tijekom 30 min.

3.2.5.2. Predhibridizacija i hibridizacija

Membrana je inkubirana s predhibridizacijskom otopinom u zataljenoj vrećici u vodenoj kupelji s potresanjem na 64 °C tijekom 2-3 sata. U međuvremenu, proba je denaturirana zagrijavanjem u vrijućoj vodenoj kupelji i brzo ohlađena kako bi se spriječilo komplementarno sparivanje jednolančanih fragmenata. Predhibridizacijska otopina zamijenjena je hibridizacijskom, vrećica je ponovno zataljena te inkubirana u vodenoj kupelji uz potresanje na 64 °C tijekom noći.

3.2.5.3. Detekcija

Membrana je prvo isprana dva puta sa 100 mL otopine A, a zatim je inkubirana u 50 mL otopine B tijekom 25 min u vodenoj kupelji na 70 °C. Membrana je nakon toga isprana u 150 mL otopine P1, inkubirana sat vremena u vrećici u 35 mL otopine P2 u kojoj se nalazilo antitijeloteopet isprana dva puta po 15 min sa 100 mL otopine P1. Zatim je membrana isprana je u 100 mL otopine P3 i potom inkubirana u otopini za detekciju na 37 °C. Nakon što je došlo do enzimske reakcije i razvijanja boje, reakcija je zaustavljena ispiranjem membrane u vodi, a membrana je stavljena u inkubator na 37 °C i osušena.

3.2.6. Određivanje otpornosti sojeva kvasca na inhibitore rasta

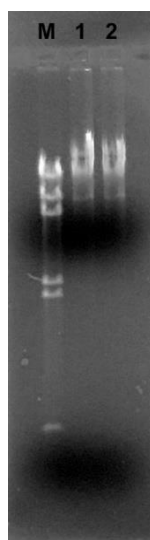
Otpornost sojeva kvasca na inhibitore rasta određena je na temelju porasta kolonija na krutim podlogama („spot metoda“). Sojevi za „spot test“ naciepljeni su u 2 mL kemijski definirane hranjive podloge bez uracila te su inkubirani 2 dana na 28 °C na tresilici. Na kemijski definirane hranjive podloge koje ne sadrže uracil, ali sadrže odgovarajuće koncentracije inhioitora rasta, naciepljeni su sojevi od nultog razrjeđenja do petog decimalnog razrjeđenja, u obliku kapljice (spot metoda). Hranjive podloge su inkubirane na 28 °C, kolonije narasle na kompleksnim hranjivim podlogama bez dodanih inhibitora brojane su drugi dan nakon naciepljivanja, kolonije naciepljene na hranjive podloge s levulinskom kiselinom i octenom četvrti dan, a one naciepljene na hranjivu podlogu s furalaldehidom brojane su sedmi dan nakon naciepljivanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Proizvodnja bioetanola koristeći lignocelulozne sirovine kao supstrat jedan je od načina na koji se nastoji riješiti sve veća potražnja za gorivima. Problem pri korištenju lignoceluloznih sirovina, kao supstrata za proizvodnju bioetanola, uzrokovan je njihovom kompleksnom kemijskom strukturom zbog čega ih mikroorganizmi ne mogu direktno fermentirati. Zbog toga lignocelulozne sirovine se moraju prvo hidrolizirati pri čemu se oslobađaju fermentabilni ugljikohidrati, ali i spojevi koji djeluju kao inhibitori rasta i fermentacije pa mikroorganizam producent mora proizvoditi etanol, ali i biti otporan na inhibitore. Različita istraživanja pokazala su da pojačana ekspresija određenih gena povećava otpornost sojeva na inhibitore rasta (Jönsson i Martín, 2016; Alriksson i sur., 2010) te se u ovome radu željelo utvrditi da li točkasta mutacija *YAP1*^{C620F}, za koju je pokazano da rezultira pojačanom aktivnošću proteina Yap1, dovodi do povećane otpornosti odabranog soja kvasca Žup ura- izoliranog iz Sladorane d.o.o., za kojeg je prethodno pokazano da dobro proizvodi bioetanol.

