

Konstrukcija plazmida koji omogućuje pojačanu ekspresiju konstitutivno aktivnog alela YAP1C620F

Ćurković, Lada

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:159:714419>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lada Ćurković

7112/BT

**Konstrukcija plazmida koji omogućuje pojačanu ekspresiju
konstitutivno aktivnog alela *YAP1^{C620F}***

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

Konstrukcija plazmida koji omogućuje pojačanu ekspresiju konstitutivno aktivnog alela *YAP1^{C620F}*

Lada Ćurković, 0058207213

Sažetak: Zbog složene kemijske strukture, kvasac ne može fermentirati lignocelulozne sirovine te ih je potrebno hidrolizirati, no pri hidrolizi se uz fermentabilne šećere oslobađaju i inhibitori rasta (slabe kiseline i derivati furana). Cilj ovog rada bio je uvesti točkastu mutaciju C620F u gen *YAP1* čijom translacijom nastaje konstitutivno aktivan oblik transkripcijskog faktora Yap1 koji uzrokuje povećanu otpornost stanica kvasca na visoke koncentracije furfurala i hidroksimetilfurfurala. Mutacija je uvedena u gen *YAP1* na plazmidu pSP-YAP1 u dva koraka. Tijekom lančane reakcije polimerazom sintetizirana je linearna plazmidna DNA koja sadrži točkastu mutaciju u genu *YAP1*. Linearni produkt je potom tretiran smjesom enzima KLD koja se sastoji od kinaze, ligaze i DpnI te je transformirana bakterija *E. coli* elektroporacijom. Iz transformiranih bakterijskih stanica izolirana je plazmidna DNA te je restriksijskom analizom i sekvenciranjem potvrđeno uspješno uvođenje točkaste mutacije i konstrukcija plazmida pSP-YAP1C620F.

Ključne riječi: alel *YAP1^{C620F}*, gen *YAP1*, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, mutageneza, točkasta mutacija

Rad sadrži: 24 stranice, 7 slika, 5 tablica, 34 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: 9. rujna 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

Construction of the overexpression plasmid carrying constitutively active *YAP1*^{C620F} allele

Lada Ćurković, 0058207213

Abstract: Due to their complex chemical structure yeasts cannot directly ferment lignocellulosic materials. Therefore, the lignocellulosic materials need to be hydrolysed releasing fermentable sugars and growth inhibitors (weak acids and furan derivatives). The aim of this research was to introduce a point mutation C620F in the *YAP1* gene creating constitutively active transcription factor Yap1^{C620F} that increases resistance of yeasts to high concentrations of furfural and hydroxymethylfurfural. This point mutation was introduced in the *YAP1* gene on pSP-YAP1 plasmid in two steps. A linear plasmid DNA, with *YAP1*^{C620F} allele, was synthesized in polymerase chain reaction. The PCR product was then treated with KLD mix, an enzyme mixture containing kinase, ligase and DpnI and then *E. coli* was transformed by electroporation. Plasmid DNA was isolated from transformants and the introduction of point mutation and construction of the pSP-YAP1C620F plasmid were confirmed by restriction analysis and Sanger sequencing.

Keywords: *YAP1*^{C620F} allele, *YAP1* gene, mutagenesis, point mutation, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 24 pages, 7 figures, 5 tables, 34 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: September 9th 2019.

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	2
2.1.1. Transformacija bakterije <i>E. coli</i>	2
2.2. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2.1. Upotreba kvasca <i>S. cerevisiae</i> za proizvodnju bioetanola	3
2.2.1.1. Genetičke modifikacije kvasca <i>S. cerevisiae</i> koje povećavaju otpornost na inhibitore rasta prisutne u lignoceluloznim hidrolizatima	4
2.3. Uvođenje točkastih mutacija	5
2.3.1. Mutagenaza <i>in vitro</i> (metoda po Kunkelu)	5
2.3.2. Uvođenje točkaste mutacije pomoću lančane reakcije polimerazom	6
3. Materijali i metode	7
3.1. Materijali	7
3.1.1. Plazmidi	7
3.1.2. Oligonukleotidi	8
3.1.3. Mikroorganizam	8
3.1.4. Hranjive podloge i otopine	8
3.1.5. Otopine i kompleti kemikalija za izolaciju plazmidne DNA	8
3.1.6. Komplet kemikalija za uvođenje točkastih mutacija	9
3.1.7. Otopine za gel elektroforezu	9
3.1.8. Otopine za transformaciju bakterije <i>Escherichia coli</i> elektroporacijom	10
3.2. Metode	10
3.2.1. Izolacija plazmidne DNA bakterije <i>Escherichia coli</i> iz malog volumena (mini prep) ..	10
3.2.2. Uvođenje točkaste mutacije	11
3.2.3. Gel elektroforeza	12
3.2.4. Transformacija bakterije <i>E. coli</i> elektroporacijom	12
3.2.5. Sekvenciranje DNA po Sangeru	13
4. Rezultati i rasprava	14
4.1. Provjera strukture polaznog plazmida pSP–YAP1	14
4.2. Uvođenje točkaste mutacije C620F u plazmid pSP–YAP1	15
4.3. Provjera strukture plazmida pSP–YAP1C620F	16
4.4. Sekvenciranje DNA	19
5. Zaključak	20
6. Literatura	21

1. Uvod

Proizvodnja bioetanola najčešće se provodi pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* fermentacijom škrobnih sirovina, koje se mogu koristiti i kao hrana, što čini sam proces neetičkim i skupim. Zbog toga, javlja se potreba za korištenjem drugih sirovina poput lako dostupnih lignoceluloznih materijala koji su otpad u poljoprivredi i drvenoj industriji (Limayem i Ricke, 2012). Glavni sastojci lignoceluloznih sirovina su celuloza, hemiceluloza i lignin, spojevi koje kvasac ne može direktno fermentirati, zbog čega je potrebno ovakve sirovine obraditi (Yang i Wyman, 2008) kako bi se oslobodili fermentabilni šećeri. Najčešće se za predobradu koristi tretman kiselinama pri kojem nastaju razni nusprodukti (slabe kiseline, furaldehid, derivati fenola itd.) koji inhibiraju rast mikroorganizama i sam proces alkoholnog vrenja (Laluce i sur., 2012). Kako bi se izbjegli problemi vezani uz kemijsku razgradnju lignoceluloze, razvijene su i različite fizikalne i kemijske metode detoksifikacije sirovina (Yang i Wyman, 2008).

Zbog visokih troškova predobrade i potom detoksifikacije lignoceluloznih hidrolizata, za fermentaciju je poželjno koristiti genetički modificirane proizvodne mikroorganizme koji imaju povećanu otpornost na nusprodukte nastale kemijskom razgradnjom lignoceluloznih sirovina (Laluce i sur., 2012, Zhao i Bai, 2009). Neke od genetičkih modifikacija koje dovode do povećane tolerancije stanice kvasca na visoke koncentracije inhibitora u lignoceluloznim hidrolizatima su prekomjerna ekspresija gena *ADH6* (Petersson i sur., 2006), *YAP1* (Alriksson i sur., 2010) i *HAA1* (Tanaka i sur., 2012).

Cilj ovoga rada bio je uvesti točkastu mutaciju C620F u gen *YAP1* koji se nalazi na plazmidu pSP-YAP1. Naime, translacijom alela *YAP1*^{C620F} nastaje konstitutivno aktivan oblik transkripcijskog faktora Yap1 koji uzrokuje povećanu otpornost stanica kvasca na visoke koncentracije furfurala i hidroksimetilfurfurala (Daehee i Ji-Sook, 2013). Nakon uvođenja točkaste mutacije, konstrukciju plazmida pSP-YAP1C620F koji sadrži alel *YAP1*^{C620F} potrebno je potvrditi restrikcijom analizom i sekvenciranjem.

