

Poboljšanje postupka transformacije kvasca *Scheffersomyces stipitis* elektroporacijom

Ćurković, Lada

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:375037>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2021.

Lada Ćurković

**POBOLJŠANJE POSTUPKA
TRANSFORMACIJE KVASCA**

Scheffersomyces stipitis

ELEKTROPORACIJOM

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Anamarije Štafe te uz pomoć Angele Matanović, mag. ing. biotechn.

Rad je napravljen u sklopu projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-IP-2018-01-9717), voditelja prof. dr. sc. Božidara Šanteka.



ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Anamariji Štafi na svom trudu i vremenu koje je uložila u mene prilikom istraživanja i pisanja rada te što mi je uvijek bila na raspolaganju za diskusiju i dobar savjet. Hvala Vam što ste mi uljepšali iskustvo studiranja!

Također, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci i strpljenju tijekom studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

POBOLJŠANJE POSTUPKA TRANSFORMACIJE KVASCA *Scheffersomyces stipitis* ELEKTROPORACIJOM

Lada Ćurković, univ. bacc.ing. biotechn.
0058207213

Sažetak: Nekonvencionalni kvasac *Scheffersomyces stipitis*, izoliran je iz trulećeg drva i larvi insekata koji nastanjuju drvo. *S. stipitis* ima jednu od najviših sposobnosti izravne fermentacije ksiloze u etanol što je posebno zanimljivo pri proizvodnji bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. Ovaj kvasac je prototrof, rezistentan je na antibiotike koji se često koriste kao selektivni biljezi pri transformaciji, nisu razvijeni visokoefikasni postupci za transformaciju te mu efikasnost transformacije iznosi $1 \cdot 10^3$ transformanata μg^{-1} . Cilj ovog rada bio je modificirati protokol za elektroporaciju kako bi se postigla viša efikasnost transformacije te odrediti uspješnost genskog ciljanja mehanizmom rekombinacije krajevi-van. Modificirani protokol za elektroporaciju omogućio je postizanje efikasnosti transformacije više od $1 \cdot 10^5$ transformanata μg^{-1} . Uspješnost genskog ciljanja, u sustavu u kojem se istraživala zamjena gena *SsURA3* genom koji nosi rezistenciju na higromicin, koji se nalazi na disrupcijskoj kazeti, procijenjena je na manje od 0,2 % jer prilikom transformacije nije nastao nijedan transformant željenog fenotipa. Dodatno, istražena je i mogućnost primjene CRISPR/Cas sustava kako bi se povećala uspješnosti genskog ciljanju u kvascu *S.stipitis*.

Ključne riječi: kvasac *Scheffersomyces stipitis*, transformacija, elektroporacija, gensko ciljanje, sustav CRISPR/Cas

Rad sadrži: 59 stranica, 19 slika, 7 tablica, 91 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Anamarija Štafa

Pomoć pri izradi: Angela Matanović, mag. ing. biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ivan Krešimir Svetec
2. izv. prof. dr. sc. Anamarija Štafa
3. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević
4. izv. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjena)

Datum obrane: 3. prosinca 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

THE IMPROVEMENT OF THE TRANSFORMATION PROCEDURE BY ELECTROPORATION FOR THE YEAST *Scheffersomyces stipitis*

Lada Ćurković, univ. bacc. ing. biotechn.
0058207213

Abstract: *Scheffersomyces stipitis* is a non-conventional yeast known for its capacity to ferment xylose and convert it to ethanol which is useful in the production of bioethanol from lignocellulosic materials. *S. stipitis* is isolated from decaying wood and larvae of wood-inhabiting insects. This yeast species is prototroph and resistant to antibiotics frequently used as selection markers for transformation. Furthermore, there are no highly efficient transformation protocols resulting in transformation efficiency around $1 \cdot 10^3$ transformants μg^{-1} . The aim of this research was to determine the electroporation parameters that increase the efficiency of transformation and to determine the percentage of gene targeting by ends-out recombination. Modified electroporation protocol resulted in transformation efficiencies higher than $1 \cdot 10^5$ transformants μg^{-1} . The expected result of gene targeting by ends-out recombination was the replacement of *SsURA3* gene with a hygromycin resistance gene on the disruption cassette and it was estimated to be lower than 0.2 % since none of the transformants showed the desired phenotype. Additionally, the use of CRISPR/Cas system for the improvement of gene targeting efficiency in *S.stipitis* was analyzed.