4.1. Provjera uspješnosti izolacije plazmidne DNA

Kako bi se ispitao utjecaj pojačane ekspresije alela *YAP1*^{C620F} na rezistenciju soja Žup ura- na inhibitore rasta bilo je potrebno prvo izolirati plazmidnu DNA prethodno konstruiranu u laboratoriju. Uvođenje točkaste mutacije C620F u gen *YAP1* napravljeno je *in vitro* mutagenezom pomoću kompleta kemikalija Q5® Site-Directed Mutagenesis (NEB; SAD), a prisustvo željene točkaste mutacije potvrđeno je sekvencioniranjem u dva neovisna transformanta bakterije *E. coli*, nazvana 15 i 24 (Štafa, usmeno priopćenje). U ovome radu izolirana je DNA iz dva transformanta (15 i 24), a nakon izolacije provedena je gel elektroforeza kako bi provjerili uspješnost izolacije (Slika 4).



Slika 4. Provjera uspješnosti izolacije plazmida pSP-YAP1-C620F. M- DNA bakteriofaga λ pocijepana restrikcijskim enzimom HindIII; 1- kružna plazmidna DNA izolirana iz transformanta 15; 2- kružna plazmidna DNA izolirana iz transformanta 24.

Tijekom gel elektroforeze plazmidna DNA putuje od negativno nabijenog pola prema pozitivno nabijenom polu ovisno o veličini plazmida i konformaciji. Na temelju rezultata prikazanih na slici 4 može se zaključiti da je plazmid pSP-YAP1-C620F uspješno izoliran iz dva neovisna transformanta bakterije *E. coli*.

4.2. Transformacija kvasca *Žup ura*- replikativnim plazmidom pSP-YAP1-C620F

Kako bi konstruirali soj koji ima pojačanu ekspresiju alela *YAP1^{C620F}*, soj *Žup ura*-transformiran je replikativnim plazmidom pSP-YAP1-C620F prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3. Metoda transformacije pomoću litij acetata od prvog je opisa (Ito i sur., 1983) doživjela mnogobrojna poboljšanja, a jedno od značajnijih je i povećanje efikasnosti transformacije korištenjem jednolančane nespecifične DNA (eng. "carrier DNA") (Schiestl i Gietz, 1989). Za transformaciju su korišteni su uzorci plazmidne DNA, ali i uzorci u kojima je uz plazmidnu DNA dodana i nespecifična DNA (Tablica 2).

Tablica 2. Broj transformanata dobiven transformacijom soja *Žup ura*- plazmidima pSP-YAP1-C620F izoliranim iz dva različita transformanta bakterije *E. coli*

Transformacija	Transformirajuća DNA			
	pSP-YAP1-C620F tr. 15	pSP-YAP1-C620F tr. 15*	pSP-YAP1-C620F tr. 24	pSP-YAP1-C620F tr. 24**
1	203	499	557	1723
2	355	535	607	1366

* i ** uzorci su sadržavali i 50 μ g nespecifične DNA

Kao što je vidljivo iz tablice 2, transformanti su dobiveni pri transformaciji s oba izolata plazmida pSP-YAP1-C620, a za daljnju analizu odabrano je nekoliko transformanata iz uzoraka u kojima nije korištena DNA nosač.

4.3. Molekularna analiza transformanata hibridizacijom po Southern-u

Hibridizacija po Southern-u metoda je molekularne analize DNA kojom se može identificirati željena sekvenca (Harley i sur., 1990). U tu svrhu se koriste radioaktivno ili neradioaktivno obilježene molekule nukleinske kiseline čija je sekvenca komplementarna regiji koju želimo identificirati, a ovakva obilježena DNA zove se proba to jest sonda. Nakon predhibridizacije i hibridizacije sa digoksinin (DIG) obilježenom plazmidnom okosnicom, koja sadrži *ori* i *bla*, provedena je detekcija, a rezultati hibridizacije DNA po Southern-u prikazani su na slici 5.