2. Teorijski dio

2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* jedan je od najpoznatijih mikroorganizama, a otkrio ju je 1885. godine Theodor Escherich, njemačko–austrijski pedijatar i bakteriolog. *E. coli* fakultativno je anaerobna, štapićasta, gram–negativna bakterija iz porodice *Enterobacteria* čije su stanice duge otprilike 2 μm , promjera 0,25–1 μm , a stanična stijenka se sastoji od tankog sloja peptidoglikana. Nesporogen je mikroorganizam kojeg nalazimo u donjem probavnom traktu toplokrvnih organizama (Singleton, 1999).

U laboratorijskim uvjetima, uzgoj bakterije *E. coli* provodi se na krutim i tekućim hranjivim podlogama uz optimalne koncentracije ugljika, dušika, fosfora i drugih supstanci potrebnih za rast. U optimalnim uvjetima generacijsko vrijeme je kratko i iznosi 20 minuta pri temperaturi od 37 °C.

Genom bakterije *E. coli* sekvenciran je u potpunosti 1997. godine, a čini ga dvolančana kružna molekula DNA duga 4,6 milijuna parova baza (Blattner i sur., 1997). Sadrži 4288 kodirajućih gena organiziranih u 2584 operona, sedam operona ribosomalne RNA (rRNA) i osamdeset i šest gena za transportnu RNA (tRNA). Bakterija *E. coli* često se koristi kao modelni organizam za istraživanje različitih procesa u bakterijskoj stanici jer se u njezin genom precizno mogu unijeti genetičke modifikacije, a u ovoj bakteriji mogu se eksprimirati i geni različitih organizama.

2.1.1. Transformacija bakterije *E. coli*

Kod vertikalnog prijenosa gena dolazi do prijenosa genetičkog materijala s roditelja na potomstvo dok kod horizontalnog dolazi do prijenosa gena između stanica koje nisu u srodstvu (Dunning Hotopp, 2011).

U evoluciji bakterija horizontalni prijenos gena ima važnu ulogu, tako je na primjer prijenos gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju doveo do nastanka sojeva bakterija otpornih na više vrsta antibiotika (Forsberg i sur., 2012). Postoje tri metode horizontalnog prijenosa gena kod bakterija, a to su konjugacija, transdukcija i transformacija (von Wintersdorff i sur., 2016). Transformacija je ulazak slobodne DNA u stanicu koji nije potpomognut direktnim kontaktom dviju stanica ili virusom dok je kod transdukcije prijenos genetičkog materijala posredovan virusima, a konjugacija je posljedica direktnog fizičkog kontakta stanice–recipijenta i stanice–donora.

Transformacijom se smatra unos bilo koje DNA molekule u živuću stanicu (Brown, 2016). Prvi ju je opazio 1928. godine F. Griffith, a proučili su je na molekularnoj razini 1944. godine O. Avery i suradnici koji su iskoristili proces transformacije kako bi dokazali da je DNA molekula genetski materijal bakterija (Tamarin, 2001). Tijekom transformacije, stanica unosi egzogenu DNA iz okoline (Johnston i sur., 2014). Postoje prirodno kompetentne stanice koje mogu unijeti stranu DNA iz okoliša jer sadrže površinski protein - faktor kompetentnosti (Chen i Dubnau, 2004), a stanice koje nisu prirodno kompetentne mogu to postati zahvaljujući raznim metodama pripreme stanica u laboratoriju. Najčešće se primjenjuje tretman kalcijevim kloridom kako bi stanice postale propusnije za unos egzogene DNA (Donahue i Bloom, 1998).

U laboratorijskim uvjetima, prilikom transformacije, najčešće se koristi metoda elektroporacije u kojoj dolazi do unosa egzogene DNA u kompetentnu stanicu pomoću kratkog električnog pulsa visokog napona (Dower i sur., 1988).

2.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae jednostanični je eukariotski mikroorganizam koji spada u carstvo *Fungi* (Kurtzman i Fell, 2006). Stanice kvasca mogu biti u dva oblika – haploidnom i diploidnom (Zorgo i sur., 2013). Prvi je eukariotiski organizam čiji je genom u potpunosti sekvenciran, a sastoji se od 6275 gena organiziranih u 16 kromosoma od kojih je otprilike 5800 gena funkcionalno (Goffeau i sur., 1996). U aerobnim uvjetima oksidira šećere do CO₂ i H₂O, a u anaerobnim ih fermentira uglavnom u etanol i CO₂.

Optimalna temperatura rasta iznosi 28 °C, pH vrijednost 4,5 – 5,5. Uglavnom se proizvodi na kompleksnim podloga koje sadrže melasu kao izvor ugljika, anorganske soli kao izvore dušika i fosfora te faktore rasta. Kvasac *S. cerevisiae* može fermentirati i asimilirati glukozu, galaktozu, fruktozu, saharozu, maltozu, maltotriozu i manozu, a ne može metabolizirati laktozu, celobiozu, pentoze i drugu monosaharide L-konfiguracije.

2.2.1. Upotreba kvasca *S. cerevisiae* za proizvodnju bioetanola

Sojevi kvasca *S. cerevisiae* koriste se u pekarstvu, proizvodnji piva i vina, alkoholnim fermentacijama te su česti modelni organizmi u biotehnologiji i mikrobiologiji, a zadnjih godina sve više se proučavaju u svrhu proizvodnje biogoriva i bioetanola (Zhao i Bai, 2009). Kvasci korišteni u industrijskim procesima moraju se brzo prilagoditi stresnim uvjetima u kojima se provode fermentacije prilagođavanjem vlastitih metaboličkih puteva te je upravo tolerancija stanica jedan od glavnih kriterija kod odabira sojeva kvasca (Zhao i Bai, 2009).

Lignocelulozne sirovine široko su dostupne, a sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina, spojevi koje kvasac ne može direktno fermentirati, zbog čega je potrebno ovakve sirovine obraditi (Yang i Wyman, 2008) kako bi se oslobodili fermentabilni šećeri koje kvasac može metabolizirati. Najčešće se za predobradu koristi tretman kiselinama pri kojem nastaju razni nusprodukti (slabe kiseline, furaldehid, derivati fenola itd.) koji inhibiraju rast mikroorganizama i sam proces alkoholnog vrenja (Laluce i sur., 2012). Kako bi se izbjegli problemi vezani uz kemijsku razgradnju lignoceluloze, razvijene su različite fizikalne i kemijske metode detoksifikacije sirovina (Yang i Wyman, 2008).

