

# Metode genetičke transformacije kvasaca

---

Jurić, Gabrijelela

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:513574>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



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

**Gabrijela Jurić**

7365/BT

## **METODE GENETIČKE TRANSFORMACIJE KVASACA**

### **ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Genetičko inženjerstvo

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

**Zagreb, 2020.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Metode genetičke transformacije kvasaca

*Gabrijela Jurić, 0058210413*

**Sažetak:** Pod pojmom genetička transformacija podrazumijeva se laboratorijski postupak unošenja DNA u neku stanicu što rezultira promjenom genotipa i fenotipa transformirane stanice. Ovaj postupak se koristi u genetičkom inženjerstvu, a od iznimnog je značaja u biotehnologiji jer omogućava konstrukciju sojeva koji se koriste kao radni organizmi u biotehnološkim procesima. U ovom radu diskutirane su prednosti i mane metoda koje se najčešće koriste za transformaciju kvasaca kao što su metoda protoplastiranja, metoda pomoću litijevog acetata, elektroporacija, metoda pomoću staklenih kuglica, biolistička transformacija te transformacija pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Osim toga dane su najvažnije karakteristike vektora (molekula DNA) koje se koriste za ekspresiju heterolognih proteina i modifikaciju kvaščevog genoma te karakteristike pojedinih nekonvencionalnih kvasaca i primjeri njihove primjene u biotehnologiji.

**Ključne riječi:** Genetička transformacija, metode transformacije, konvencionalni kvasci, nekonvencionalni kvasci, *Saccharomyces cerevisiae*

**Rad sadrži:** 32 stranice, 6 slika, 3 tablice, 66 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri pisanju:** Ivona Marjanović, mag. ing. biotechn.

**Datum obrane:** 15. rujna, 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department for Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **Yeasts transformation methods**

***Gabrijela Jurić, 0058210413***

**Abstract:** The term genetic transformation refers to a laboratory procedure of introducing DNA into a cell, which results in a change of the genotype and phenotype of the transformed cell. This procedure has been used in genetic engineering, and is of great importance in biotechnology because it allows the construction of strains, which are used as working organisms in biotechnological processes. This paper discusses the advantages and disadvantages of the commonly used yeast transformation methods such as spheroplast method, lithium acetate method, electroporation, glass beads method, biolistic transformation and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. In addition, the most important characteristics of vectors (DNA molecules) used for the expression of heterologous proteins and modification of the yeast genome are given, as well as the characteristics of several unconventional yeasts and examples of their application in biotechnology.

**Keywords:** Conventional yeasts, genetic transformation, transformation methods, , non-conventional yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

**Thesis contains:** 32 pages, 6 figures, 3 tables, 66 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Prof. Ivan-Krešimir Svetec, Ph.D.

**Technical support and assistance:** Ivona Marjanović, mag. ing. biotechn.

**Defence date:** September 15<sup>th</sup> 2020

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Kvasci.....	3
2.1.1. Konvencionalni kvasci.....	3
2.1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	3
2.1.1.2. <i>Shizosaccharomyces pombe</i> .....	5
2.1.2. Nekonvencionalni kvasci .....	5
2.1.2.1. <i>Komagataella (Pichia) pastoris</i> .....	5
2.1.2.2. <i>Hansenula polymorpha</i> .....	6
2.1.2.3. <i>Yarrowia (Candida) lipolytica</i> .....	6
2.1.2.4. <i>Schefferomyces (Pichia) stipitis</i> .....	6
2.1.2.5. <i>Kluyveromyces lactis</i> i <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	7
2.2. Vektori za genetičku transformaciju kvasaca.....	8
2.3. Metode genetičke transformacije kvasaca .....	11
2.3.1. Metoda protoplastiranja .....	11
2.3.2. Metoda pomoću litijevog acetata.....	13
2.3.3. Elektroporacija.....	15
2.3.4. Transformacija pomoću staklenih kuglica .....	17
2.3.5. Biolistička transformacija .....	18
2.3.6. Transformacija pomoću bakterija iz roda <i>Agrobacterium</i> .....	20
2.3.7. Transformacija ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca.....	22
2.3.8. Usporedba metoda transformacije kvasaca .....	23
2.4. Primjena transgenih kvasaca.....	26
3. ZAKLJUČAK.....	27
4. POPIS LITERATURE .....	28

# 1. UVOD

Kvasci su vrlo važni mikroorganizmi koji imaju široku primjenu u svim područjima biotehnologije. Zbog sposobnosti pravilnog post-translacijskog modificiranja, brzog rasta, mogućnosti scale-up fermentacije te jednostavne genetičke manipulacije, vrlo su vrijedni domaćini za proizvodnju različitih proizvoda (Baghban i sur., 2019). Kako bi upotreba kvasaca u biotehnološkim procesima bila što učinkovitija, odnosno kako bi se postigli što veći prinosi, potrebno je optimizirati bioprocese, što prije svega zahtijeva optimizaciju sojeva na genetičkoj razini. Za proizvodnju specifičnog produkta i najprikladniji ekspresijski sustavi trebaju biti optimizirani kako na genetičkoj tako i fermentacijskoj razini (Baghban i sur., 2019). Transformacija, tehnika unosa egzogene DNA u stanice koja rezultira genetičkom modifikacijom, neophodna je za manipulaciju stanicama funga (Kawai i sur., 2010). Razvoj genetičke transformacije otvorio je vrata genetičkom modificiranju, a početkom razvoja prve metode za transformaciju kvasaca, metode sferoplasta, počeli su se razvijati i različiti replikativni te integrativni vektori za transformaciju kvasaca, odnosno transformirajuća DNA. Metoda protoplastiranja, metoda pomoću litijevog acetata, elektroporacija, transformacija pomoću staklenih kuglica i biolistička transformacija su klasične metode transformacije koje se za transformaciju kvasaca koriste već desetljećima. Razvojem novih metoda, poput transformacije posredovanjem *Agrobacterium tumefaciens*, te poboljšavanjem postojećih metoda transformacije kvasaca, pokušavala se omogućiti što brža, efikasnija i jednostavnija transformacija. Do danas je razvijen niz metoda i protokola koji se zbog svojih različitih prednosti koriste u različitim eksperimentima. Konvencionalni kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Shizosaccharomyces pombe* imaju široku primjenu već dugi niz godina. Priroda nekih bioprocasa zahtijeva specifičan fenotip radnog mikroorganizma, kao što su termotolerancija, uspješno metaboliziranje alternativnih izvora ugljika, rezistencija na neke inhibitore rasta, sinteza specifičnih biomolekula te visoka sekrecija proteina. Zbog toga sve veću primjenu imaju nekonvencionalni kvasci kao što su *Komagataella pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Schefferomyces stipitis* i *Kluyveromyces* sp. (Löbs i sur., 2017). Do nedavno se uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija u nekonvencionalne kvasce osnivalo isključivo na homolognoj rekombinaciji između genoma i transformirajuće DNA, koja je u ovim kvascima u pravilu slabo efikasna, a u novije vrijeme sve češće se koristi sustav CRISPR/Cas (Löbs i sur., 2017). Prethodno navedene metode genetičke transformacije, koje su prvobitno razvijene za transformaciju najistraženijeg kvasca *S. cerevisiae*, vremenom su razvijane i za druge vrste kvasaca te danas postoje protokoli i za njihovu transformaciju. Međutim, i dalje se većina

nekonvencionalnih kvasaca može transformirati svega s nekoliko metoda od kojih većina ima malu efikasnost. Daljnji razvoj metoda će omogućiti veći izbor visokoefikasnih protokola te olakšati genetičko modificiranje proizvodnih sojeva.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Kvasci

Kvasci su eukariotski jednostanični organizmi iz carstva *Fungi*. Većina vrsta kvasaca pripada koljenu *Ascomycota*, a nekoliko njih su *Basidiomycota*. Danas je poznato više od 1500 vrsta kvasaca (Kurtzman i Fell, 2006), među kojima je najpoznatiji modelni kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Razmnožavanje kvasaca može biti aseksualno pupanjem ili fisijom, odnosno poprečnom diobom te seksualno stvaranjem spora (Joseph i Bachhawat, 2014). Kvasci su heterotrofni organizmi koji preferiraju metabolizirati šećere, koje prevode do etanola i CO<sub>2</sub>, ali mogu koristiti različite izvore ugljika, poput aminokiselina, organskih kiselina, poliola, alkohola, masnih kiselina i drugih spojeva, ovisno o vrsti kvasca. Prema procesu kojim dobivaju energiju, kvasci se dijele na: nefermentativne kvasce koji imaju samo respiracijski metabolizam; obligatno-fermentativne koji mogu metabolizirati samo glukozu kroz alkoholnu fermentaciju; i fakulativno-fermentativne kvasce koji imaju ili potpuno respiracijski ili fermentativni metabolizam ili čak oba, ovisno o uvjetima rasta, vrsti i koncentraciji izvora ugljika te dostupnosti kisika (Toffalo i Suzzi, 2016).

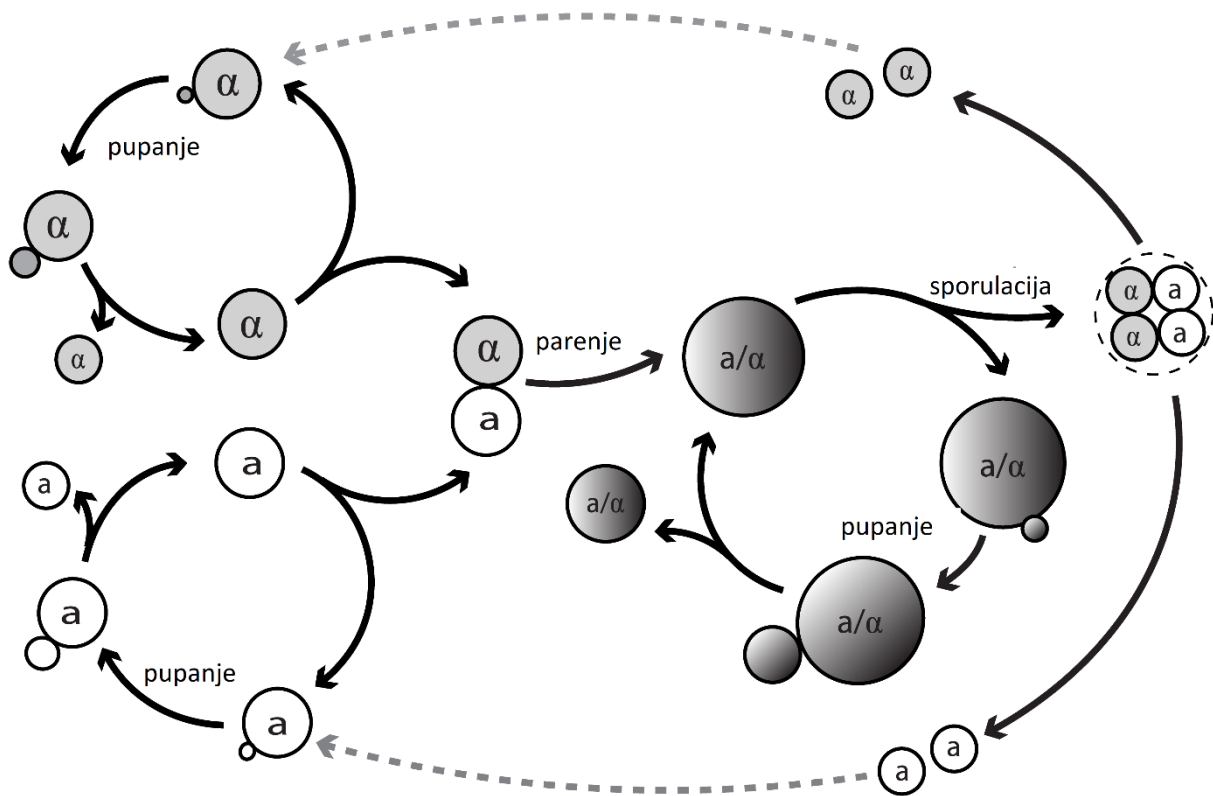
#### 2.1.1. Konvencionalni kvasci

Kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* su najbolje istraženi kvasci te imaju najširu primjenu, dok sve ostale vrste kvasaca pripadaju nekonvencionalnima (Spencer i sur., 2002).