Keywords: yeast *Scheffersomyces stipitis*, transformation, electroporation, gene targeting, CRISPR/Cas system

Thesis contains: 59 pages, 19 figures, 7 tables, 91 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Anamarija, Štafa, PhD, Associate professor

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

Reviewers:

1. Ivan Krešimir, Svetec, PhD, Full professor
2. Anamarija, Štafa, PhD, Associate professor
3. Igor, Stuparević, PhD, Associate professor
4. Igor, Slivac, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: December 3rd, 2021

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	KONVENCIONALNI KVASCI.....	3
2.2.	NEKONVENCIONALNI KVASCI	4
2.2.1.	Kvasac <i>Scheffersomyces stipitis</i>	5
2.3.	HOMOLOGNA REKOMBINACIJA	6
2.3.1.	Primjena homologne rekombinacije	9
2.3.1.1.	Modifikacija gena u dva koraka	9
2.3.1.2.	Inaktivacija gena u jednom koraku	10
2.3.2.	Gensko ciljanje u nekonvencionalnim kvascima.....	11
2.4.	SUSTAV CRISPR/Cas9	12
2.4.1.	Primjena sustava CRISPR/Cas9	13
3.	MATERIJALI I METODE.....	17
3.1.	MATERIJALI	17
3.1.1.	Plazmidi	17
3.1.1.1.	Plazmid pRS54FcoHyg	17
3.1.1.2.	Plazmidi pMiniT2-SsURA3 i pMiniT2-SsUH.....	17
3.1.1.3.	Oligonukleotidi.....	19
3.1.1.4.	CRISPR/Cas9 ribonukleoproteinski kompleks (kompleks RNP)	19
3.1.2.	Mikroorganizmi	19
3.1.2.1.	Bakterija <i>Escherichia coli</i>	19
3.1.2.2.	Kvasac <i>Scheffersomyces stipitis</i>	19
3.1.3.	Hranjive podloge i otopine.....	20
3.1.3.1.	Podloge za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i>	20
3.1.3.2.	Podloge za uzgoj kvasca <i>Scheffersomyces stipitis</i>	20
3.1.3.3.	Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA	20
3.1.3.4.	Otopine za transformaciju kvašćevih stanica	23
3.1.3.5.	Otopine za gel elektroforezu	23
3.1.3.6.	Otopine za hibridizaciju DNA po Southern-u.....	24
3.1.4.	Kemikalije, enzimi, membrane	26
3.2.	METODE	26
3.2.1.	Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA	26
3.2.1.1.	Taloženje DNA amonij acetatom i etanolom.....	26

3.2.1.2.	Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol	27
3.2.1.3.	Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena	27
3.2.1.4.	Izolacija kvaščeve DNA iz stanica uzgojenih u tekućoj podlozi	28
3.2.1.5.	Izolacija DNA iz gela	28
3.2.2.	Cijepanje i modifikacija DNA	28
3.2.3.	Priprema crRNA/tracRNA/Cas9 ribonukleoproteinskog (RNP) kompleksa.....	28
3.2.3.1.	Provjera aktivnosti kompleksa RNP <i>in vitro</i>	29
3.2.4.	Lančana reakcija polimerazom (eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR)	29
3.2.5.	Transformacija kvašćevih stanica elektroporacijom.....	30
3.2.6.	Gel elektroforeza.....	31
3.2.7.	Hibridizacija DNA po Southern-u	31
3.2.7.1.	Priprema DNA sonde	32
3.2.7.2.	Prijenos DNA na membranu	32
3.2.7.3.	Predhibridizacija i hibridizacija	32
3.2.7.4.	Detekcija.....	33
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	34
4.1.	PROVJERA STRUKTURE PLAZMIDA pRS54FcoHyg, pMiniT2-SsURA3 i p-pMiniT2-SsUH.....	34
4.2.	OPTIMIZACIJA POSTUPKA TRANSFORMACIJE KVASCA <i>Scheffersomyces stipitis</i> ELEKTROPORACIJOM	36
4.3.	ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI GENSKOG CILJANJA U KVASCU <i>Scheffersomyces stipitis</i>	39
4.4.	UPOTREBA CRISPR/CAS9 RIBONUKLEOPROTEINSKOG KOMPLEKSA PRI GENSKOM CILJANJU	42
5.	ZAKLJUČCI	50
6.	LITERATURA	51

1. UVOD

Kvasci se koriste kroz dugi niz godina u raznim industrijskim bioprocima i laboratorijskim istraživanjima. Zahvaljujući jednostavnom uzgoju i mogućnosti uvođenja ciljanih genetičkih modifikacija, konvencionalni kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jedan je od najčešće korištenih mikroorganizama u proizvodnji različitih kemikalija, rekombinantnih proteina i biogoriva. U novije vrijeme, istražuje se i primjena nekonvencionalnih kvasaca kao što su *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha* i *Komagataella (Pichia) pastoris* za različite biotehnološke procese. Ovi nekonvencionalni kvasci evolucijski su udaljeni od kvasca *S. cerevisiae* i razlikuju se po brojnim karakteristikama koje ih čine zanimljivim kandidatima za proizvodnju finih kemikalija, ulja i rekombinantnih proteina (Cai i sur., 2019).