2.2.1.1. Genetičke modifikacije kvasca *S. cerevisiae* koje povećavaju otpornost na inhibitore rasta prisutne u lignoceluloznim hidrolizatima

Zbog visokih troškova predobrade i potom detoksifikacije lignoceluloznih hidrolizata, za fermentaciju je poželjno koristiti sojeve kvasca koji toleriraju promjene osmotskog tlaka te toksične koncentracije inhibitora u lignoceluloznim hidrolizatima (Klinke i sur., 2004). Rezistencija stanica kvasca na stresne uvjete postiže se pomoću različitih genetičkih modifikacija kao što su na primjer prekomjerna ekspresije određenih gena ili unošenje gena iz drugih organizama (Laluce i sur., 2012, Zhao i Bai, 2009). Na primjer, prekomjerna ekspresija gena *ADH6* koji kodira za NADPH ovisnu alkohol-dehidrogenazu (Pettersson i sur., 2006) i gena *HAA1* koji kodira za transkripcijski faktor (Tanaka i sur., 2012), povećavaju otpornost stanica kvasca na inhibitore. S druge strane, prekomjerna ekspresija gena *ZWF1*, *GND1*, *RPE1* i *TKL1* (Gorsich i sur., 2006) te mutacije u genima *ASG1*, *ADH3*, *SKS1* i *GIS4* (González – Ramos i sur., 2016) također povećavaju otpornost stanica na visoke koncentracije inhibitora u lignoceluloznim hidrolizatima.

Transkripcijski faktor Yap1 ima važnu ulogu prilikom odgovora stanice kvasca na oksidativni stres, a odgovoran je i za otpornost stanica na široki spektar lijekova (Morano i sur., 2012). U stanicama kvasca *S. cerevisiae* ima ključnu ulogu u prilagodbi na visoke koncentracije hidroksimetilfurfurala i furfurala. H_2O_2 i elektrofilni aktiviraju Yap1 putem različitih mehanizama (Herrero i sur., 2008). Dok H_2O_2 posredno aktivira Yap1 preko glutation peroksidaze koja djeluje kao senzor za vodikov peroksid i potiče nastajanje disulfidnih mostova između cisteinskih ostataka u proteinu Yap1, derivati furana i elektrofilni direktno aktiviraju Yap1 kovalentnim modifikacijama cisteinskih ostataka (Azevedo i sur., 2003).

Susptitucijom gvanina u timin u alelu *YAP1*^{C620F} nastaje konstitutivno aktivni oblik proteina Yap1 čija prekomjerna ekspresija dovodi do dodatnog povećanja tolerancije

kvašćevih stanica na visoke koncentracije furfurala i hidrokсиметилfurfurala u odnosu na gen *YAP1* (Daehee i Ji-Sook, 2013).

2.3. Uvođenje točkastih mutacija

Točkaste mutacije promjene su u samo jednom paru baza (Tamarin, 2001). Kada je riječ o zamjeni jednog para baza, mutacije se dijele na tranzicije – zamjenu purinske baze purinskom ili pirimidinske baze pirimidinskom i transverzije – zamjena purinske baze pirimidinskom i obrnuto. Kao posljedica točkastih mutacija može doći do supstitucije, zamjene jednog para baza drugim, pri čemu ne dolazi do pomaka okvira čitanja te do delecije i insercije jednog para baza koje dovode do pomaka okvira čitanja. Nakon translacije, točkaste mutacije mogu rezultirati nastankom neke druge aminokiseline (engl. missense mutation), stop kodona (engl. nonsense mutation) ili mutacijom bez promjene fenotipa (engl. samesense mutation) (Willey i sur., 2008).

Razvijen je velik broj metoda za uvođenje točkastih mutacija (Braman, 2002), a često su korištene mutageneza po Kunkelu i uvođenje mutacija pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR).

2.3.1. Mutageneza *in vitro* (metoda po Kunkelu)

Za mutagenezu *in vitro* (Kunkel, 1985) potrebni su odgovarajući koraci pripreme kalupa DNA i specifični bakterijski sojevi. Osim za supstituciju jednog para baza, ova metoda može se koristiti i za uvođenje i drugih vrsta mutacija kao što su insercija jednog para baza ili pomak okvira čitanja engl. frameshifts (Kunkel, 1985).

Za provedbu metode, potrebna su dva soja bakterije *E. coli* fenotipova *dut⁻ ung⁻* i *E. coli dut⁺ ung⁺*. Naime, soj bakterije *E. coli* fenotipa *dut⁻ ung⁻* koja sadrži i faktor fertiliteta transformira se plazmidnom DNA u koju se planira uvesti mutacija. Sojevi fenotipa *dut⁻ ung⁻* ne sintetiziraju enzime deoksiuridin trifosfatazu i uracil N – glikozidazu te se tijekom replikacije DNA nasuprot adenina ugrađuje uracil. Plazmid se izolira u jednolančanom obliku te se sinteza komplementarnog lanca provodi *in vitro* pomoću početnice koja sadrži željenu mutaciju, a za sintezu DNA koristi se DNA polimeraza koja ne posjeduje 5'–3' egzonukleaznu aktivnost što dovodi do ugradnje adenina nasuprot uracila. Pomoću enzima T4 DNA–ligaze, ligiraju se nosintetizirani lanac i početnica. Sljedeći korak je transformacija drugog soja bakterije *E. coli* genotipa *dut⁺ ung⁺* koji nema inaktivirane enzime deoksiuridin trifosfatazu i uracil N – glikozidazu te dolazi do hidrolize kalupa koji sadrži uracil i nema uvedene

mutacije. Nakon degradacije početnog kalupa, replicira se novi *in vitro* sintetizirani lanac koji sadrži željenu mutaciju.

2.3.2. Uvođenje točkaste mutacije pomoću lančane reakcije polimerazom

Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit proizvođača New England BioLabs (SAD) komplet je kemikalija koji omogućuje brzo uvođenje točkastih mutacija u dvolančanu plazmidnu DNA.

Prvi korak pri uvođenju mutacije je lančana reakcija polimerazom u kojoj ključnu ulogu imaju dvije početnice. U jednoj se nalazi željena mutacija te je potrebno nakon mutacije na 3'-kraj dodati minimalno 10 nukleotida komplementarnih kalupu. Druga početnica komplementarno se sparuje s kalupom tik do prve, pri čemu su 3'-krajevi početnica okrenuti jedan od drugog i ne dolazi do njihovog preklapanja.

Nakon provedene lančane reakcije polimerazom, umnoženom produktu dodaje se jedinstvena smjesa enzima "KLD mix" koja se sastoji od modifikacijskih enzima kinaze i ligaze te restrikcijske endonukleaze DpnI. Kinaza i ligaza omogućuju cirkularizaciju PCR produkta kako bi nastala kružna DNA (plazmid) s uvedenom željenom točkastom mutacijom dok restrikcijski enzim DpnI prepoznaje i cijepa metiliranu GATC sekvencu u reakcijskoj smjesi i degradira isključivo kalup (to jest plazmid bez željene mutacije). Naime, DNA sintetizirana u bakteriji *E. coli* ima metilirane sekvence GATC, a DNA molekule nastale kao produkt lančane reakcije polimerazom *in vitro* nemaju metilirane sekvence.