##### 2.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* je daleko najistraženiji eukariotski organizam koji se stoljećima koristi za proizvodnju hrane i alkoholnih pića. Zbog svoje nepatogenosti i dugogodišnje primjene, dobio je GRAS status („Generally Recognized As Safe“). Genom kvasca *S. cerevisiae*, kojeg čini 16 kromosoma i mitohondrijska DNA, potpuno je sekvencioniran 1996. (Goffeau i sur., 1996). Veličina genoma je oko 12,5 Mb te sadrži 5821 gena (Hoffman i sur., 2015). Stanice *S. cerevisiae* su ovalne, dimenzija 4,8 x 4,2 µm u haploidnom, a 5,0 x 6,0 µm u diploidnom obliku. *S. cerevisiae* se razmnožava aseksualno pupanjem, pri čemu je nastala stanica kći manja od stanice majke, a na stanici majci ostaje ožiljak na mjestu odvajanja pupa, odnosno stanice kćeri. Osim aseksualnog razmnožavanja *S. cerevisiae* ima i seksualni ciklus (slika 1.) (Wang i sur., 2017).





Slika 1. Životni ciklus *S. cerevisiae* (Wang i sur., 2017)

Stanice kvasca *S. cerevisiae* mogu imati različite tipove parenja. Tako su haploidne stanice  $a$  ili  $\alpha$  tipa parenja, a diploidne stanice su  $a/\alpha$  tipa. Haploidne stanice mogu se razmnožavati samo pupanjem, a konjugacijom haploidnih stanica različitog tipa parenja nastaje diploidna stanica koja se može razmnožavati mitozom odnosno pupanjem ili u procesu mejoze može formirati askuse s 4 haploidne spore, dvije  $a$  i dvije  $\alpha$  tipa parenja (Thom i Dunze, 1970; Herkowitz, 1988). *S. cerevisiae* može fermentirati heksoze D-glukozu, D-fruktozu i D-manozu te većina sojeva može fermentirati i saharozu, maltozu, maltotriozu i D-galaktozu, dok su dekstrini, škrob, laktoza, L-šećeri i pentoze nefermentabilni. Zbog mogućnosti jednostavnog genetičkog manipuliranja, kratkog generacijskog vremena (1,25 - 2 h pri 30 °C), eukariotske stanične strukture i iznimne ekonomske važnosti, *S. cerevisiae* je razvijen u modelni eukariotski organizam (Stewart, 2014). Unatoč tome što je *S. cerevisiae* izvrstan domaćin za konverziju glukoze u etanol, proizvodnja drugih kemikalija iz alternativnih supstrata često zahtijeva ekstenzivnu primjenu genetičkog i metaboličkog inženjerstva. Kako bi se to izbjeglo, često se odabiru drugi kvasci kao domaćini za bioprocese na temelju njihove prirodne sposobnosti proizvodnje željenog produkta (Löbs i sur., 2017).

#### 2.1.1.2. *Shizosaccharomyces pombe*

*Shizosaccharomyces pombe* je fisijski kvasac (vegetativno se razmnožava poprečnom diobom) poznat kao modelni organizam molekularne i stanične biologije. Genom kvasca *Sc. pombe* je sekvencioniran 2002. godine (Wood i sur., 2002), a njegova veličina je oko 13,8 Mb. Unatoč tome što je veličina genoma *Sc. pombe* slična veličini genoma *Saccharomyces cerevisiae*, *Sc. pombe* ima samo 3 velika kromosoma. Stanice *Sc. pombe* su cilindričnog oblika s hemisfernim krajevima, promjera oko 3,5  $\mu\text{m}$ , a duljine 8 – 15  $\mu\text{m}$ . Za razliku od YPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose) medija koji se koristi za uzgoj *S. cerevisiae*, za uzgoj *Sc. pombe* se koristi YES (Yeast Extract with Supplements) medij. YPD medij nije povoljan za uzgoj *Sc. pombe* zbog prisutnosti peptona te onemogućuje njegov rast. Također, standardni definirani mediji koji se koriste za uzgoj *S. cerevisiae* SC (Synthetic Complete) i SD (Synthetic Defined) su manje povoljni za uzgoj *Sc. pombe* od EMM (Edinburgh Minimal Medium) medija (Hoffman i sur., 2015). Ovaj dobro okarakterizirani kvasac poznat je kao domaćin za proizvodnju mnogih heterolognih proteina.

#### 2.1.2. Nekonvencionalni kvasci

Nekonvencionalni kvasci *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha* i *Komagataella (Pichia) pastoris* su razvijeni kao eukariotski domaćini zbog poželjnog fenotipa poput termotolerancije, asimilacije različitih izvora ugljika te visoke sekrecije proteina (Lobs i sur., 2017).

##### 2.1.2.1. *Komagataella (Pichia) pastoris*

*Komagataella pastoris* ima nekoliko karakteristika koje ga čine odličnim domaćinom za ekspresiju heterolognih proteina, a to su mogućnost rasta pri velikoj gustoći stanica, proizvodnja heterolognih proteina s vrlo visokim prinosima, efikasna sekrecija proteina te mogućnost korištenja jednostavnih metoda transformacija. *K. pastoris* je metilotrofni kvasac, što znači da može koristiti metanol kao izvor ugljika i energije. Koristi se za proizvodnju više od 500 heterolognih proteina, a efikasan je i u proizvodnji karotenoida, kao što su likopen i  $\beta$ -karoten. Genetička modifikacija glikozilacijskog puta u *K. pastoris* omogućila je ovim sojevima proizvodnju kompleksnih N-glikana sisavaca te humanih glikana, koji su u sastavu rekombinantnog glikoproteina eritropoetina (Steensels i sur., 2014).

#### 2.1.2.2. *Hansenula polymorpha*

Metilotrofni kvasac *Hansenula polymorpha* je istraživan kao modelni organizam za funkciju peroksisoma, kao i za asimilaciju nitrata. Dostupnost jakog inducibilnog ekspresijskog sustava, zajedno s efektivnom sekrecijom proteina te glikozilacijom čini *H. polymorpha* vrlo uspješnim domaćinom za proizvodnju proteina. Glikozilacija proteina koju provodi ovaj kvasac je vrlo važna, jer je sličnija ljudskoj od one koju provodi *S. cerevisiae* te se intenzivno radi na njenoj optimizaciji. Proizvodi dostupni na tržištu dobiveni pomoću *H. polymorpha* su rekombinantno cjepivo protiv hepatitisa B, inzulin, interferon alfa-2a, hirudin, fitaza, heksoza oksidaza i lipaza (Baghban i sur., 2019). Termotolerancija, vrlo širok spektar supstrata koje može iskoristiti i otpornost na većinu inhibitora rasta, čine ga odličnim kandidatom za proizvodnju biokemikalija, posebno iz lignoceluloznih sirovina (Steensels i sur, 2014).

#### 2.1.2.3. *Yarrowia (Candida) lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* je telemorfni oblik kvasca *Candida lipolytica*. Sa svojim potpuno sekvencioniranim genomom, jedan je od najistraženijih nekonvencionalnih kvasaca. Jedna od najvažnijih karakteristika ovog kvasca je sposobnost efikasnog iskorištavanja hidrofobnih supstrata, poput n-alkana, masnih kiselina i ulja kao jedinih izvora ugljika te mogućnost nakupljanja lipida do 50 % suhe tvari biomase. *Y. lipolytica* je najpoznatija po proizvodnji proteina jednostaničnih organizama („single cell proteins“) (Duraković i sur., 2001), ali se koristi i u proizvodnji organskih kiselina (najviše limunske), aroma, poliola (manitola i eritritola), bio-ulja, biotransformaciji steroida te za tretiranje otpada. *Y. lipolytica* ima GRAS status te je važna i u proizvodnji fermentirane hrane, poput plavog sira (Steensels i sur., 2014).

#### 2.1.2.4. *Schefferomyces (Pichia) stipitis*

*Pichia stipitis* je kvasac koji pripada koljenu *Ascomycota* te je proučavan zbog svoje sposobnosti da fermentira ksilozu (pentozu) u etanol, L-mliječnu kiselinu i druge produkte. Unatoč sposobnosti da fermentira ksilozu uz gotovo maksimalni prinos i vrlo ograničeno nastajanje nusproizvoda, problemi kod ovog kvasca su to što je Crabtree-negativan, niska tolerancija na etanol i sporija potrošnja šećera u odnosu na *S. cerevisiae*. Zbog toga je biotehnološka primjena *P. stipitis* bila ograničena na prijenos njegovih gena u *S. cerevisiae*, kako bi se omogućila fermentacija pentozu. Međutim, sekvencioniranjem genoma *P. stipitis* te razvojem efikasnijih transformacijskih sustava (plazmidni vektori, loxP/Cre rekombinacijski sustav) i genetičkih markera stvorila se mogućnost za genetičke modifikacije i industrijsku primjenu (Steensels i sur, 2014).

#### 2.1.2.5. *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus*

*Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus* su proučavani desetljećima, a danas se primjenjuju u različitim procesima prehrambene industrije. Ovaj rod kvasaca je najpoznatiji po proizvodnji goveđeg enzima za koagulaciju mlijeka, kimozina, prvog proteina koji potječe iz viših eukariota i koji je uspješno proizveden u mikroorganizmu niske cijene. Danas se koristi za proizvodnju velikog broja heterolognih proteina poput lakaze i interleukina 1-b. Važna industrijska karakteristika ovih kvasaca je korištenje laktoze kao primarnog izvora ugljika, što ima veliku primjenu u proizvodnji mliječnih proizvoda i biogoriva. *K. lactis* se također pokazao kao dobar domaćin za proizvodnju vitamina C (L-askorbinske kiseline) (Steensels i sur, 2014).

## 2.2. Vektori za genetičku transformaciju kvasaca

Vektori za genetičku transformaciju izuzetno su važni u provedbi genetičkih modifikacija jer služe kao ekspresijski vektori, ali i za uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija u genom kvasaca. Osnovne sekvence vektora su inducibilni ili konstitutivni promotor sa snažnom transkripcijskom aktivnošću, selektivni marker za selekciju transformanata i polilinker MCS („multiple cloning site“), koji sadrži restrikcijiska mjesta za inserciju stranih gena. U Tablici 1. su prikazani neki od najčešćih selektivnih markera i promotora u kvašćevim ekspresijskim sustavima (Baghban i sur., 2019).