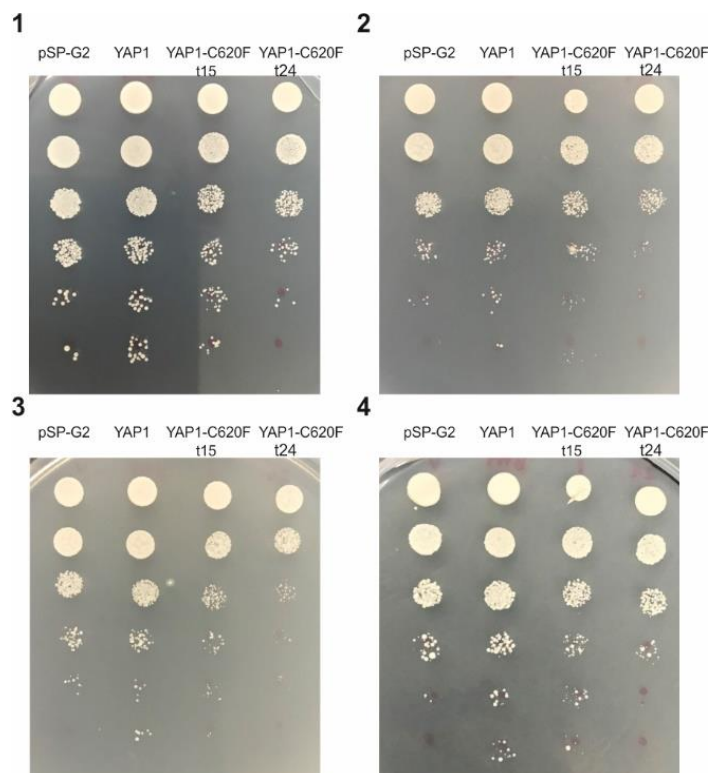


Slika 5. Molekularna analiza transformanata hibridizacijom po Southern-u. M –DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; 1 i 7 – genomska DNA netransformiranog soja *Žup* ura-; 2 i 8- plazmid pSP-YAP1 izoliran iz bakterije *E. coli*; 3 – 6 genomska DNA transformanata dobivenih transformacijom plazmidom pSP-YAP1-C620F izoliranim iz transformanta 15; 9 – 10 genomska DNA transformanata dobivenih transformacijom plazmidom pSP-YAP1-C620F izoliranim iz transformanta 24. Kao DIG obilježena proba korištena je plazmidna okosnica s regijama *ori* i *bla*.

Kod netransformiranog soja *Žup* ura- (jažice 1 i 7) nije došlo do hibridizacije, jer navedeni soj ne sadrži plazmid pSP-YAP1-C620F. Prisustvo plazmida pSP-YAP1-C620F potvrđeno je u transformantima dobivenim s oba izolata plazmidne DNA (jažice 3-6 i 9-10), a veličina vrpce odgovara onim dobivenim hibridizacijom plazmida pSP-YAP1, koji je izoliran iz bakterije *E. coli* (jažice 2 i 8). Za daljnje istraživanje odabrana su dva transformanta, *Žup* YAP1^{C620F} t15 i *Žup* YAP1^{C620F} t24, čija se izolirana DNA nalazi u jažicama 3 i 9.

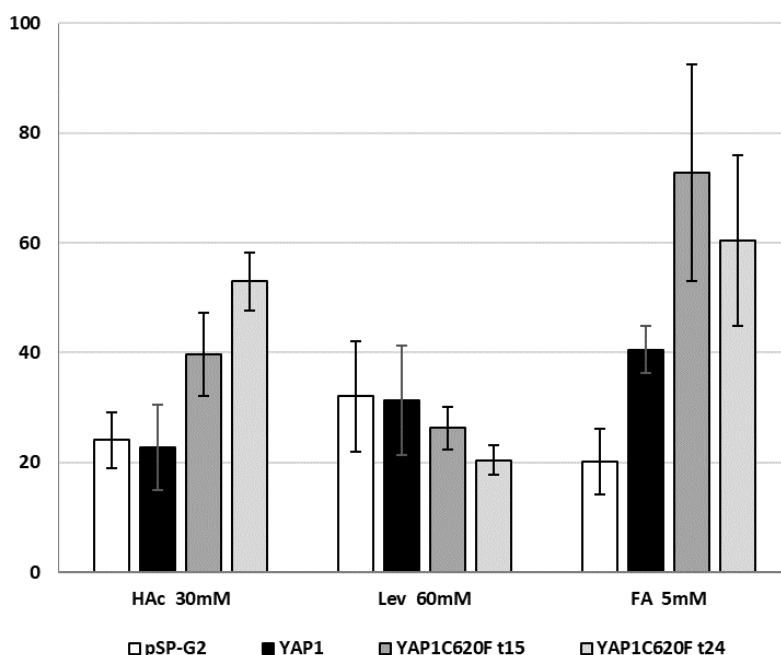
4.4. Utjecaj pojačane ekspresije gena *YAP1^{C620F}* na rezistenciju na inhibitore rasta

Otpornost sojeva kvasca koji imaju pojačanu ekspresiju alela *YAP1^{C620F}* na inhibitore rasta ispitana je „spot testom“ na kemijski definiranoj podlozi bez uracila, prema protokolu koji je opisan u poglavlju 3.2.6., a rezultati rasta na hranjivim podlogama prikazani su na Slici 6.