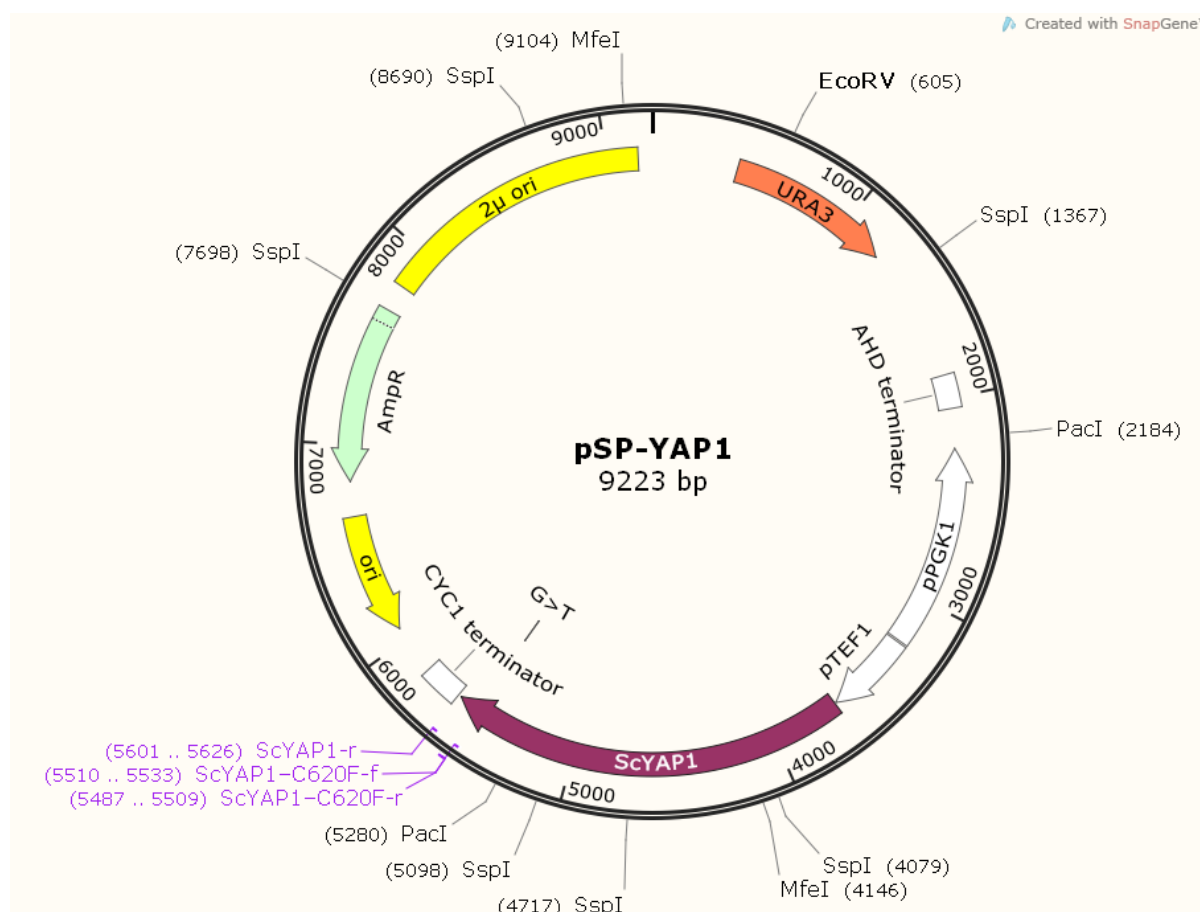
Zadnji korak uvođenja mutacije je transformacija bakterijskih stanica plazmidnom DNA koja sadrži uvedenu točkastu mutaciju (NEB, SAD).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Plazmidi

U ovome radu, kao polazni plazmid, korišten je plazmid pSP-YAP1 (Slika 1.) veličine 9223 parova baza (Štafa i sur., 2019). Ovaj plazmid sadrži regiju *ori* koja omogućava replikaciju u bakteriji *Escherichia coli*, gen *bla* koji kodira za enzim β -laktamazu te je odgovoran za rezistenciju transformiranih stanica na antibiotik ampicilin te gen *URA3* ključan za rast transformiranih stanica kvasca na podlozi bez uracila. Uz navedene gene, plazmid također sadrži i 2μ ishodište replikacije koje osigurava da se plazmid, unutar stanice kvasca, replicira i nalazi u više desetaka kopija (Strope i sur., 2015).



Slika 1. Mapa plazmida pSP-YAP1 s označenim restrikcijskim mjestima i oligonukleotidima važnim za ovaj rad. Na mapi je označena i regija u koju se uvodi točkasta mutacija (G>T).

3.1.2. Oligonukleotidi

U ovome radu korišteni su oligonukleotidi (početnice) ScYAP1–C620F-r i ScYAP1–C620F-f za uvođenje točkaste mutacije i ScYAP1-r za sekvenciranje dideoksi metodom, a sekvence početnica navedene su u Tablici 1.

Tablica 1. Oligonukleotidi korišteni prilikom provođenja lančane reakcije polimerazom (crvenim slovom označena je uvedena mutacija).

Oligonukleotid	Sekvencija
ScYAP1–C620F-r	GAC ATC AAT ATC TGA GTA TTT CG
ScYAP1–C620F-f	GAT GGT TTA TTT TCC GAG CTA ATG
ScYAP1-r	GAG AGC TAG CCC GCT TTA GTT CAT ATG CT

3.1.3. Mikroorganizam

U ovome radu korišten je soj DH5 α bakterije *E. coli* genotipa *supE44 Δ lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Stratagene, SAD).

3.1.4. Hranjive podloge i otopine

Za uzgoj bakterije *Escherichia coli* korištena je tekuća hranjiva podloga LB:

Bakto tripton	10,0 g
Kvaščev ekstrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Za selekciju i uzgoj transformanata *E. coli* priređena je kruta hranjiva podloga LB uz dodatak ampicilina. Kruta podloga LB priprema se dodatkom 15 g L⁻¹ agara. Nakon sterilizacije i hlađenja dodaje se, u sterilnim uvjetima, 2,5 mL L⁻¹ matične otopine antibiotika ampicilina (20 mg mL⁻¹) za krute podloge i 5 mL L⁻¹ za tekuće podloge.

3.1.5. Otopine i kompleti kemikalija za izolaciju plazmidne DNA

Za izolaciju plazmidne DNA korišten je komplet kemikalija Monarch Plasmid Miniprep Kit (New England BioLabs, SAD).

Osim navedenog kompleta kemikalija korištene su i sljedeće otopine:

TE pufer pH = 8

Tris – Cl 1 M (pH = 8)	1,0 mL
EDTA 0,5 M (pH = 8)	0,2 mL
Destilirana voda	do 100,0 mL

NaOH/SDS

NaOH 6 M	3,3 mL
SDS 10 %	86,7 mL
Destilirana voda	do 100,0 mL

Kalijev acetat 5 M (pH = 4,8)

Izopropanol

RNA-za

Otopina ribonukleaze A pripremi se otapanjem u 15 mM natrijevom kloridu i 10 mM Tris – HCl (pH = 7,5) do konačne koncentracije od 10 mg mL⁻¹. Slijedi zagrijavanje 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji te hlađenje. Tako pripremljena otopina se čuva na -20 °C.

3.1.6. Komplet kemikalija za uvođenje točkastih mutacija

Za uvođenje točkaste mutacije korišten je Q5 Site–Directed Mutagenesis Kit komplet kemikalija proizvođača New England BioLabs, SAD.

3.1.7. Otopine za gel elektroforezu

Prilikom provođenja gel elektroforeze korišten je 0,8 %- tni agarozni gel.

Agaroz	0,8 g
TBE pufer (10 x)	
Tris	108 g
Borna kiselina	55 g
EDTA 0,5 M (pH=8)	40 mL
Destilirana voda	do 1000 mL

TBE pufer (1 x) priprema se razrjeđivanjem TBE pufera (10 x) vodom.

Bojilo za nanošenje uzoraka

Bromfenol plavo	0,25 mL
Ksilen cijanol FF	0,25 mL
Glicerol	30,00 mL
SDS	1,00 mL
EDTA 0,5 M (pH = 8)	20,00 mL
Destilirana voda	do 100,00 mL

Za bojanje gela nakon provedene gel elektroforeze korištena je otopina etidij bromida koja se priprema dodatkom 50 µL osnovne otopine koncentracije 10 mg L⁻¹ na 1 L destilirane vode.