Tablica 1. Neki od najčešćih promotora koji se koriste na ekspresijskim vektorima te geni koji se koriste za selekciju transformiranih stabica kvasca (Baghban i sur., 2019)

Kvasac	Selektivni markeri	Promotori gena
<i>Pichia pastoris</i>	<b><i>bleo<sup>r</sup></i></b> – daje rezistenciju na zeocin <b><i>hyg<sup>r</sup></i></b> – daje rezistenciju na higromicin <b><i>KanMX4</i></b> – daje rezistenciju na geneticin <b><i>HIS4</i></b> – sudjeluje u biosintezi histidina <b><i>ADE2</i></b> – sudjeluje u biosintezi adenina	<b><i>AOX</i></b> – kodira za alkohol oksidazu <b><i>GAP</i></b> – kodira za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu <b><i>ICL1</i></b> – kodira za izocitrat liazu <b><i>PGK1</i></b> – 3-fosfoglicerat kinaza
<i>Hansenula polymorpha</i>	<b><i>hyg<sup>r</sup>, KanMX4</i></b> <b><i>LEU2</i></b> – sudjeluje u biosintezi leucina <b><i>URA3</i></b> – sudjeluje u biosintezi uracila <b><i>HARS1</i></b> – kodira za histidil-tRNA sintetetazu 1	<b><i>MOX</i></b> – kodira za metanol oksidazu <b><i>FMD</i></b> – kodira za format dehidrogenazu <b><i>DAS</i></b> – kodira za dihidroksiacetone sintazu <b><i>TPS</i></b> – kodira za trihaloza fosfat sintazu
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b><i>KanMX4, LEU2, URA3</i></b>	<b><i>PYK</i></b> – kodira za piruvat kinazu <b><i>TEF1</i></b> – kodira za trioza fosfat izomerazu <b><i>GAL1</i></b> – kodira za galaktokinazu <b><i>PDC1</i></b> – kodira za piruvat dekarboksilazu
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<b><i>URA3</i></b>	<b><i>G3P</i></b> – kodira za glicerol-3-fosfat dehidrogenazu <b><i>XPR2</i></b> – kodira za alkalnu proteazu <b><i>RPS7</i></b> – kodira za ribosomalni protein S7 <b><i>POX2</i></b> – kodira za acil-CoA oksidazu 2

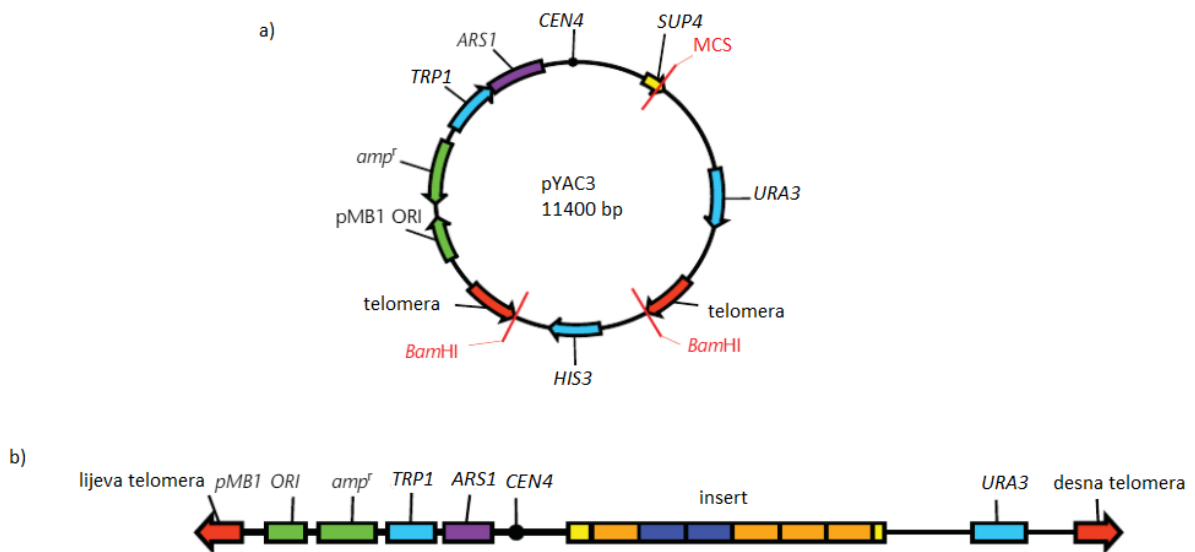
Za transformaciju kvasaca općenito se koriste replikativni i integrativni plazmidni vektori. U skupinu replikativnih vektora spadaju umjetni kvašćevi kromosomi (YAC, „yeast artificial chromosome“), kvašćevi episomalni plazmidi (YE<sub>p</sub>, „yeast episomal plasmid“), kvašćevi replikativni plazmidi (YR<sub>p</sub>, „yeast replicative plasmid“) i kvašćevi centromerni plazmidi (YC<sub>p</sub>, „yeast centromeric plasmid“) koji sadrže ishodište replikacije i mogu se samostalno replicirati u stanicama kvasca, a kvašćev integrativni plazmid (Y<sub>ip</sub>, „yeast integrative plasmid“) ne sadrži

ishodište replikacije i ne može se samostalno replicirati. Svi ovi vektori su razvijeni kao „shuttle vektori“, odnosno mogu se replicirati i u stanicama kvasca i u bakteriji *Escherichia coli* (sadrže *ori*). Osim ishodišta replikacije za oba domaćina (iznimka je YIp koji ne sadrži ishodište replikacije kvasca), ovi shuttle vektori sadrže i genetičke markere također za kvasac i za *E. coli*. YIp vektori sadrže *ori* iz *E. coli* potrebno za replikaciju plazmida, a u kvaščeve kromosome se ugrađuju homolognom rekombinacijom. Ovi vektori su vrlo stabilni, ali se nalaze u malom broju kopija. Replikativni vektor YEp sadrži ishodište replikacije iz 2- $\mu$ m plazmida iz *Saccharomyces cerevisiae* ili prirodnih plazmida ne-*Saccharomyces* vrsta. Većina ekspresijskih sustava kvasaca se temelji na plazmidima koji potječu od YEp vektora. YEp vektori se u stanicama nalaze u 30 ili više kopija, ali su podložni nepravilnom nasljeđivanju, odnosno pojavljuju se stanice bez plazmida pa se za takve sojeve kaže da su genetički nestabilni. YRp vektori sadrže ishodište replikacije *ARS* („autonomous replicon sequence“) iz kromosoma kvasaca. YCp vektori, osim ishodišta replikacije sadrže i centromeru (*CEM*) iz kvasca, koja povećava stabilnost vektora, ali smanjuje broj njegovih kopija na gotovo jedan po stanici *S. cerevisiae*. Vektori koji zahtijevaju integraciju u kvaščeve genom transformiraju s manjom efikasnošću u odnosu na episomalne vektore (Gietz i Woods, 2001). Uz to, episomalni vektori omogućuju korištenje jednostavnijih transformacijskih protokola (Baghban i sur., 2019).

Posebni značaj u konstrukciji kvasaca metodama genetičkog inženjerstva imaju umjetni kvaščeve kromosomi, zato što se u njih može ugraditi (insertirati) dosta dugački fragment strane DNA (do oko 3 Mb), nalaze se u jednoj kopiji po stanici, a stabilno se nasljeđuju tijekom mitoze. Tipični umjetni kvaščeve kromosom (pYAC3, slika 2) sadrži ishodište replikacije (*ARS*), centromeru (*CEM*) i telomere (*TEL*) funkcionalne u kvascu. Ovi cis-djelujući genetički elementi neophodni su za stabilnost umjetnog kvaščeve kromosoma, odnosno omogućavaju njegovu replikaciju i pravilnu segregaciju. Osim toga, umjetni kvaščeve kromosom sadrži ishodište replikacije *ori* i gen za selekciju transformanata (najčešće rezistencija na antibiotik, *ampR*), koji su funkcionalni u bakteriji *E. coli*, te se u njoj može replicirati, odnosno umnažati u kružnom obliku. U kvascu se YAC može umnažati u kružnom i linearnom obliku. Struktura lineariziranog YAC-a nalikuje telocentričnom kromosomu, pri čemu kraća ruka (približno 5 kb) sadrži telomeru (*TEL*), centromeru (*CEM*), ishodišta replikacije *ARS* i *ori* te selektivne markere za kvasac (*TRP1*) i *E. coli* (*ampR*). Dulja se ruka kromosoma primarno sastoji od dugačkog fragmenta strane DNA ugrađene u MCS unutar gena *SUP4*, a sadrži i još jedan selektivni biljeg za kvasac (*URA3*) i telomeru (*TEL*) (Wang i sur., 2001; Tosato i sur., 2012; Baghban i sur., 2019).

U svrhu korištenja umjetnog kvaščeve kromosoma pYAC3 (slika 2) kao vektora, insert se ugrađuje u MCS unutar gena *SUP4*. Osim toga restrikcijom endonukleazom *BamHI* uklanja

se gen *HIS3* te nastaje linearni kromosom koji na krajevima ima telomere. Kao domaćin za ovaj YAC koristi se kvasac koji zbog mutacije koja inaktivira gen *ADE2* ima crveni fenotip, a gen *SUP4* je supresor te mutacije. Stoga je ovaj kvasac uobičajene bijele boje ako sadrži YAC bez inserta, ali je crvene boje ako sadrži insert koji je inaktivirao gen *SUP4* pa je jednostavno odabrati kolonije kvasca koje sadrže YAC sa insertom (Wang i sur., 2001; Tosato i sur., 2012; Baghban i sur., 2019). Budući da se u umjetne kvaščeve kromosome može ugraditi fragment duljine do oko 3 Mb, oni mogu sadržavati primjerice jedan ili više heterolognih biosintetskih puteva, a često se koriste i kao vektori pri izradi genomskih banki (Tosato i sur., 2012).



Slika 2. Mapa umjetnog kvaščevo kromosoma pYAC3 (Tosato i sur., 2012) u kružnom obliku bez inserta (a) i u linearnom obliku sa insertom (b). Prikazane su relevantne sekvencije i restrikcijska mjesta. Ostala objašnjenja nalaze se u tekstu.

### 2.3. Metode genetičke transformacije kvasaca

U svrhu primjene u biotehnološkim procesima, prirodne i laboratorijske kvasce potrebno je genetički modificirati odnosno primijeniti metaboličko inženjerstvo, primjerice u svrhu ekspresije heterolognog proteina, biosintetskog puta ili povećanja prinosa. U tu svrhu je potrebno odgovarajući gen ili gene eksprimirati pomoću ekspresijskih plazmida ili fragmenata DNA (Löbs i sur., 2017) ili provesti ciljanu modifikaciju jednog ili više kvašćevih gena u genomu. U oba slučaja, u stanicu kvasca neophodno je unijeti stranu DNA s ciljem promjene genotipa i fenotipa stanice, a ovaj postupak naziva se genetička transformacija (Gietz i Woods, 2001).

Prvu genetičku transformaciju je opisao Griffith 1928., transformiravši nevirulentnu bakteriju *Streptococcus pneumoniae* u virulentni soj, tako da je nevirulentni soj pomiješao s lizatom virulentnog soja, a prvu transformaciju kvasca je objavio Oppenoorth 1960. Prvi protokoli za transformaciju kvasca uključivali su enzimsko uklanjanje stanične stijenke glusulazom, litikazom i zimolazom ili kemijski tretman polietilenglikolom (PEG), litijevim ionima ili tiolnim spojevima koji čine staničnu stijenku propusnom za makromolekule. Kasnije su razvijene i različite fizikalne metode genetičke transformacije kvasca poput elektroporacije i takozvane biolističke transformacije, a kao biološka metoda transformacije, osim enzimskog tretiranja staničnih stijenki, razvijena je i transformacija pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (Rivera i sur., 2014). U nastavku je opisano šest metoda za transformaciju kvasca i to metoda protoplastiranjem, odnosno metoda sferoplasta, metoda pomoću litijevog acetata, elektroporacija, transformacija pomoću staklenih kuglica, biolistička metoda i transformacija pomoću bakterije *A. tumefaciens*. Sve ove metode prvenstveno su razvijene na kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, a kasnije su se korištene i modificirane i za transformaciju drugih kvasaca.