Slika 6. Spot test. Prikazane su kolonije porasle na: 1) kemijski definiranoj podlozi bez uracila, 2) uz dodatak 30 mM octene kiseline, 3) 60 mM levulinske kiseline i 4) 5 mM furaldehida. pSP-G2 označava soj Žup pSP-G2, YAP1 soj Žup YAP1, a YAP1-C620F t15 i t24 sojeve Žup *YAP1^{C620F}* t15 i Žup *YAP1^{C620F}* t24.

Iz rezultata spot testa na slici 6 može se vidjeti da svi ispitivani sojevi rastu sporije na podlogama koje sadrže inhibitore rasta. Postotak preživljena ispitivanih sojeva Žup *YAP1^{C620F}* t15 i Žup *YAP1^{C620F}* t24 uspoređen je s preživljenjem kontrolnih sojeva Žup pSP i Žup YAP1, koji sadrže vektor pSP-G2 i divlji tip alela *YAP1* (Slika 7).



Slika 7. Utjecaj pojačane ekspresije gena *YAP1^{C620F}* na preživljenje soja Žup ura- na SC-ura podlogama u koje su dodani inhibitori rasta (octena i levulinska kiselina i 2-furaldehid). Rezultati su izraženi u odnosu na preživljenje sojeva u odsutnosti inhibitora (100 %), a naznačeni su 95 % intervali povjerenja. HAc - octena kiselina, Lev- levulinska kiselina, FA- 2-furaldehid, pSP-G2 označava soj Žup pSP-G2, YAP1 soj Žup YAP1, a YAP1-C620F t15 i t24 sojeve Žup YAP1-C620F t15 i Žup YAP1-C620F t24.

Iz rezultata prikazanih na slici 7, vidljivo je da su sojevi s pojačanom ekspresijom alela *YAP1^{C620F}* otporniji na octenu kiselinu i 2-furaldehid u odnosu na sojeve koji sadrže samo vektor ili divlji tip gena *YAP1*. Octena kiselina jedan je od glavnih faktora koja potiče starenje i smrt stanice kvasca (Burtner i sur., 2009). U nedisociranoj formi octena i levulinska kiselina difuzijom prolaze kroz staničnu membranu, dok pri višem izvanstaničnom pH disociraju i imaju negativan učinak na staničnu membranu (Ludovico i sur., 2002; Pereira i sur., 2007). 2-furaldehid i hidroksi-metil-fural u stanici potiču nastanak oksidativnog stresa, a pojačana ekspresija gena *YAP1*, *YAP1^{C620F}* i *ZWF1*, u nekim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, povisuje toleranciju na navedene inhibitore aktivacijom gena koji sudjeluju u odgovoru na oksidativni stres (Ma i Liu, 2010; Lee i sur., 1999). Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da bi za proizvodnju bioetanola, koristeći hidrolizate lignoceluloznih sirovina kao supstrat, bilo poželjno koristiti soj Žup *YAP1^{C620F}* koji imaju pojačanu ekspresiju alela *YAP1^{C620F}*.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja provedenog u ovom radu može se zaključiti:

1. Pojačana ekspresija alela *YAP1^{C620F}*, koji kodira za konstitutivno aktivan transkripcijski faktor Yap1, dodatno povećava otpornost soja kvasca Žup ura- na octenu kiselinu i 2-furaldehid u odnosu na soj koji ima pojačanu ekspresiju divljeg tipa gena *YAP1*.

6. LITERATURA

Akada R., Shimizu Y., Matsushita Y., Kawahata M., Hoshida H., Nishizawa Y. (2002) Use of a *YAP1* overexpression cassette conferring specific resistance to cerulenin and cycloheximide as an efficient selectable marker in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 17-28.

Almeida J. R., Röder A., Modig T., Laadan B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M. F. (2008) NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78** (6): 939-945.

Alriksson B., Sárvári Horváth I., Jönsson L. J. (2010) Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Process Biochemistry* **2**: 264-271.

Azhar A. F., Bery M. K., Colcord A. R., Roberts R. S., Corbitt G. V. (1981) Factors affecting alcohol fermentation of wood acid hydrolysate. *Biotechnology and Bioengineering* **11**: 293-300.

Boyer L. J., Vega K., Klasson K. T., Clausen E. C., Gaddy J. L. (1992) The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass Bioengineering* **3** (1): 41-48.