3.1.8. Otopine za transformaciju bakterije *Escherichia coli* elektroporacijom

SOC:

Bakto tripton	2,0 mg
Kvaščev ekstrakt	500,0 mg
NaCl	60,0 mg
KCl	20,0 mg
MgCl ₂	200,0 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	250,0 mg
Glukoza	360,0 mg
Destilirana voda	do 100,0 mL

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija plazmidne DNA bakterije *Escherichia coli* iz malog volumena (mini prep)

Za izolaciju plazmidne DNA iz bakterije *Escherichia coli*, pripremu kalupa za uvođenje točkaste mutacije, korišten je komplet kemikalija Monarch Plasmid Miniprep Kit (New England BioLabs, SAD) prema uputama proizvođača.

Plazmidna DNA iz transformanata izolirana je postupkom alkalne lize pomoću otopina navedenih u poglavlju 3.1.5. Prvi korak pri izolaciji je homogenizacija kulture vorteksiranjem i taloženje stanica iz 3 mL kulture centrifugiranjem 2 minute pri 10000 okretaja po minuti. Nakon centrifugiranja, potrebno je odliti supernatant jer se u njemu nalazi hranjiva podloga, dok talog čine bakterijske stanice. Zaostale kapljice hranjive podloge temeljito se uklanjaju vakuum sisaljkom ili staničevinom. Istaložene stanice resuspendiraju se u 100 µL TE pufera. Suspenzija se inkubira 5 minuta na ledu te se doda 200 µL otopine NaOH/SDS kako bi došlo do lize stanice. Sadržaj kivete se miješa okretanjem i inkubira na ledu 5 minuta. Proteini se talože dodatkom 150 µL 5 M kalijeva acetata (pH = 4,8) uz miješanje okretanjem kivete. Slijedi inkubacija 5 minuta na ledu te centrifugiranje 15 minuta pri 10000 okretaja po minuti. 450 µL supernatanta pažljivo se prebaci u čistu kivetu i DNA se taloži dodatkom 270 µL izopropanola (0,6 ukupnog volumena) i centrifugira 10 minuta pri 10000 okretaja po minuti. Odlje se supernatant, a zaostale kapljice uklanjaju se vakuum sisaljkom te se talog suši otprilike 10 minuta. Dobiveni talog otapa se u smjesi 30 µL TE pufera i 1 µL RN-aze te se inkubira na 15 minuta pri 60 °C.

3.2.2. Uvođenje točkaste mutacije

Za uvođenje ciljane točkaste mutacije, korišten je komplet kemikalija NEB Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB, SAD). Proces se može podijeliti u dva dijela. Prvi dio je umnažanje DNA i uvođenje mutacije pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. PCR, Polymerase Chain Reaction), a drugi korak je tretman PCR produkta enzimima kinazom, ligazom i Dpn I.

Točkasta mutacija koja je uvođena u plazmid nalazi se u jednom od oligonukleotida korištenih za umnažanje DNA pomoću PCR-a (Tablica 1.). Za provođenje PCR potrebno je napraviti reakcijsku smjesu određenog sastava, prema uputama proizvođača masa DNA mora iznositi 1 – 25 ng (Tablica 2.).

PCR reakcija provedena je s dva uzorka od kojih je jedan razrijeđen 20 puta, a drugi nije kako bismo imali različite mase DNA u dva uzorka i time osigurali da upotrebljene mase odgovaraju uputama proizvođača. Masa DNA u razrijeđenom uzorku volumena 1,00 μL iznosila je 1,88 ng, a masa u nerazrijeđenom 22,50 ng.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za PCR.

Sastav	Volumen
DNA (1 – 25 ng)	1,00 μL
primer 1 (10 μM)	1,25 μL
primer 2 (10 μM)	1,25 μL
Q5 Hot Start – Fidelity 2x Master mix	1,25 μL
destilirana voda	9,00 μL
	$\Sigma = 25,00 \mu\text{L}$

Provedena je reakcija u uvjetima navedenim u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom.

Korak	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Vrijeme (s)	
Inicijalna denaturacija	98	30	
Denaturacija	98	10	25 ciklusa
Annealing	57	20	
Sinteza	72	300	
Finalna sinteza	72	120	

Tijekom provođenja reakcije svi koraci osim inicijalne denaturacije i finalne sinteze provedeni su 25 puta, a daljnji koraci uvođenja mutacije provedeni su s PCR produktom volumena 1 μL . Nakon provedene reakcije nastali PCR produkt tretira se smjesom enzima kinaze, ligaze i DpnI (KLD smjesa). Smjesu enzima i PCR produkta potrebno je inkubirati na sobnoj temperaturi 5 minuta, a sastav smjese naveden je u Tablici 4.

Tablica 4. Sastav smjese PCR produkta i enzima za cirkularizaciju produkta i degradaciju kalupa.

Sastav	Volumen
PCR produkt	1,00 μL
2x KLD Reaction Buffer	5,00 μL
10x KLD Enzyme Mix	1,00 μL
Destilirana voda	3,00 μL
	$\Sigma = 10,00 \mu\text{L}$

Za transformaciju stanica elektroporacijom potrebno je pročistiti DNA jer uzorci ne smiju provoditi struju. Pročišćavanje i priprema DNA za transformaciju provedeni su pomoću kompleta kemikalija New England BioLabs-a Monarch PCR & DNA Cleanup Kit, sam proces pročišćavanja proveden je prema uputama proizvođača (New England BioLabs, SAD).

3.2.3. Gel elektroforeza

U ovom radu korištena je horizontalna agarozna gel elektroforeza. Agarozni gel pripremljen je otapanjem 0,8 grama agaroze u 100 mL TBE pufera (1 x konc.). Agarozna je pri sobnoj temperaturi u krutom stanju te ju je potrebno otopiti zagrijavanjem u puferu, a nakon otapanja gel se hladi na otprilike 50 °C. Ohlađena otopina agaroze ulije se u kalupe sa češljicom za elektroforezu (Bio–Rad, SAD) koji su očišćeni i obiljepljeni samoljepljivom trakom. Nakon što se gel skrutne, stavlja se u uređaj za elektroforezu u koji se ulije TBE pufer 1 – 2 mm iznad gela. Uzorci se nanose u jažice gela pomiješani s migracijskim bojilom (odnos 5:1) u svrhu vizualnog praćenja elektroforeze. Vrijeme provođenja elektroforeze procjenjuje se na temelju migracije bojila, a najčešće se provodi pri 60 V. Nakon provedene elektroforeze, gel se inkubira u otopini etidij bromida 15 do 20 minuta radi vizualizacije DNA te se postavi na transiluminator i osvjetli UV svjetlom. Gel se može fotografirati kroz crveni filter.