#### 2.3.1. Metoda protoplastiranja

Protoplasti odnosno sferoplasti su stanice čija je stanična stijenka gotovo potpuno uklonjena (Kallifidas i Brady, 2012). Transformacija sferoplasta se temelji na djelomičnom uklanjanju staničnih stijenki enzimskom razgradnjom (zimoliazom) te prihvatanju DNA endocitozom. Za osmotsku stabilizaciju *S. cerevisiae*, a i mnogih drugih kvasaca, koristi se 1 M sorbitol (slika 3) (Miklenić i sur., 2012; Okada i sur., 2016).

Prvo uspješno uklanjanje stanične stijenke kvasca uz pomoć enzima zimoliazze iz puža objavljeno je 1957. godine (Eddy i Williamson, 1957), a prvi uspješni protokol za transformaciju razvili su Hinnen i sur. (1978). Stanična stijenka kvasca je enzimski uklonjena, a dobiveni



sferoplasti su čuvani u 1 M sorbitolu, zatim tretirani s PEG-om te je dodana plazmidna DNA. Efikasnost transformacije bila je u rasponu od 30 do 50 transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA. Budući da plazmid kojim su stanice bile transformirane nije sadržavao ishodište replikacije u kvascu, bila je potrebna integracija kako bi transformanti bili stabilni. Godine 1984. Harashima i sur. su uočili da su gotovo svi transformanti dobiveni fuzioniranjem protoplasta diploidi ili poliploidi, dok su Burgers i Percival (1987) pokazali da se fuzioniranje stanica može izbjeći pažljivom kontrolom uvjeta transformacije te su zabilježili najveću efikasnost transformacije koja je postignuta ovom metodom, a iznosila je od  $3 \times 10^6$  do  $4 \times 10^7$  transformanata/ $\mu\text{g}$  DNA. Pretpostavlja se da je ovako velika efikasnost rezultat dodatka „carrier“ DNA, odnosno velike količine netransformirajuće DNA (iz telećeg timusa ili *E. coli*), koja vjerojatno štiti plazmidnu DNA od nukleaza, međutim njena uloga još nije potpuno poznata (Kawai i sur., 2010). Johnston i sur. (1981) su pokazali da inkubacija sferoplasta s PEG-om i DNA pri 4 °C povećava efikasnost transformacije za neke sojeve oko 5 puta, a Broach i sur. (1978) su također uočili povećanu efikasnost uslijed hladnog šoka. S druge strane, LiAc i toplinski šok koji imaju veliku ulogu u transformaciji intaktnih stanica kvasca nemaju nikakav utjecaj na transformaciju sferoplasta, kao ni jednolančana (ss, „single stranded“) „carrier“ DNA (DNA nosač) koja je vrlo važna kod transformacije LiAc metodom, dok kod sferoplasta važnu ulogu preuzima dvolančana „carrier“ DNA (Kawai i sur., 2010). U Tablici 2. je prikazan utjecaj litijevog acetata, toplinskog šoka i polietilenglikola na intaktne stanice kvasca i sferoplaste.

U nastavku je detaljnije opisan protokol transformacije sferoplasta iz 1993. (Spencer i sur., 1993). Stanice su uzgajane na YAPD podlozi do gustoće  $3 \times 10^7$  stanica/mL, nakon centrifugiranja isprane u 1 M sorbitolu i resuspendirane u SPEM (1 M sorbitol, 10 mM natrijev fosfat, pH 7,5, 10 mM EDTA plus  $\beta$ -merkaptotanol). Stanice su tretirane zimoliazom nakon čega su isprane i resuspendirane u STC (1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Sferoplasti su transformirani laganim miješanjem s 5  $\mu\text{g}$  „carrier“ DNA i 5  $\mu\text{g}$  plazmidne DNA te inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi, zatim je dodan PEG (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 % (w/v) PEG 8000) i smjesa je inkubirana još 10 min. Nakon centrifugiranja sferoplasti su resuspendirani u SOS (1 M sorbitol, 6,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,25 % ekstrakt kvasca, 0,5 % baktepepton). Suspenzija je pomiješana s TOP agarom (selektivni medij 1 M sorbitol, 2,5 % agar) zatim nanosena na selektivni medij koji sadrži 0,9 M sorbitol i 3 % glukoze. Transformanti su oporavljeni nakon 3 - 4 dana na 30 °C. Shematski prikaz metode sferoplasta je prikazan na slici 6.c. (Nora i sur., 2019).

Iako se metoda sferoplasta ekstenzivno koristi, nedostatak ove metode je to što se dobiveni transformanti moraju resuspendirati i nacijepiti na agar za regeneraciju. Razvojem drugih

metoda transformacije, metoda sferoplasta se danas uglavnom koristi za transformaciju umjetnim kvašćevim kromosomom te transformaciju infektivnim česticama, prionima (Gietz i Woods, 2001; Kawai i sur., 2010).

### 2.3.2. Metoda pomoću litijevog acetata

Većina laboratorija koji rade s kvascima koriste metodu pomoću litijevog acetata (LiAc), zbog njene vrlo visoke efikasnosti, brzine i jednostavnosti (Gietz i Woods, 2001). Intaktne stanice kvasca su prvi put uspješno transformirane 1981. godine (Kimura i sur., 1981), a 1983. je uvedena inovacija u transformaciju intaktnih kvasaca te je prvi put opisana transformacija stanica kvasca korištenjem alkalijskih kationa (Ito i sur., 1983). Pokazalo se da specifični monovalentni alkalijski kationi poput  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  i  $\text{Li}^+$ , a posebno  $\text{Li}^+$ , korišteni u kombinaciji s PEG-om stimuliraju unos plazmidne DNA u stanice kvasca, za razliku od divalentnih kationa poput  $\text{Ca}^{2+}$  koji su vrlo važni u transformaciji *E. coli*, međutim nemaju utjecaj na transformaciju kvasaca (Gietz i Woods, 2001; Kawai i sur., 2010). Stanice su tretirane 100 mM otopinom kationa te je dodana plazmidna DNA i PEG. Nakon inkubacije 1 h na 30 °C stanice su tretirane toplinskim šokom 5 min na 42 °C. Zaključeno je da su PEG i plazmidna DNA nužni za transformaciju, da toplinski šok povećava efikasnost transformacije te da se najefikasnije transformiraju stanice u srednjoj logaritamskoj fazi rasta (Kawai i sur., 2010). Najbolji rezultati su dobiveni s litijevim acetatom koji je pokazao 1,7 puta jači efekt nego litijev klorid (LiCl) (Kawai i sur., 2010), a efikasnost transformacije je iznosila 450 transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA, što je niže od vrijednosti dobivenih metodom sferoplasta, međutim ova metoda se pokazala bržom, jednostavnijom i lakšom, a najveća prednost je što se tretirane stanice nisu morale nacijepiti na agar za regeneraciju te je bilo omogućeno repliciranje na drugoj podlozi. Godine 1983. Klebe i sur. su pokazali da sam PEG može inducirati prihvaćanje strane DNA kod kvasaca, a dvije godine kasnije Yamakawa i sur. (1985) su objavili da je efikasnost transformacije pri korištenju PEG-a u odsutnosti LiAc otprilike tri puta manja nego kad se koriste u kombinaciji. Do 1987. godine standardiziran je protokol za ovu metodu te je uključivao PEG, LiAc i toplinski šok (Gietz i Woods, 2001). U Tablici 2. je prikazan utjecaj litij acetata, toplinskog šoka i polietilenglikola na stanice kvasca te sferoplaste. Najznačajniji napredak u ovoj metodi postignut je uvođenjem jednolančane DNA kao nosača („carrier“) (za razliku od metode sferoplasta u kojoj se može koristiti samo dvolančana „carrier“ DNA), čime je efikasnost ove metode povećana na  $5 \times 10^6$  do  $1 \times 10^7$  transformanata/ $\mu\text{g}$  DNA (Gietz i Schiestl, 2008; Kawai i sur., 2010). Izbacivanje Tris-EDTA (TE) iz pufera za transformaciju te optimizacija broja stanica i koncentracije „carrier“ i plazmidne DNA doprinijeli su efikasnosti i

reproducibilnosti ove tehnike te se korištenjem tog protokola može očekivati  $5 \times 10^6$  transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA za većinu sojeva (Gietz i Woods, 2001). Različite verzije i izmjene originalnog protokola pomoću litijevog acetata (uz korištenje jednolančanog DNA nosača i polietilenglikola) su objavljivane tijekom godina, poput dodatka 2-merkaptoetanol, ditionitrola (DTT), DMSO te etanola. Na efikasnost ovog protokola, 2-merkaptoetanol i DMSO nisu imali učinka, ali je dodatak 100 mM DTT-a pokazao pozitivan utjecaj (Gietz i Woods, 2001; Kawai 2010). Intaktne stanice kvasaca se metodom litij acetata slabo mogu transformirati jednolančanom transformirajućom DNA, dok se metodom sferoplasta kvasci mogu efikasno transformirati jednolančanom DNA (Kawai i sur., 2010).

Visoko-efikasni protokol pomoću litijevog acetata uz korištenje jednolančanog DNA nosača i polietilen glikola iz 2007. godine (Gietz i Schiestl, 2007) se provodi tako se kvasci inkubiraju u tekućem YPAD mediju preko noći na tresilici pri 200 rpm na 30 °C, zatim 4 h pri istim uvjetima do titra od  $10^7$  stanica/mL. Nakon centrifugiranja izdvojeni su peleti stanica, a transformacijska otopina se sastojala od 1 M LiAc, 50 % w/v PEG MW 3350 te otopine „carrier“ ssDNA koncentracije 2 mg/mL pripremljene otapanjem DNA iz lososove sperme u TE puferu (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0). Protokol za ovu metodu (Gietz i Schiestl, 2007) daje do  $1 \times 10^6$  transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA ako je vektor samostalno replicirajući plazmid. U slučaju korištenja integrativnih plazmida i fragmenata DNA koji zahtijevaju integraciju u genom bit će manji broj transformanata. Procedura traje do 1,5 sat, ovisno o trajanju toplinskog šoka. Za transformaciju manjeg broja stanica moguće je korištenje bržeg i efikasnijeg protokola. Također, razvijeni su i „scale up“ protokoli za dobivanje većeg broja transformanata (Gietz i Schiestl, 2007). Najveće prednosti ove metode su vrlo visoka efikasnost, niska cijena te to što se stanice nakon transformacije ne moraju nacijepiti na agar za regeneraciju. Shematski prikaz metode pomoću litij acetata je prikazan na slici 6.b. (Nora i sur., 2019).