Brôco N., Tenreiro S., Viegas C. A., Sa-Correia I. (1999) *FLR1* gene (ORF YBR008c) is required for benomyl and methotrexate resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its benomyl-induced expression is dependent on pdr3 transcriptional regulator. *Yeast* **15**: 1595-1608.

Brown T. A. (2010) Gene cloning and DNA analysis, 6.izd., Wiley-Blackwell. str. 85., 105-112., 142-143.

Burtner C. R., Murakami C. J., Kennedy B. K., Kaeberlein M. (2009) A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell cycle* **8** (8): 1256-1270.

Chen Y., Sheng J., Jiang T., Stevens J., Feng X., Wei N. (2016) Transcriptional profiling reveals molecular basis and novel genetic targets for improved resistance to multiple fermentation inhibitors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* **9**: 9.

Clarke L., Carbon J. (1980) Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* **287**: 504-509.

- Coleman S. T., Tseng E., Moye-Rowley W. S. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the *ATR1* structural gene. *The Journal of Biology and Chemistry* **272**: 23224-23230.
- Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M. (1996) Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipites* and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology* **19**: 220-225.
- Djedović E. (2018) Konstrukcija sojeva kvasca sa pojačanom ekspresijom odabranih gena Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet (završni rad)
- Dumond H., Danielou N., Pinto M., Bolotin-Fukuhara M. (2000) A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H₂O₂-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Molecular Biology* **36**: 830-845.
- Fenske J. J., Griffin D. A., Penner M. H. (1998) Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **20**: 364-368.
- Futcher B., Carbon, J. (1986) Toxic effects of excess cloned centromeres. *Molecular and Cellular Biology* **6**: 2213-2222.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546.
- Gorsich S. W., Dien B. S., Nichols N. N., Slininger P. J., Liu Z. L., Skory C. D. (2006) Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**: 339-349.
- Grant C. M., MacIver F. H., Dawes I. W. (1996) Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **29** (6): 511-515.
- Grba S. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Plejada. str. 43-52., 219-223.
- Harley C. B., Futcher A. B., Greider C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-460.
- Hartig, A., Holly J., Saari G., and MacKay V. L. (1986) Multiple regulation of STE2, a mating-type-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **6**: 2106-2114.

- Heer D., Heine D., Sauer U. (2009) Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. *Applied Environmental Microbiology* **75**: 7631-7638.
- Herskowitz I. (1988) Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* **52** (4): 536-553.
- Hicks J. B., Herskowitz I. (1976) Interconversion of yeast mating types I. Direct observations of the action of the homothallism (HO) gene. *Genetics* **83**: 245-258.
- Hieter P., Mann C., Snyder M., Davis R. W. (1985) Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* **40** (2): 381-392.
- Isoyama T., Murayama A., Nomoto A., Kuge S. (2001) Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is not mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *Journal of Biology and Chemistry* **276**: 21863-21869.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* **153**: 163-168.
- Iwaki A., Kawai T., Yamamoto Y., Izawa S. (2013) Biomass Conversion Inhibitors Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural Induce Formation of Messenger RNP Granules and Attenuate Translation Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **79** (5): 1661-1667.
- Jönsson L. J., Martín C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* **199**: 103-112.
- Jungwirth H., Wendler F., Platzer B., Bergler H., Högenauer G. (2000) Diazaborine resistance in yeast involves the efflux pumps Ycf1p and Flr1p and is enhanced by a gain-of-function allele of gene *YAP1*. *European Journal of Biochemistry* **267**: 4809-4816.
- Kanazawa S., Driscoll M., Struhl K. (1988) *ATR1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 664-673.
- Kawai S., Hashimoto W., Murata K. (2010) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi; Methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered bugs* **6**: 395-403.
- Kim D., Hahn J. S. (2013) Roles of the Yap1 Transcription Factor and Antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s Tolerance to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural, Which

Function as Thiol-Reactive Electrophiles Generating Oxidative Stress. *Applied Environmental Microbiology* **7** (16): 5069–5077.

King L., Butler G. (1998) Ace2p, a regulator of (chitinase) expression, affects pseudohyphal production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **34**: 9.

Klinke H. B., Thomsen A. B., Ahring B. K. (2001) Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on growth and ethanol production by *Thermoanaerobacter mathranii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57** (5-6): 631-638.

Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N. O. (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbiological Technology* **24**: 151-159.

Lee J., Spector D., Godon C., Labarre J., Toledano M. B. (1999) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defence properties in yeast. *Journal of Biology and Chemistry* **274** (8): 4537-4544.

Liu Z. L. (2011) Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**: 809-825.