3.2.4. Transformacija bakterije *E. coli* elektroporacijom

U 5 mL tekuće LB hranjive podloge nacijepljena je jedna kolonija bakterije *E. coli* i kultura je inkubirana preko noći na 37 °C do stacionarne faze rasta. Iz uzgojene bakterijske kulture prenosi se 5 mL u novih 500 mL hranjive LB podloge i inkubira na 37 °C do eksponencijalne faze rasta. Kultura se hladi na ledu 15 – 20 minuta pa centrifugira 15 minuta 4000 o min⁻¹ pri 4 °C. Stanice se prvo resuspendiraju u 500 mL hladnog 10% - tnog glicerola, a potom u 250 mL hladnog 10 % - tnog glicerola te centrifugiraju 15 minuta na 4000 o min⁻¹ pri 4 °C. Suspenzija stanica se resuspendira u 20 mL 10 % -tnog hladnog

glicerola, centrifugira 15 minuta na 4000 o min^{-1} pri $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ te resuspendira u 1 mL hladnog 10 % -tnog glicerola. Ovako pripremljene stanice mogu se čuvati mjesecima pri $-75 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

2 μL DNA otopljene u vodi odpipetira se na dno kivete i ostavi da se hladi na ledu. Na kapljicu DNA doda se 40 μL suspenzije elektrokompetentnih stanica, promiješa pipetom i inkubira na ledu 5 minuta. Suspenzija stanica i DNA prebaci se u kivetu za elektroporaciju i podvrgne električnom impulsu. Brzo se pomiješa s 1 mL otopine SOC te se inkubira 1 sat na tresilici pri 225 okretaja u minuti na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Stanice se nacijepe na krute LB podloge s ampicilinom i hranjive podloge se inkubiraju na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći.

3.2.5. Sekvenciranje DNA po Sangeru

Sekvenciranje DNA je proces određivanja slijeda nukleotida u molekuli DNA, a često se koriste kemijska metoda (Maxam – Gilbert) i dideoksi metoda (Sanger) (Behjati i Tarpey, 2013). Dideoksi metoda osniva se na sintezi komplementarnog lanca DNA u prisutstvu 2',3'-dideoksinukleotida koji ne sadrže OH skupinu ni na 2' ni na 3' atomu ugljika te ugradnja takvog nukleotida uzrokuje prekid sinteze. Prilikom provođenja metode, u reakcijskoj smjesi nalaze se i odgovarajući deoksinukleotidi kako bi vjerojatnost ugradnje dideoksinukleotida bila približno 1/100 (Sanger i Coulson, 1975).

Uzorci su sekvencirani dideoksi metodom u kompaniji Mycrosynth koristeći oligonukleotid ScYAP1-r kao početnicu.

4. Rezultati i rasprava

Cilj ovog rada bio je uvođenje točkaste mutacije C620F u gen *YAP1* na plazmidu pSP–YAP1. Za uvođenje točkaste mutacije korišten je komplet kemikalija NEB Q5 Site–Directed Mutagenesis Kit, a supstitucija jednog para baza provedena je pomoću početnice koja sadrži željenu mutaciju te umnažanjem plazmidne DNA pomoću lančane reakcije polimerazom. Nakon umnažanja DNA i pročišćavanja, provedena je transformacija bakterije *E. coli* elektroporacijom, a iz uzgojenih transformanata izolirana je plazmidna DNA te je nakon restrikcijske analize i sekvenciranja potvrđena konstrukcija plazmida pSP–YAP1C620F.

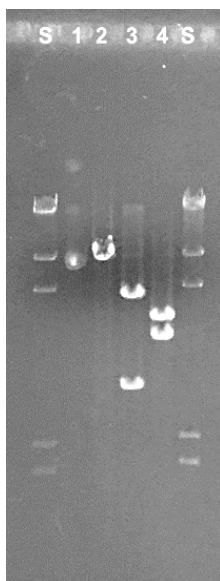
4.1. Provjera strukture polaznog plazmida pSP–YAP1

Nakon izolacije plazmidne DNA iz prekončne kulture bakterije *E. coli* provedena je restrikcijska analiza kako bi se provjerila struktura plazmida pSP–YAP1 koji je detaljno opisan u poglavlju 3.1.1. Restrikcijska analiza provedena je s tri restrikcijske endonukleaze - EcoRV, PacI i MfeI, a veličine fragmenata koji nastaju cijepanjem plazmida ovim enzimima navedene su u Tablici 5.

Tablica 5. Veličine fragmenata nastale cijepanjem plazmida pSP–YAP1 restrikcijskim enzimima EcoRV, PacI i MfeI.

Restrikcijski enzim	EcoRV	PacI	MfeI
Veličine fragmenata (pb)	9223	6127, 3096	4958, 4265

Nakon tretmana plazmida navedenim enzimima, provedena je horizontalna gel elektroforeza (poglavlje 3.2.3.) kako bi se vizualizirao rezultat cijepanja plazmida enzimima (Slika 2.).



Slika 2. Provjera izolacije plazmidne DNA. Jažice S (standard) – DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII, 1 – nepocijepani plazmid pSP-YAP1, 2 – plazmid pSP-YAP1 pocijepan endonukleazom EcoRV, 3 – plazmid pSP-YAP1 pocijepan endonukleazom PacI, 4 – plazmid pSP-YAP1 pocijepan endonukleazom MfeI.

Na temelju veličine fragmenata prikazanih na slici 2, dobivenih cijepanjem izolirane plazmidne DNA enzimima EcoRV, PacI i MfeI, potvrđena je struktura plazmida pSP-YAP1.

4.2. Uvođenje točkaste mutacije C620F u plazmid pSP-YAP1

Uvođenje točkaste mutacije provedeno je pomoću kompleta kemikalija NEB Q5 Site – Directed Mutagenesis Kit. Kako postupak uključuje i provođenje lančane reakcije polimerazom (PCR), kao kalup su korišteni nerazrijeđeni i 20 puta razrijeđeni uzorak plazmidne DNA, a po završetku reakcije provedena je gel elektroforeza zbog provjere uspješnosti reakcije i kontrole PCR produkta (Slika 3).

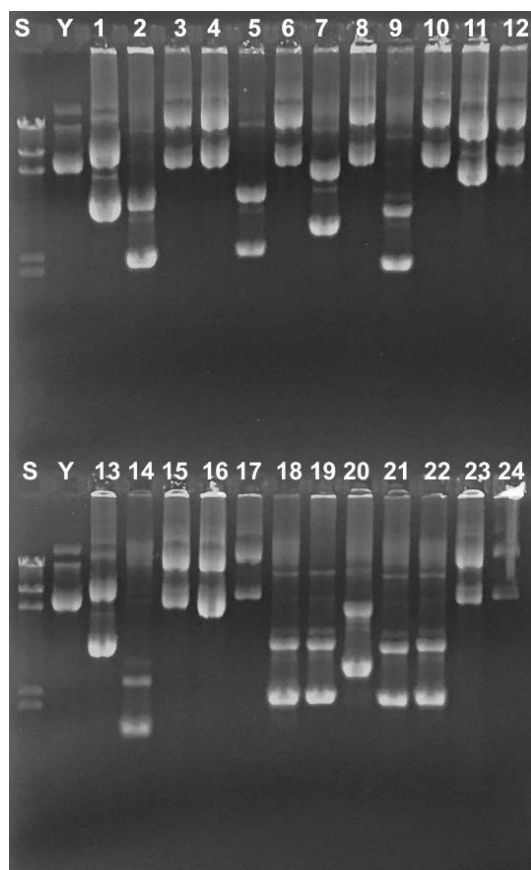


Slika 3. Provjera uspješnosti lančane reakcije polimerazom. Jažica S (standard) – DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; 1 – PCR produkt 1 nastao korištenjem originalne otopine plazmida pSP-YAP1; 2 – PCR produkt 2 dobiven korištenjem razrijeđenog plazmida pSP-YAP1; 3– plazmid pSP-YAP1 pocijepan endonukleazom EcoRV.