Tablica 2. Utjecaj litijevog acetata (LiAc), toplinskog šoka i polietilenglikola (PEG) na transformaciju intaktnih stanica i sferoplasta (Kawai i sur., 2010)

	<b>Intaktne stanice</b>	<b>Sferoplasti</b>
<b>LiAc</b>	Povećava efikasnost i učestalost transformacije (iako nije neophodan)	Nema utjecaj na učestalost transformacije
	Povećava permeabilnost intaktnih stanica	
<b>Toplinski šok</b>	Povećava efikasnost transformacije (iako nije neophodan)	Nije neophodan, ali povećava učestalost transformacije
	Povećava permeabilnost intaktnih stanica	
<b>PEG</b>	Neophodan za efikasnost transformacije	Nije neophodan, ali povećava učestalost transformacije
	Preinkubacija povećava efikasnost i učestalost transformacije	
	Povećava permeabilnost intaktnih stanica	
	Neophodan za vezanje DNA za staničnu stijenu stanica	Neophodan za vezanje DNA za stanice

### 2.3.3. Elektroporacija

Elektroporacija je najčešće korištena fizikalna metoda za transformaciju stanica funga, zbog svoje jednostavnosti, brzine i efikasnosti (Rivera i sur., 2014). Ova metoda se temelji na biofizikalnom fenomenu povećanja permeabilnosti stanične membrane uslijed primjene pulsirajućeg električnog polja (Golberg i Rubinsky, 2013). Djelovanjem izmjeničnog ili pulsirajućeg električnog polja pojačava se stvaranje pora izmjenjivanjem polarnosti membrane i time omogućuje ulazak makromolekula u stanice (Rivera i sur., 2014).

Elektroporacija je prvi put primjenjena na kvasac u obliku sferoplasta 1985. (Karube i sur., 1985), a iste godine i na intaktne stanice kvasca (Hashimoto i sur., 1985). Četiri godine kasnije su objavljena dva jednostavnija protokola za transformaciju intaktnih kvašćevih stanica (Delorme, 1989; Simon i McEntee, 1989). U prvom protokolu (Delorme, 1989) su stanice iz rane logaritamske faze rasta transformirane koristeći manje od 0,1 µg plazmidne DNA uz

primjenu jakosti električnog polja od 2,25 kV/cm i kapacitancije od 25  $\mu$ F, u odsutnosti „carrier“ DNA jer kod ove metode nema nikakav utjecaj (Gietz i Woods, 2001; Kawai i sur., 2010). U drugom protokolu su Simon i McEntee (1989) resuspendirali stanice iz kasne logaritamske faze u 0,1 mM Na-fosfatnom puferu, koji sadrži 10 % glicerola i proveli elektroporaciju koristeći 2,7 kV/cm i 10  $\mu$ F. Obje metode rezultirale su efikasnošću transformacije od  $10^3$  do  $4,5 \times 10^3$  transformanata/ $\mu$ g plazmidne DNA (Gietz i Woods, 2001). Becker i Guarente (1991) su dotadašnju relativno nisku efikasnost transformacije pripisivali neadekvatnoj potpori električki destabiliziranih stanica. Osmotičkom stabilizacijom stanica 1 M sorbitolom su rutinski dobivali efikasnost transformacije od  $2 \times 10^5$  do  $5 \times 10^5$  transformanata/ $\mu$ g plazmidne DNA te je od tada sorbitol uključen u standardni protokol za transformaciju *Saccharomyces cerevisiae* elektroporacijom. Kasnije su razvijeni različiti protokoli za elektroporaciju, a jedni od najefikasnijih su bile hibridne tehnike koje su uključivale metodu pomoću litijevog acetata i elektroporaciju (Kawai i sur., 2010). Manivasakam i Schiestl su 1993. godine primjenom takve metode dosegli efikasnost transformacije  $5,2 \times 10^6$  transformanata/ $\mu$ g DNA. Stanice su inkubirane s 20  $\mu$ g ssDNA, PEG-om i plazmidnom DNA na 42 °C 15 min, zatim su podvrgnute električnom impulsu uz 1,5 kV, 15  $\mu$ F i 200  $\Omega$  u kiveti stijenke debljine 0,2 cm. Nadalje, Thompson i sur. su 1998. godine stanice prethodno inkubirali u prisutstvu 100 mM LiAc i 10 mM DTT te zaključili da u kombinaciji povećavaju efikasnost transformacije, koja je iznosila od  $0,5 \times 10^6$  do  $1,4 \times 10^6$  transformanata/ $\mu$ g DNA. Ovaj protokol je povećao je prinos transformanata od 15 do 300 puta za sojeve na koje klasična elektroporacija slabo djeluje (Gietz i Woods, 2001; Kawai i sur., 2010). Suga i Hatakeyama (2003) su zabilježili da prethodno smrzavanje intaknih stanica *S. cerevisiae* i *Shizosaccharomyces pombe* na - 80 °C u 0,6 – 2,5 M sorbitolu s 5 – 10 M kalcijevim kloridom rezultira visokom efikasnošću transformacije, davajuću više od  $10^6$  transformanata/ $\mu$ g plazmidne DNA (Kawai i sur., 2010).

Protokol za elektroporaciju stanica kvasca iz 1990. (Meilhoc i sur., 1990) proveden je tako da su stanice uzgajane do  $1 \times 10^7$  stanica/mL zatim inkubirane 10 min u 25 mM DTT. Nakon toga su isprane i inkubirane u EB (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 270 mM saharoza, 1 mM MgCl<sub>2</sub>). Nakon dodatka DNA uzorci su pulsirani s jakosti polja 1,74 kV/cm 15 ms. Dodana je na 30 °C ugrišana YPD podloga te je suspenzija inkubirana 1 h na 30 °C. Suspenzija je centrifugirana i stanice su resuspendirane u SD mediju, zatim su nacijejpljene na prikladan medij i inkubirane. Shematski prikaz transformacije elektroporacijom je prikazan na slici 6.a. (Nora i sur., 2019).

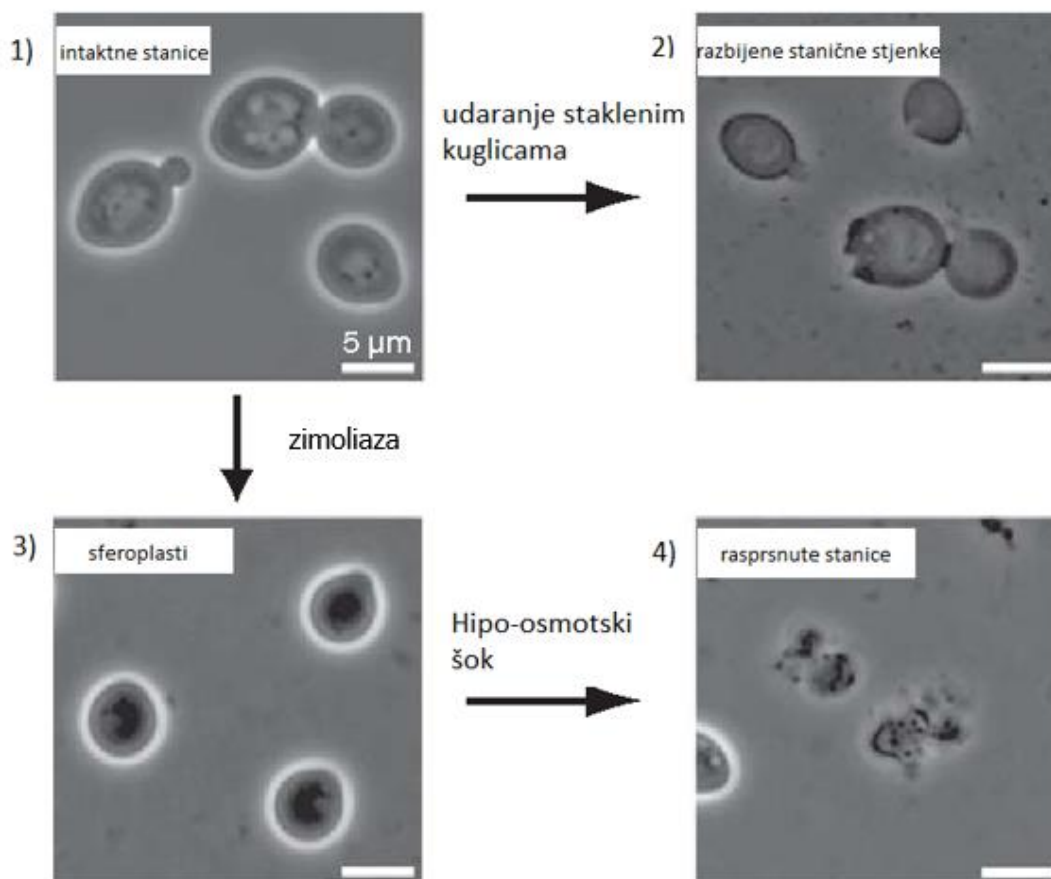
Protokoli za elektroporaciju zahtijevaju električni puls ili u kiveti za elektroporaciju ili između elektroda u Petrijevoj zdjelici (Gietz i Woods, 2001). Standardni protokoli za transformaciju funga koriste električni puls u trajanju od nekoliko mikro- do nekoliko milisekundi, napona

između 1 i 2 kV. U nekim slučajevima je povećanjem jakosti polja uočeno povećanje efikasnosti transformacije te zbog toga neki komercijalni uređaji za transformaciju funga koriste veće napone. Efikasnosti transformacije variraju između  $10^3$  i  $10^6$  transformanata/ $\mu\text{g}$  DNA (Rivera i sur., 2014). Stanice u logaritamskoj fazi se ovom metodom transformiraju 10 puta efikasnije nego stanice u stacionarnoj fazi (Meilhoc i sur., 1990). Protokol transformacije stanica elektroporacijom traje kraće od metode pomoću litijevog acetata te metode sferoplasta. Iako su inicijalni troškovi elektroporacije veći (Gietz i Woods, 2001), sama procedura je vrlo jednostavna, brza i jeftina (Rivera i sur., 2014).

#### 2.3.4. Transformacija pomoću staklenih kuglica

Osim elektroporacije koja je opisana u poglavlju 4.3., u fizikalne metode transformacije ubraja se i transformacija pomoću staklenih kuglica, odnosno brzo miješanje sa staklenim kuglicama u prisutnosti „carrier” i plazmidne DNA (Gurpilhares, 2006). Ova jeftina i brza metoda transformacije stanica kvasca je prvi put objavljena 1988. godine (Constanzo i Fox, 1988). Transformirane su stanice iz kasne logaritamske faze u mediju koji sadržava 1 M sorbitol, korištenjem sterilnih staklenih kuglica promjera 0,45 - 0,52 mm uz vorteksiranje maksimalnom brzinom od 100 m/s, 15 do 45 sekundi. Stanice se nacjepljuju na selektivnu podlogu koja sadrži 1 M sorbitol (Constanzo i Fox, 1988; Gurpilhares i sur., 2006). Postignuta je efikasnost transformacije od 300 transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA.

Constanzo i Fox (1988) su pokazali da bez prisutnosti sorbitola u mediju nema preživjelih transformanata te su pretpostavili kako su stanice nakon ovog postupka jako oštećene i ne mogu preživjeti bez prisutnosti sorbitola koji služi kao osmotski stabilizator (slika 3) Transformacija pomoću staklenih kuglica je brza, jednostavna i jeftina metoda jer ne zahtijeva korištenje sofisticiranih uređaja te ne zahtijeva nikakve kemijske tretmane i enzime (Rivera i sur., 2014). Ova metoda konkurrira transformaciji elektroporacijom za najbržu metodu (Gietz i Woods, 2001), međutim ima vrlo nisku efikasnost transformacije zbog učestalog oštećenja DNA te smanjenja vijabilnosti stanica (Rivera i sur., 2014).