Liu Z. L., Moon J. (2009) A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. *Gene* **446** (1): 1-10.

Liu Z. L., Moon J., Andersh B. J., Slininger P. J., Weber S. (2008) Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81** (4): 743-753.

Lucau-Danila A., Lelandais G., Kozovska Z., Tanty V., Delaveau T., Devaux F., Jacq C. (2005) Early expression of yeast genes affected by chemical stress. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 1860-1868.

Ludovico P., Rodrigues F., Almeida A., Silva M. T., Barrientos A., Côrte-Real M. (2002). Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **13**: 2598-2606.

MacKay V. L., Manney T. R. (1974) Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic analysis of nonmating mutants. *Genetics* **76**: 273-288.

- Mack M., Gompel-Klein P., Haase E., Hietkamp J., Ruhland A. R., Brendel M. (1988) Genetic characterization of hyperresistance to formaldehyde and 4-nitroquinoline-N-oxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics* **211**: 260-265.
- Maeta K., Izawa S., Okazaki S., Kuge S., Inoue Y. (2004) Activity of the Yap1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 8753-8764.
- Ma M., Liu L. Z. (2010) Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiology* **10**: 169.
- Marion R. M., Regev A., Segal E., Barash Y., Koller D., Friedman N., O'Shea E. K. (2004) Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 14315-14322.
- Modig T., Lidén G., Taherzadeh M. J. (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal* **363**: 769–776.
- Murray A., Szotak J. W. (1983) Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature* **305**: 189–193.
- Nguyễn D. T., Alarco A. M., Raymond R. (2001) Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *Journal of Biology and Chemistry* **276**: 1138-1145.
- Oskouian B., Saba J. D. (1999) YAP1 confers resistance to the fatty acid synthase inhibitor cerulenin through the transporter Flr1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics* **261**: 346-353.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* **74**: 25-33.
- Park S. E., Koo H. M., Park Y. K., Park S. M., Park J. C., Lee O.K., Park Y.C., Seo J.H. (2011) Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* **102** (10): 6033-6038.

Pereira C., Camougrand N., Manon S., Sousa M. J., Côte-Real M. (2007) ADP/ATP carrier is required for mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome c release in yeast apoptosis. *Molecular Microbiology* **66**: 571-582.

Petersson A., Almeida J. R., Modig T., Karhumaa K., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M. F., Lidén G. (2006) A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *ADH6* gene conveys HMF tolerance. *Yeast* **23** (6): 455-464.

Runge K. W., Wellinger R. J., Zakian V. A. (1991) Effects of excess centromeres and excess telomeres on chromosome loss rates. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 2919-2928.

Schiestl R. H., Gietz R. D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Current Genetics* **16**: 339-346.

Sherman F. (2002) Getting started with yeast. *Methods of Enzymology* **350**: 3-41.

Sprague G. F. Jr., Jensen R., Herskowitz I. (1983) Control of yeast cell type by the mating type locus: Positive regulation of the a-specific *STE3* gene by the *MATa1* product. *Cell* **32**: 409-415.

Strathern J., Hicks J., Herskowitz I. (1981) Control of cell type in yeast by the mating type locus: the a1-a2 hypothesis. *Journal of Molecular Biology* **147**: 357-372.

Strathern J. N., Herskowitz I. (1979) Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: The switching pattern of homothallic yeast. *Cell* **17**: 371-381.

Štafa A., Žunar B., Pranklin A., Zandona A., Svetec Miklenić M., Šantek B., Svetec I. K. (2019) Novel Approach in the Construction of Bioethanol-producing *Saccharomyces cerevisiae* hybrids. *Food technology and biotechnology* **57**: 5-16.

Tenreiro S., Fernandes A. R., Sá-Correia I. (2001) Transcriptional activation of FLR1 gene during *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to growth with benomyl: role of Yap1p and Pdr3p. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**: 216-222.

Tamarin R. H. (1999) Principles of genetics, 6.izd, McGraw-Hill. str. 324-326., 329., 439-440.

Ulbricht R. J., Sharon J., Thomas J. (1984) A review of 5-hydroxymethylfurfural HMF in parental solutions. *Fundamental Applied Toxicology* **4**: 843-853.

Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**: 17-34.

Wiatrowski H. A., Carlson M. (2003) Yap1p accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **2**: 19-26.

Wilson K. L., Herskowitz I. (1984) Negative regulation of *STE6* gene expression by the a2 product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **4**: 2420-2427.

Izjava o izvornosti

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



Nina Leitner