Na Slici 3. PCR produkt 1 dobiven je koristeći nerazrijeđeni uzorak kao kalup, dok je razrijeđeni uzorak korišten kao kalup za PCR produkt 2. Iz provedene gel elektroforeze možemo zaključiti da je uspješno provedena reakcija jer produkt veličinom odgovara polaznom plazmidu pSP-YAP1. Dobivenim PCR produktima 1 i 2 transformirane su bakterijske stanice metodom elektroporacije i transformanti su selekcionirani na krutoj hranjivoj podlozi LB uz dodatak antibiotika ampicilina.

4.3. Provjera strukture plazmida pSP-YAP1C620F

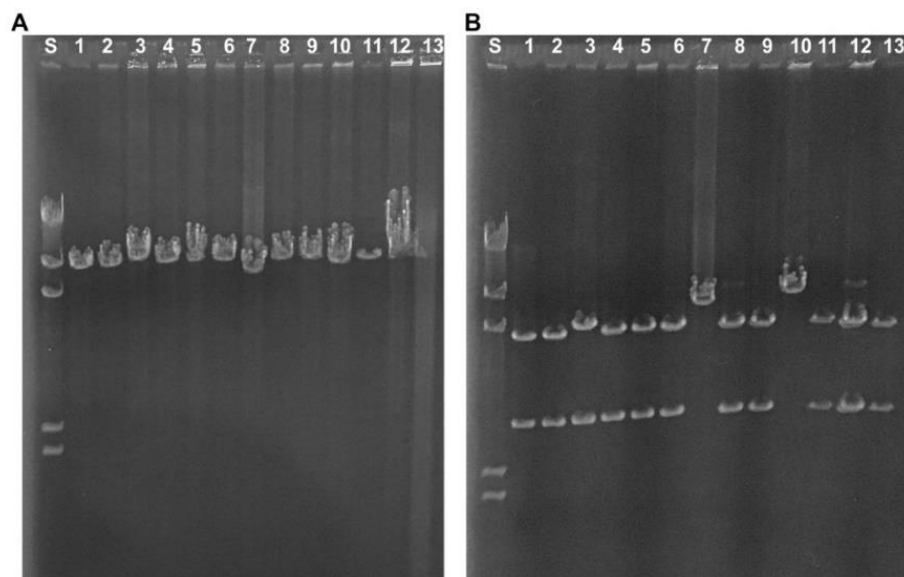
Nasumično su odabrane 24 kolonije koje su precijepljene u tekuću LB podlogu s ampicilinom. Iz prekonocnih kultura izolirana je plazmidna DNA (poglavlje 3.2.1.) te je prvo provedena gel elektroforeza kružnih plazmidnih molekula, a rezultat je prikazan na Slici 4.



Slika 4. Rezultati provedene gel elektroforeze kružne plazmidne DNA izolirane iz odabranih transformanata. Jažica S (standard) - DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; Y – nepocijepani polazni plazmid pSP–YAP1; 1-24 –plazmidna DNA izolirana iz nasumično odabranih transformanata označeni brojevima 1-24.

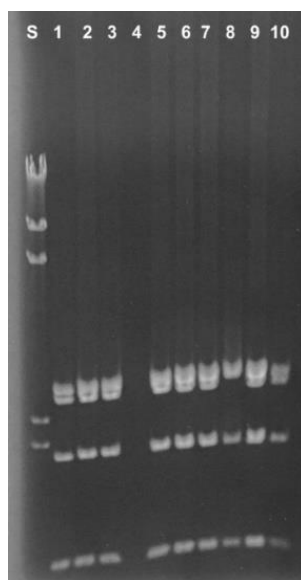
Usporedbom veličine kružne plazmidne DNA izolirane iz odabranih transformanata i polaznog kružnog plazmida pSP–YAP1 može se zaključiti da plazmidna DNA uzoraka 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 23 i 24 veličinom odgovara polaznom plazmidu, dok ostali uzorci ne odgovaraju i neće se dalje neće koristiti u radu. Plazmidna DNA koja veličinom ne odgovara polaznom plazmidu mogla je nastati zbog istovremenog tretiranja PCR produkta kinazom (dodaje fosfatnu skupinu), ligazom (ligira DNA) i restrikcijskim enzimom DpnI (degradira kalup) te je došlo do djelomičnog degradiranja PCR produkata te njihove ligacije.

Izolirana plazmidna DNA, koja je u kružnom obliku putovala kao i početni plazmid, podvrgnuta je daljnjoj restrikcijskoj analizi, kako bi se utvrdilo odgovara li veličinom i strukturom početnom plazmidu. Provedena je gel elektroforeza nakon tretmana s endonukleazama EcoRV i PacI (Slika 5.).



Slika 5. Restriksijska analiza plazmidne DNA pocijepane enzimima EcoRV (A) i PacI (B). Jažica S (standard) - DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; 1 – plazmid pSP–YAP1 pocijepan endonukleazom EcoRV (A) i PacI (B); 2 – uzorak 3; 3 – uzorak 4; 4 – uzorak 6; 5 – uzorak 8; 6 – uzorak 10; 7 – uzorak 11; 8 – uzorak 12; 9 – uzorak 15; 10 – uzorak 16; 11 – uzoraka 17; 12 – uzorak 23; 13 - uzorak 24.

Nakon restriksijske analize transformanata, utvrđeno je da plazmidna DNA uzoraka 4, 11 i 16 ne odgovara veličinom. Uzorci 3, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 23 i 24 podvrgnuti su još jednoj restriksijskoj analizi s endonukleazom SspI koja cijepa plazmid na šest fragmenata različitih veličina – 0,3 kb, 0,6 kb, 1 kb, 1,9 kb, 2,6 kb i 2,7 kb (Slika 6.)



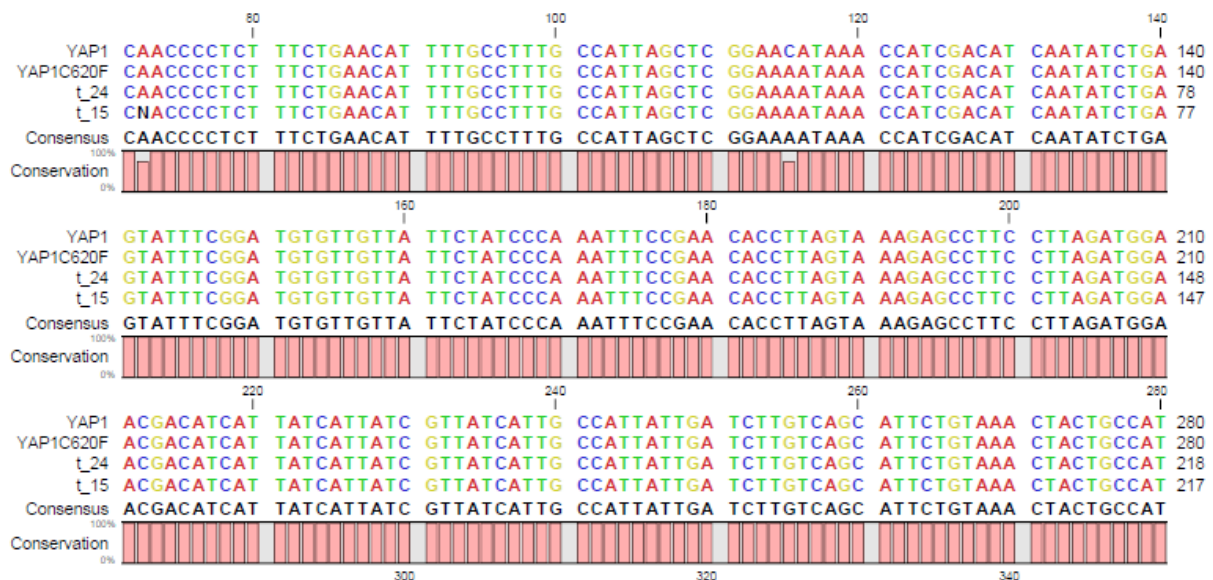
Slika 6. Restriksijska analiza plazmidne DNA enzimom SspI. Jažica S (standard) - DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII, 1 – plazmid pSP–YAP1; 2 – uzorak 3; 3 – uzorak 6; 4 – uzorak 8; 5 – uzorak 10; 6 – uzorak 12; 7 – uzorak 15; 8 – uzorak 17; 9 – uzorak 23; 10 – uzorak 24.