Slika 3. Mikroskopski prikaz djelovanja metode sferoplasta i transformacije staklenim kuglicama na stanične stijenke i vijabilnost kvašćevih stanica: 1) intaktne stanice; 2) nakon miješanja sa staklenim kuglicama; 3) nakon tretiranja intaktnih stanica zimoliazom; 4) nakon tretiranja zimoliazom bez osmotske stabilizacije (Okada i sur, 2016)

### 2.3.5. Biolistička transformacija

Biolistička transformacija, također poznata kao tehnika bombardiranja česticama ili tehnika genskog pištolja, je popularna metoda genetičke transformacije koja se koristi za mnoge vrste, subcelularne organele, bakterije, gljivice te čak i životinjske stanice. Zahtijeva kratku obradu, uključuje prihvatljive troškove proizvodnje transgeničnih životinja te omogućuje jednostavan unos više gena ili kimerne DNA (Rivera i sur. 2014). Biolistička transformacija je zapravo metoda direktnog unosa fragmenata DNA u stanice pomoću čestica teškog metala (zlata ili volframa) obloženih s DNA, korištenjem genskog pištolja (slika 4) (Carter i Shieh, 2015.). Metalne čestice stvaraju rupe u staničnoj stijenci i ulaze u stanice, ostavljajući DNA unutar stanica (Fang i sur., 2012). Shematski prikaz bombardiranja mikroprojektilima korištenjem genskog pištolja prikazan je na slici 5. Ova metoda je prvobitno razvijena za transformaciju

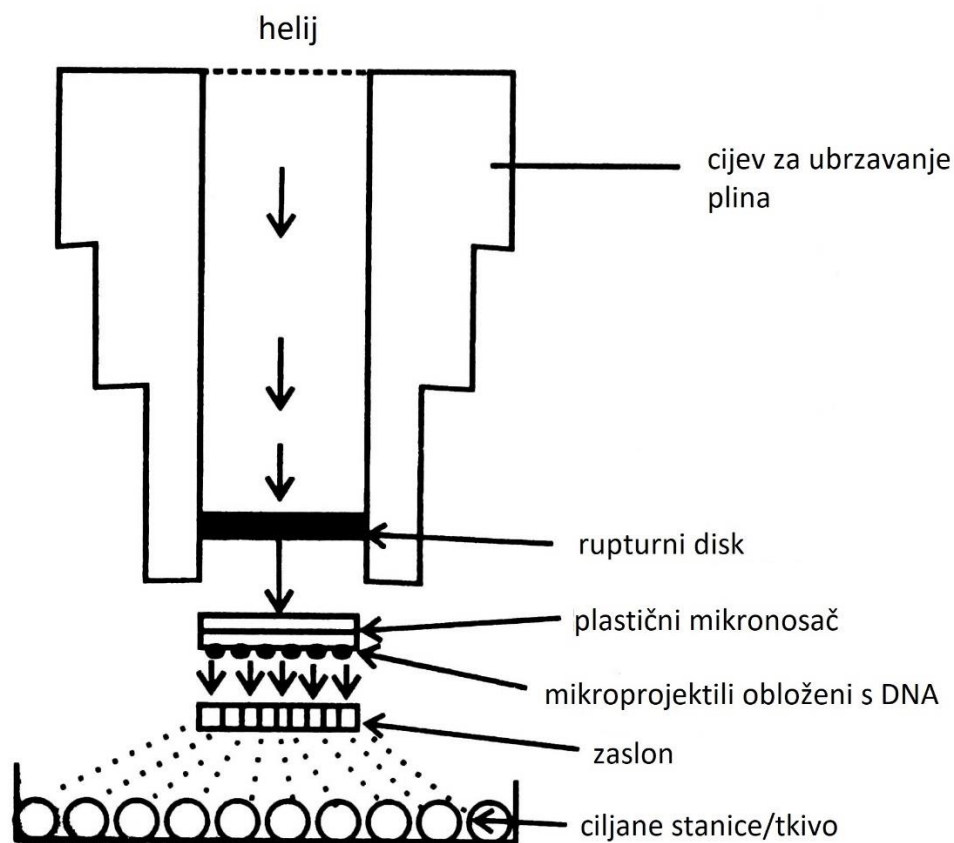
biljnih stanica, a na stanicama kvasca je prvi put uspješno primijenjena 1988. godine (Johnston i sur., 1988). Kvaščeve stanice su nacijeppljene na selektivni medij, zatim bombardirane 0,5  $\mu\text{m}$  mikroprojektilima pomoću komprimiranog helija, nakon čega su inkubirane na 30 °C kako bi transformanti porasli (Gietzi i Woods, 2001). Za postizanje visoke efikasnosti potrebna je osmotska stabilizacija 0,75 M sorbitolom i 0,75 M manitolom, slično kao kod metode sferoplasta (Kawai i sur., 2010). Za transformaciju funga ovom metodom, obično se koristi helij pod tlakom od 500 do 2000 psi, a mikroprojektili se ubrzavaju do 400 ili više m/s u djelomičnom vakuumu, prosječno oko 30 mm Hg (Rivera i sur., 2014). Jedno bombardiranje uobičajeno dovodi do velike prekrivenosti podloge transformantima, što je najčešće jednako efikasnosti transformacije od  $10^4$  do  $10^5$  transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA (Gietz i Woods, 2001; Rivera i sur., 2014).

Kod biolističke transformacije, efikasnost transformacije ovisi o nekoliko parametara kao što su temperatura, količina stanica, njihova sposobnost regeneracije, broj mikroprojektila, količina DNA koja prekriva čestice te kinetička energija čestica (Rivera i sur., 2014). Nadalje, ovom metodom se najbolje transformiraju stanice koje su u stacionarnoj fazi, za razliku od metode sferoplasta i metode pomoću litijevog acetata pomoću kojih se najefikasnije transformiraju stanice u logaritamskoj fazi rasta (Armaleo, Ye i sur., 1989). Biolistička transformacija je korisna tehnika genetičke transformacije jer ne zahtijeva enzimsko tretiranje staničnih stijenki zbog čega ne dolazi do smanjenja vijabilnost stanica, a transformanti se mogu jednostavno propagirati nakon transformacije (Rivera i sur., 2014). Također, jedina je tehnika kojom se mogu transformirati mitohondriji (Johnston i sur., 1988). Budući da ova metoda ne ovisi o karakteristikama stanica (kompoziciji stanične stijenke i membrane), sojevi i vrste kvasca koji su otporni na konvencionalne tehnike transformacije bi korištenjem ove tehnike trebali davati transformante (Gietz i Woods, 2001).



Slika 4. Genski pištolj ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com))



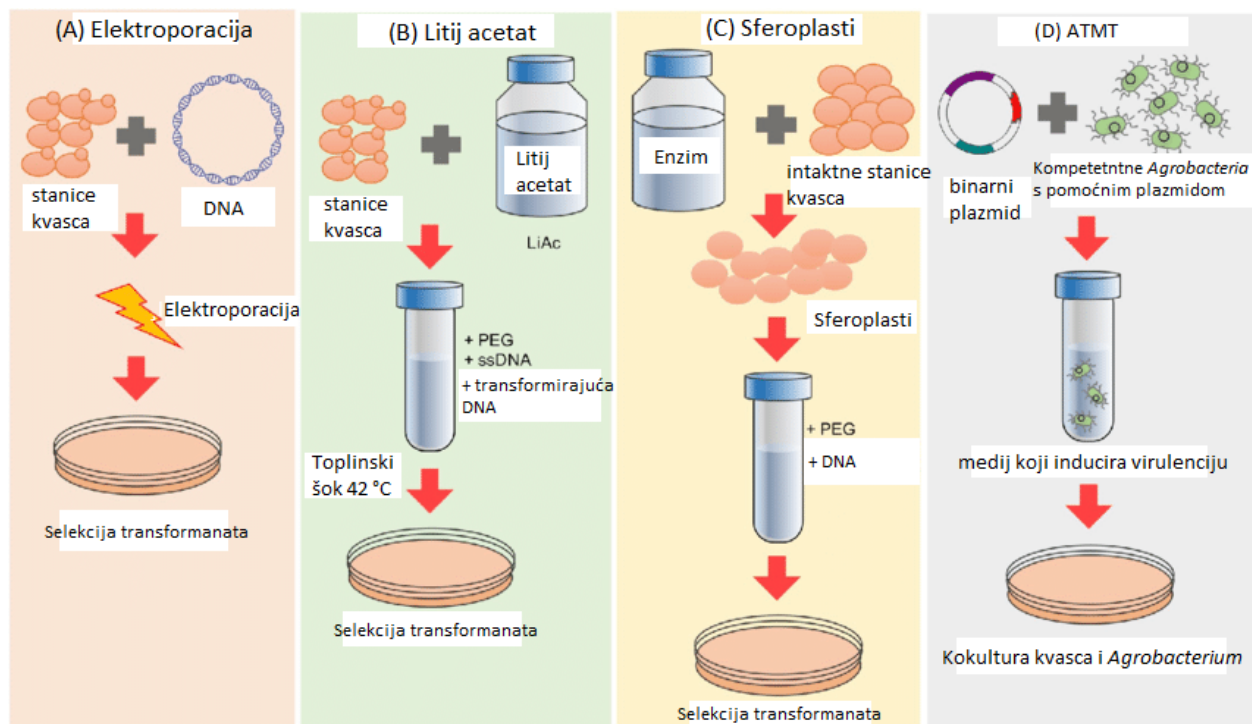


Slika 5. Shematski prikaz bombardiranja mikroprojektilima pomoću genskog pištolja ([www.biocyclopedia.com](http://www.biocyclopedia.com))

### 2.3.6. Transformacija pomoću bakterija iz roda *Agrobacterium*

Metoda transformacije posredovanjem bakterije *Agrobacterium tumefaciens* je primarno korištena za transformaciju biljnih stanica, a temelji se na sposobnosti *A. tumefaciens* da prenese dio svoje DNA, koja se naziva T-DNA što dolazi od "transfer" DNA, u eukariotsku stanicu (Zhu i sur., 2000; Zupan i sur., 2000). *A. tumefaciens* je Gram-negativna patogena bakterija koja uzrokuje tumor vrata korijena kod biljaka (Stafford, 2000), unošenjem T-DNA u domaćina koja se nalazi na „tumor-inducirajućem plazmidu“ (Ti plazmidu) veličine 200 kb. Ekspresija *vir* gena, odgovornih za virulentnost, koji se nalaze na Ti plazmidu omogućuje prijenos T-DNA u stanicu domaćina. Nakon integracije u genom domaćina dolazi do ekspresije gena koji se nalaze na T-DNA, što rezultira nekontroliranim rastom biljnih stanica (Zhu i sur., 2000). Za transformaciju biljaka i gljiva koristi se binarni vektorski sustav u kojem su T-DNA i *vir* regija smještene na različitim plazmidima. „Razoružani“ Ti-plazmid, koji ne sadrži tumor inducirajuće gene, između T-DNA graničnih LB i RB regija umjesto T-DNA sadrži gen koji se

prenosi u biljnu stanicu ili stanicu funga te selektivni biljeg, a pomoćni plazmid sadrži *vir* gene. Kao i kod transformacije biljaka, za transformaciju gljiva se kao selektivni marker koriste geni za rezistenciju na antibiotike i herbicide koji su pod kontrolom promotora aktivnih u organizmu domaćinu (Hooykaas i sur., 2018). Bundock i sur. (1995) su prvi objavili metodu transformacije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pomoću *A. tumefaciens* transformirajući kvasac fenotipa Ura- u Ura+ koristeći binarni vektor. Ova metoda transformacije se provodi tako da se kvasac i *A. tumefaciens* kokultiviraju na čvrstom supstratu u prisutnosti fenolnog induktora poput acetosirigona, koji se inače ispušta na mjestu ozljede biljnog tkiva i inducira *vir* regulon. Važno je da je medij nižeg pH (5 - 6), što je potrebno za indukciju *vir* gena, a da se temperatura tijekom kokultivacije održava na razini sobne (20 - 25 °C), jer je temperatura oko 22 °C potrebna za transfer T-DNA (Kiyokawa i sur., 2012; Hooykaas, 2018). Shematski prikaz metode transformacije pomoću *A. tumefaciens* je prikazan na slici 6.d. (Nora i sur., 2019). Za razliku od biljaka kod kojih se T-DNA ugrađuje u genom ilegitalnom rekombinacijom, kod kvasca se T-DNA integrira homolognom rekombinacijom (Bundock i sur., 1995). *Agrobacterium* sojevi koji umjesto Ti plazmida sadrže Ri plazmid uzrokuju tzv. dlakavost korijena, odnosno rak korijena (Kiyokawa i sur., 2012). Kiyokawa i sur. (2012) su pokazali da je efikasnost transformacije smanjena ako se stanice kvasca transformiraju pomoću *Agrobacterium* sojeva koji sadrže Ri plazmid koji sadrži *GALLS* gene, umjesto Ti plazmida koji sadrži *virE* operon, što nije slučaj kod nekih biljaka kod kojih je efikasnost transformacije pomoću sojeva koji sadrže Ri plazmid veća.



Slika 6. Shematski prikaz metoda transformacije (A – elektroporacija, B – transformacija pomoću litijevog acetata, C – transformacija sferoplasta, D – transformacija posredovana *Agrobacterium tumefaciens*) (Nora i sur., 2019)

### 2.3.7. Transformacija ne-*Saccharomyces* kvasaca

Usprkos filogenetskoj udaljenosti *Shizosaccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae*, većina protokola za transformaciju *S. cerevisiae* se može koristiti i za *Sc. pombe* (Steensels i sur., 2014). Vrlo brzo nakon otkrića metode sferoplasta u transformaciji *S. cerevisiae*, ova metoda je primijenjena i za transformaciju *Sc. pombe*. Ovaj protokol su razvili Moreno i sur. (1991), a efikasnost je iznosila od  $10^4$  do  $5 \times 10^4$  transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA. Također, Broker je 1987. razvio protokol za metodu pomoću litijevog acetata, a Hood i Stachow (1990) i Prentice (1992) su razvili protokole za elektroporaciju *Sc. pombe*, a efikasnosti transformacije su iznosile između  $1 \times 10^3$  i  $2 \times 10^5$  transformanata/ $\mu\text{g}$  DNA. Za *P. pastoris* su razvijeni protokoli transformacije sferoplasta, transformacije elektroporacijom (Yang i sur, 1994) te protokol koji je kombinacija ovih dviju metoda (Gietz i Woods, 2001). Kod transformacije stanica *P. pastoris* metodom sferoplasta efikasnost transformacije iznosi oko  $10^5$  transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA, dok elektroporacijom iznosi  $4 \times 10^6$  transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA. Kod metode transformacije elektroporacijom *P. pastoris* je prethodno tretirana s 100 mM LiAc i 10 mM DTT koji povećavaju efikasnost transformacije u prosjeku 150 puta,

kao i kod *S. cerevisiae* kod kojeg se efikasnost povećava od 6 do 300 puta. Metoda pomoću litijevih kationa se također može primijeniti na *P. pastoris*, pri čemu se koristi LiCl umjesto LiAc, međutim efikasnost transformacije je izuzetno mala te iznosi oko 17 transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA (Kawai i sur., 2010). Metoda sferoplasta, metoda pomoću litijevog acetata i elektroporacija su uspješno razvijene za kvasce *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* spp. i *Yarrowia lipolytica* (Gietz i Woods, 2001). Efikasnost transformacije elektroporacijom *H. polymorpha* iznosi do  $1,7 \times 10^6$  transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA. Za visoku efikasnost nužni su prethodni tretman DTT-om te korištenje ionskog pufera za elektroporaciju sa saharozom kao osmotskim stabilizatorom. Kod transformacije *Y. lipolytica* elektroporacijom efikasnost transformacije je iznosila oko  $2 \times 10^4$  transformanata/ $\mu\text{g}$  DNA. Optimalna koncentracija LiAc je bila nešto viša u odnosu na predtretman kod *S. cerevisiae* i *P. pastoris* te je iznosila 150 mM, a optimalno vrijeme inkubacije je također bilo duže i iznosilo je 1 h, dok je optimalno vrijeme predtremana *S. cerevisiae* i *P. pastoris* 15 ili 30 min. DTT i LiAc korišteni u kombinaciji su smanjili efikasnost transformacije (Wang i sur., 2011).

#### 2.3.8. Usporedba metoda transformacije kvasaca

U Tablici 3. je prikazana usporedba metoda za transformaciju kvasaca. Od svih spomenutih metoda transformacije, najveću efikasnost transformacije ima metoda pomoću litijevog acetata, a najmanju transformacija pomoću staklenih kuglica. Međutim, za transformaciju kvasca velikim fragmentima DNA poput YAC-a najefikasnija je metoda protoplastiranja, za razliku od metode pomoću litijevog acetata i elektroporacije koje su efikasne samo pri transformaciji s manjim molekulama DNA. Biolistička transformacija je relativno efikasna, međutim teško je odrediti njenu efikasnost, ali velika prednost ove metode je to što je jedina metoda koja omogućuje transformaciju mitohondrija. Što se tiče jednostavnosti samog protokola, najjednostavnije metode transformacije koje ne zahtijevaju specijalnu opremu su metoda pomoću litijevog acetata i transformacija pomoću staklenih kuglica te su ujedno i vrlo jeftine metode. Metoda protoplastiranja je također vrlo jeftina, ali njezin protokol dugo traje. Transformacija elektroporacijom je s druge strane vrlo brza metoda, ali su troškovi elektroporacije visoki zbog potrebne opreme. Biolistička transformacija je još skuplja metoda koja zahtijeva korištenje vrlo sofisticirane opreme i uređaja te je zbog pripreme mikroprojektila protokol kompleksan. Metoda pomoću litijevog acetata i elektroporacija su metode koje se mogu lako optimizirati, dok to nije slučaj s metodom transformacije sferoplasta. Kod metode sferoplasta, metode pomoću litijevog acetata i elektroporacije efikasnost transformacije varira ovisno o soju koji se transformira. Transformacija posredovana bakterijom *Agrobacterium* se

danas često koristi za mnoge funge zbog svoje jednostavnosti i viših efikasnosti transformacije od drugih metoda. Nadalje, ova metoda puno češće dovodi do integracije samo jedne kopije za razliku od drugih metoda (Hooykas i sur., 2018). Izbor metode koju ćemo koristiti ovisi o vrsti kvasca, vektoru, o vremenu i opremi kojima raspolažemo te potrebnom broju vijabilnih transformanata. U slučaju kad kao vektor koristimo YAC najbolji je izbor metoda sferoplasta zbog najveće efikasnosti transformacije kad su u pitanju veliki DNA konstrukti. Za transformaciju mitohondrijske DNA jedini je izbor biolistička transformacija, jer je to jedina metoda koja omogućuje transformaciju organela. Međutim, metoda transformacije kvasaca koja se općenito najčešće koristi je metoda pomoću litijevog acetata, najefikasnija od svih spomenutih metoda, jednostavna, jeftina, ne zahtjeva posebnu opremu te se jednostavno optimizira. Iza nje po učestalosti korištenja slijedi elektroporacija, također zbog svoje visoke efikasnosti, jednostavnosti optimizacije te kratkog protokola (brža je od metode pomoću litijevog acetata), međutim nedostatak joj je to što zahtijeva korištenje posebne opreme. Transformacija pomoću staklenih kuglica se rjeđe koristi zbog niske efikasnosti transformacije, međutim pogodna je zbog svoje brzine, jednostavnosti i niske cijene te u slučaju nedostatka sofisticirane opreme.

Tablica 3. Prednosti i nedostaci različitih metoda transformacije (Gietz i Woods, 2001)

<b>Metoda</b>	<b>Prednosti</b>	<b>Nedostaci</b>
<b>Metoda protoplastiranja</b>	efikasna transformacija velikim fragmentima DNA poput YAC-a	teška optimizacija
	nije potrebna posebna oprema	stanice moraju biti uzgojene preko noći
	niska cijena	dug protokol
		stanice moraju biti nacjepljene na osmotski neutralan medij
		efikasnosti transformacije variraju ovisno o soju
<b>Metoda pomoću litijevog acetata</b>	najefikasnija metoda (osim za velike DNA konstrukte)	stanice se moraju uzgojiti preko noći, osim ako su dostupne zamrznute stanice
	nije potrebna posebna oprema	
	jednostavan protokol	efikasnosti transformacije variraju ovisno o soju
	jednostavna optimizacija	
	mogu se koristiti zamrznute stanice	
	niska cijena	
<b>Elektroporacija</b>	efikasna procedura (osim za velike DNA konstrukte)	znatni troškovi
	kratak protokol	stanice se moraju uzgojiti preko noći, osim ako su dostupne zamrznute stanice
	jednostavna optimizacija	
	mogu se koristiti zamrznute stanice	efikasnosti transformacije variraju ovisno o soju
<b>Transformacija pomoću staklenih kuglica</b>	jednostavan protokol	niska efikasnost transformacije
	niska cijena	stanice trebaju osmotsku stabilizaciju
<b>Biolistička transformacija</b>	relativno efikasna transformacija	visoki troškovi
	mogu se transformirati mitohondriji	teško je odrediti efikasnost
		potrebna priprema mikroprojektila