Plazmidna DNA uzorka 17 ne odgovara veličinom jer joj nedostaje fragment veličine 2,6 kb, a uzorak 8 je nepravilno unesen u jažicu prilikom nanošenja uzoraka na gel. Plazmidne DNA uzoraka 3, 6, 10, 12, 15, 23 i 24 odgovaraju veličinom fragmenata te su za sekvenciranje odabrani uzorci 15 i 24.

4.4. Sekvenciranje DNA

Uzorci 15 i 24 sekvencirani su dideoksi metodom (Sanger) u kompaniji MycrSynth kako bi utvrdili točan redoslijed nukleotida i provjerili uvođenje točkaste mutacije C620F.

Za sekvenciranje je korišten oligonukleotid ScYAP1-r (Tablica 1.), a na Slici 7. prikazani su sravnjeni rezultati sekvenciranja plazmidne DNA iz transformanata 15 i 24 te slijedovi nukleotida u divljem tipu gena *YAP1* i alelu *YAP1^{C620F}*.



Slika 7. Sravnjeni rezultati sekvenciranja gena *YAP1* iz transformanata 15 i 24. YAP1 - slijed nukleotida u divljem tipu gena *YAP1*, YAP1C620F - slijed nukleotida u alelu *YAP1^{C620F}*, t_15 - DNA izolirana iz transformanta 15, t_24 - DNA izolirana iz transformanta 24.

Točkasta mutacija C620F nalazi se na poziciji 115 gdje se umjesto citozina, koji se nalazi u divljem tipu gena *YAP1*, nalazi adenin. Na temelju sekvenciranja možemo zaključiti da je u oba uzorka uvedena željena točkasta mutacija C620F.

5. Zaključak

Iz dobivenih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti:

1. Pomoću Q5 – Site Directed Mutagenesis kompleta kemikalija uspješno je uvedena točkasta mutacija u gen *YAP1* jer su iz transformanata bakterije *Escherichia coli* izolirani plazmidi koji nose alel *YAP1^{C620F}*.
2. Odvajanje enzimskih reakcija degradacije kalupa pomoću restriksijske endonuklaze DpnI i dodatka fosfatnih skupina na 5'-krajeve DNA te ligacije PCR produkta, omogućilo bi potpunu degradaciju kalupa DNA. Iako bi ovakva modifikacija protokola produljila vrijeme pripreme DNA za transformaciju, uvelike bi se skratilo vrijeme potrebno za analizu transformanata jer bi gotovo svi transformanti sadržavali plazmid s unesenom točkastom mutacijom.

6. Literatura

Alriksson B., Horvath I.S., Jonsson L.J. (2010) Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose –derived fermentation inhibitors. *Process Biochemistry* **45**: 264 – 271.

Azevedo D., Tacnet F., Delaunay A., Rodrigues - Pousada C., Toledano M.B. (2003) Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **35**: 889 – 900.

Behjati S., Tarpey P.S. (2013) What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition* **98**: 236 – 238.

Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)* **277**: 1453 – 1462.

Braman J. (2002). In Vitro Mutagenesis Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 2. izd., Humana Press, str 111 - 113.

Brown T. A. (2016) *Gene Cloning & DNA Analysis*, 7th Edition, Wiley, 340 – 344.

Chen I., Dubnau D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews. Microbiology* **2**: 241 – 249.

Daehee K., Ji-Sook H. (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 and Environmental Microbiology* **79**: 5069 - 5077.

Donahue R.A., Bloom F.R. (1998) Large-volume transformation with high-throughput efficiency chemically competent cells. *Focus* **20**: 54 - 56.

Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. (1988) High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**: 6127 – 6145.

Dunning Hotopp J.C. (2011) Horizontal gene transfer between bacteria and animals. *Trends in genetics* **27**: 157 - 163.

Forsberg K. J., Reyes A., Wang B., Selleck E. M., Sommer M. O., Dantas G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* **337**: 1107 – 1111.

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** (5287): 546. 563 - 567.

González - Ramos D., Gorter de Vries A. R., Grijsseels S. S., van Berkum M. C., Swinnen S., van den Broek M., et al. (2016) A new laboratory evolution approach to select for constitutive acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations. *Biotechnology for Biofuels* **9**:173.

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.

Herrero E., Ros J., Belli G., Cabisco E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**:1217 – 1235.

Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claverys J.P. (2014) Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews. Microbiology*. **12**: 181 – 196.

Klinke H.B., Thomsen A.B., Ahring B.K. (2004) Inhibition of ethanol – producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre – treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**: 10 – 26.

Kunkel T.A (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 488 – 492.

Kurtzman C.P., Fell J.W. (2006) Yeast Systematics and Phylogeny—Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook*. Springer, 11 – 30.

Laluce C., Schenberg A.C.G., Gallardo J.C.M., Coradello L.F.C., Pombeiro – Sponchiado S.R. (2012) Advances and developments in strategies to improve strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processes to obtain the lignocellulosic ethanol – a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **166**: 1908 - 1926.

Limayem A., Ricke S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspective, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* **38**: 449 - 467.

Morano K.A., Grant C.M., Moye - Rowley W.S. (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**:1157 –1195.

NCBI The National Center for Biotechnology Information

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6135910/>> Pristupljeno 18. srpnja 2019.

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

Sanger F., Coulson A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* **94**: 441 – 446.

Singleton P. (1999) Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. 5th Edition, Wiley, Hoboken, 444 - 454.

Strope K.P., Kozmin S.G., Skelly D.A., Magwene P.M., Dietrich F.S., McCusker J.H. (2015) 2 μ plasmid in *Saccharomyces* species and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research* **15**: 90.

Tamarin R. H. (2001) Principles of genetics, 7th Edition, McGraw-Hill Publishers, New York, 157 – 327.

Tanaka K., Ishii Y., Ogawa J., Shima J. (2012) Enhancement of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the *HAA1* gene, encoding a transcriptional activator. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 8161– 8163.

von Wintersdorff C. J., Penders J., Van Niekerk J. M., Mills N. D., Majumder S., Van Alphen L. B., et al. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology* **7**: 173.

Willey J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. (2008) Prescott, Harley, and Klein's Microbiology, 7th Edition, McGraw – Hill, 320 – 322.

Yang B., Wyman C.E. (2008) Pretreatment: the key to unlocking low – cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts Biorefining* **2**: 26 - 40.

Zhao X.Q., Bai F.W. (2009) Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology* **144**: 23 – 30.

Zorgo E., Chwialkowska K., Gjuvsland A.B., Garré E., Sunnerhagen P., Liti G., Blomberg A., Omholt S.W., Warringer J. (2013) Ancient evolutionary trade-offs between yeast ploidy states. *PLoS Genet* **9**: 57 – 64.

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.

J. Čirković

ime i prezime studenta