## 2.4. Primjena transgenih kvasaca

Kvasci se tradicionalno koriste u proizvodnji piva, vina, biomase s primjenom u pekarstvu i glicerola (Türker, 2014). Osim primjene u proizvodnji tradicionalnih biotehnoloških proizvoda, kvasci su danas izvanredni domaćini i za proizvodnju funkcionalnih rekombinantnih proteina s industrijskom i medicinskom primjenom (Baghban i sur., 2019). Za to je zaslužan razvoj transgenih kvasaca, odnosno kvasaca u koje je genetičkom transformacijom unesen dio DNA koji potječe iz organizma druge vrste, transgen (Nickle i Barrette-Ng, 2020). Ekspresijom transgena, odnosno heterolognom ekspresijom gena u transgenim kvascima, omogućena je industrijska proizvodnja širokog spektra proteina pomoću kvasaca. Industrijski enzimi se tako proizvode kao heterologni proteini, a najvažniji enzimi koji se koriste u prehrambenoj industriji a proizvode ih kvasci su amilaze, celulaze, glukanaze, lipaze, pektinaze, proteaze, inulinaza, lakaza, laktaza i ramnozidaza (Arevalo-Villena i sur., 2017) Osim konvencionalnog *Saccharomyces cerevisiae* koji je najzastupljeniji domaćin u proizvodnji heterolognih proteina (inzulin, cjepiva za hepatitis i HPV (Steensels i sur., 2014)), kao povoljni domaćini su se pojavili i drugi kvasci poput *Shizosaccharomyces pombe*, *Komagataella* sp., *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* i *Yarrowia lipolytica* (Arevalo-Villena i sur., 2017; Gomes i sur., 2018). *Sc. pombe* je poznat kao domaćin za proizvodnju mnogih heterolognih proteina, kao što je na primjer fitaza iz bakterije *Escherichia coli* koja se koristi u životinjskoj ishrani, a u *Sc. pombe* je ekprimirana u sekretornom glikoziliranom obliku. Još dva primjera industrijskog korištenja *Sc. pombe* su proizvodnja vanilina, što je omogućeno uvođenjem tri heterologna gena (iz *Podospora pauciseta*, *Nocardia* sp. i humanog gena) te proizvodnja ricinoleinske kiseline, uvođenjem gena koji kodira za oleat  $\Delta$ 12-hidroksilazu iz *Claviceps purpurea*. Međutim, za heterolognu ekspresiju gena viših eukariota, *Komagataella pastoris* se smatra najboljim ekspresijskim sustavom te se koristi za proizvodnju više od 500 heterolognih proteina. Primjeri korištenja *H. polymorpha* u industrijskoj proizvodnji biofarmaceutika su proizvodnja inzulina (Wosulin) i proizvodnja proteina za cjepivo protiv hepatitisa B. *K. lactis* se koristi za proizvodnju heterolognih proteina interleukina 1-b i lakaze, a uvođenjem gena za L-laktat dehidrogenazu iz *Lactobacillus helveticus* u *Pichia stipitis* omogućuje se efikasna proizvodnja L-laktata iz ksiloze (Steensels i sur., 2014). Budući da mikrobna proizvodnja goriva iz celuloznih materijala i drugih obnovljivih izvora ugljika predstavlja atraktivnu alternativu proizvodima dobivenim iz nafte, kvasci su vrlo zastupljeni i u proizvodnji biogoriva od kojih je industrijski najvažniji *S. cerevisiae* u proizvodnji bioetanola (Johnson i Echavarri-Erasun, 2011; Löbs, 2017). Nadalje, kvasci imaju vrlo važnu ulogu i u bioremedijaciji (Johnson i Echavarri-Erasun, 2011).

### 3. ZAKLJUČAK

Zbog sve veće potrebe da se kao supstrati u biotehnološkim procesima koriste jeftini i lako dostupni materijali (primjerice lignocelulozni otpad), može se pretpostaviti da će i u budućnosti mnoga istraživanja biti usmjerena ka razvoju novih te optimizaciji postojećih metoda za genetičku transformaciju i modifikaciju prirodnih sojeva nekonvencionalnih kvasaca koji, primjerice, mogu efikasno metabolizirati alternativne izvore ugljika i provoditi fermentaciju u prisutstvu nekih inhibitora rasta.



## 4. POPIS LITERATURE

1. Armaleo, D., Ye, G. N., Klein, T. M., Shark, K. B., Sanford, J. C., Johnston, S. A. (1990) Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics*, **17**: 97-103.
2. Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Rahbarnia, L., Aria, M. (2019) Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Molecular Biotechnology*, **61**: 365-384.
3. Biocyclopedia (2012-2020) <[www.biocyclopedia.com](http://www.biocyclopedia.com)> Pristupljeno 8. rujna 2020.
4. Bio-Rad (2020) <[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)> Pristupljeno 8. rujna 2020.
5. Broach, J.R., Strathern, J. N., Hicks, J. B. (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene. *Genetics* **8**: 121-133.
6. Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P. J. (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **14**: 3206-3214.
7. Burgers, P. M. J., Percival, L. J. (1987) Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. *Anal. Biochem.* **163**: 391-397.
8. Carter, M., Shieh, J. (2015) Gene Delivery Strategies, Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition), 239-252.
9. Costanzo, M.C., Fox, T. D. (1988) Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics* **120**: 667-670.
10. Delorme, E. (1989) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2242-2246.
11. Duraković, L., Delaš, F., Duraković, S. (2001) Mikrobi kao hrana. Proteini jednostaničnih organizama : podrijetlo i primjena, *Kemija u industriji* **51**: 287-291.
12. Eddy, A. A., Williamson, D. H. (1957) A method of isolating protoplasts from yeast. *Nature* **179**: 1252-1253.
13. Faber, K., Haima, P., Harder, W., Veenhuis, M., AB, G. (1994) Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Current Genetics* **25**: 305-310.
14. Fang, I. J., Trewyn, B. G. (2012) Nanomedicine. *Methods in Enzymology* **508**: 41-59.
15. Gietz, R. D., Schiestl, R. H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature protocols*, **2**: 31-34.

16. Gietz, R. D., Sugino, A. (1988) New yeast - *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Genetics* **74**: 527-534.
17. Gietz, R. D., Woods, A. R. (2001) Genetic Transformations of Yeast. *BioTechniques*, **20**: 816-831
18. Gietz, R.D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., Woods R. A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355-360.
19. Golberg, A., Rubinsky B. (2013) Mass Transfer Phenomena in Electroporation. *Transport in Biological Media*, 455-492.
20. Grey, M., Brendel, M. (1992) A tenminute protocol for transforming *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Curr. Genet.* **22**: 335-336.
21. Gurlpilhasa D. B., Hasmana, F. A., Pessoa, A., Roberto, I. C. Optimization of glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from *Candida guilliermondii* by disruption with glass beads. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 591-595.
22. Haber, J. E. (2012) Mating-Type Genes and *MAT* Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**: 33-64.
23. Harashima, S., Takagi, A., Oshima, Y. (1984) Transformation of protoplasted yeast cells is directly associated with cell fusion. *Mol. Cell Biol.* **4**: 771-778.
24. Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, K., Kimura, A. (1985) A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 336-339.
25. Herskowitz, I. (1988) Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **52**: 536-553.
26. Hinnen, A., Hicks, J. B., Fink, G. R. (1978) Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1929-1933.
27. Hoffman, C. S., Wood, V., Fantes, P. A. (2015) An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* **201**: 403-423.
28. Hood, M.T., Stachow, C. (1990) Transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **18**: 688.
29. Hooykaas, P. J. J., van Heusden, G. P. H., Niu, X., Reza Roushan, M., Soltani, J., Zhang, X., van der Zaal, B. J. (2018). *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Yeast and Fungi. *Current Topics in Microbiology and Immunology*
30. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.

31. Johnson, E. A., Echavarri-Erasun, C. (2011) Yeasts Biotechnology, The Yeasts 21-44
32. Johnston, J., Hilger, F., Mortimer, R. (1981) Variation in frequency of transformation by plasmid YRp7 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **16**: 325-329.
33. Kallifidas, D., Brady, S. F. (2012) Reassembly of Functionally Intact Environmental DNA-Derived Biosynthetic Gene Clusters, *Methods in Enzymology* **517**: 225-239.
34. Karube, I., Tamiya, E., Matsuoka, J. (1985) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. *FEBS Lett.* **182**: 90-94.
35. Kawai, S., Hashimoto, W., Murata, K. (2010) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Bioengineered Bugs* **1**: 395-403.
36. Kimura, A., Arima, A., Murata, K. (1981) Biofunctional change in yeast cell surface on treatment with Triton X-100. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2627.
37. Kiyokawa, K., Momota, N., Moriguchi K., Sato, Y., Suzuki, K., Tanaka, K., Yamamoto, S. (2012) Yeast transformation mediated by *Agrobacterium* strains harboring an Ri plasmid: comparative study between *GALLS* of an Ri plasmid and *virE* of a Ti plasmid. *Genes to Cells* **17**: 597–610.
38. Klebe, R.J., Harriss, J. V., Sharp, Z. D., Douglas, M. G. (1983) A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Genetics* **25**: 333-341.
39. 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, str. 11-30.
40. Löbs, A., Schwartz, C., Wheeldon, I. (2017) Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. *Synthetic and Systems Biotechnology* **2**: 198-207.
41. Manivasakam, P., Schiestl, R. H. (1993) High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4414-4415.
42. Meilhoc, E., Masson, J. M., Teissie, J. (1990) High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Biotechnology (NY)* **8**: 223-227.
43. Moreno, S., Klar, A., Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**: 795-823
44. Nickle, T., Barrette-Ng, I. (2020) Transgenic organisms. Online Open Genetics. LibreTexts.
45. Nora, L. C., Westmann, C. A., Guazzaroni, M. E., Siddaiah, C., Gupta, V. K., Silva-Rocha, R. (2019) Recent advances in plasmid-based tools for establishing novel microbial chassis. *Biotechnology Advances* **37**

46. Okada, H., Kono K., Neiman, A., Ohya (2016) Examination and Disruption of the Yeast Cell Wall. *Cold Spring Harb Protoc.* **8**
47. Prentice, H.L. (1992) High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **20**: 621
48. Rivera, A. L., Magana-Ortiz, D., Gomez-Lim, M., Fernandez, F., Loske, A. M. (2014) Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews* **11**: 184-203
49. Rose, M.D. 1987. Isolation of genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol.* **152**: 481-504.
50. Simon, J.R., McEntee K. (1989) A rapid and efficient procedure for transformation of intact *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 1157-1164.
51. Spencer, F., Ketner, G., Connelly, C., Hieter, P. (1993) Targeted recombination-based cloning and manipulation of large DNA segments in yeast. *Methods* **5**: 161-175.
52. Spencer, J., Ragout de Spencer, A., Laluce, C. (2002) Non-conventional yeasts, *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 147-156
53. Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Picca Nicolino, M., Voordeckers, K., Verstrepen K. J. (2014) Improving industrial yeast strains:exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews* **38**: 947-995
54. Stewart, G. G. (2014) SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*. Encyclopedia of Food Microbiology, 2. izd., Academic Press. str. 309-315.
55. Suga, M., Hatakeyama, T., (2003) High-efficiency electroporation by freezing intact yeast cells with additon of calcium. *Current Genetics* **43**: 206-211.
56. Svetec Miklenić, M., Štafa, A., Bajić, A., Žunar, B., Svetec, I. K. (2013) Genetic Transformation of the Yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* with Non-Homologous DNA. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**: 674-680.
57. Thompson, J.R., E. Register, E., Curotto, J., Kurtz, M., Kelly, R. (1998) An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. *Yeast* **14**: 565-571.
58. Throm, E., Dunze, W. (1970) Mating-Type-Dependant Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology.* **104**: 1388-1390.
59. Tofalo, R., Suzzi, G. (2016) Yeasts. Encyclopedia of Food and Health. str. 593-599.
60. Tosato, V., Arnak, R., Bruschi, C. (2012) Yeast Artificial Chromosomes. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

61. Wang, J. H., Hung, W., Tsai, S. H. (2011) High Efficiency Transformation by Electroporation of *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Microbiology*, **49**: 469-472
62. Wang, T., Choi, Y., Lee, B. H. (2001) Transformation Systems non-*Saccharomyces* Yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, **21**: 177–218.
63. Wang, Y., Lo, W. C., Chou C. S. (2017) A modeling study of budding yeast colony formation and its relationship to budding pattern and aging. *PLoS Computational Biology* **13**:
64. Yamakawa, M., Hishinuma, F., Gunge, N. (1985) Intact cell transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by polyethyleneglycol. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 869-871.
65. Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K., Winans, S. K. (2000) The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. *Journal of Bacteriology* **182**: 3885-3895.
66. Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* **23**: 11-28.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

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.*

*Gabrijela Jurić*

ime i prezime studenta