Kvasac *Scheffersomyces stipitis* izoliran je iz trulećeg drva i larvi insekata koji nastanjuju drvo (Tojo i Hirasawa, 2014) i jedan je od kvasaca s najvišom sposobnošću izravne fermentacije ksiloze u etanol, što je posebno bitno pri proizvodnji bioetnola iz lignoceluloznih sirovina (Tojo i Hirasawa, 2014). S druge strane, primjena kvasca *S. stipitis* u biotehnologiji je otežana jer nisu razvijeni visokoefikasni postupci za transformaciju, prirodno je rezistentan na najčešće korištene antibiotike, ima alternativni genetički kod i transformirajuća DNA se češće integrira u genom ilegitimnom integracijom što čini uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija vrlo izazovnim (Jeffries i Headman Van Vleet, 2009).

Cilj ovog rada bio je modificirati protokol za transformaciju nekonvencionalnog kvasca *S. stipitis* elektroporacijom kako bi se postigla viša efikasnost transformacije i odrediti uspješnost genskog ciljanja. Za određivanje uvjeta transformacije koji povećavaju efikasnost transformacije korišten je replikativni plazmid pRS54FcoHyg. Uspješnost genskog ciljanja određena je transformacijom s linearnim fragmentom koji nosi rezistenciju na antibiotik higromicin (fenotip Hyg^R). Također, disrupcijska kazeta na krajevima sadrži sekvencije od 2,5 kb koje su homologne ciljnoj regiji u genomu. Pri uspješnom genskom ciljanju zamjenjuje se otvoreni okvir čitanja gena *SsURA3* genom *coHygR* koji se nalazi na disrupcijskoj kazeti te su stanice u kojima je došlo do genskog ciljanja rezistentne na higromicin i ovisne o uracilu (fenotip Hyg^R Ura⁻). Dodatno, u ovom radu istražena je i primjena sustava CRISPR/Cas9 u svrhu povećanja uspješnosti genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis*. S obzirom na alternativni genetički kod, u odnosu na konvencionalne kvasce, i mali broj dostupnih selektivnih biljega za

transformaciju u ovom radu sustav CRISPR/Cas9 korišten je u obliku ribonukleoproteinskog kompleksa (kompleks RNP) koji je sklopljen *in vitro* i dostavljen s disrupcijskom kazetom tijekom transformacije elektroporacijom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KONVENCIONALNI KVASCI

Kvasci su jednostanični eukariotski mikroorganizmi koji pripadaju carstvu *Fungi* (Hoffman i sur., 2015), a zbog korisnih fizioloških svojstava, poput fermentacije šećera, koriste se u proizvodnji kruha, vina, piva i finih kemikalija (Chen i sur., 2010). Otkriveno je preko tisuću vrsta kvasaca (Hoffman i sur., 2015), a podijeljeni su na konvencionalne i nekonvencionalne kvasce (van Dijken, 2002). Pod pojmom konvencionalni kvasci podrazumijevaju se dvije najbolje istražene i najčešće korištene vrste - *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* (Lane i Morrissey, 2010; Spencer i sur., 2002). Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* korišten je od davnina za dizanje tijesta i proizvodnju piva i vina (Spencer i sur., 2002). Kvasci *S. cerevisiae* i *S. pombe* često su korišteni kao modelni organizmi za proučavanje svih procesa u eukariotskoj stanici (Ostergaard i sur., 2000). Proučavanje ova dva modelna organizma dovelo je do karakterizacije gena uključenih u gotovo sve važne biološke procese kao što su transkripcija, translacija, replikacija DNA i regulacija staničnog ciklusa (Hoffman i sur., 2015).

Saccharomyces cerevisiae poznat kao pivski, prehrambeni ili pekarski kvasac jednostanični je mikroorganizam koji može postojati u haploidnom i diploidnom obliku (Zorgo i sur, 2013). Razmnožava se vegetativno pupanjem pri čemu razlikujemo stanicu majku i stanicu kćer (pup). Osim vegetativnog ciklusa, u nepovoljnim uvjetima diploidne stanice mogu ući i u spolni ciklus (mejozu) pri čemu iz jedne diploidne stanice nastanu 4 haploidne spore unutar askusa. Prvi je eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran te haploidni genom veličine 12,5 Mb sadrži 5800 gena organiziranih u 16 kromosoma (Goffeau i sur., 1996). Dodatna prednost kvasca *S. cerevisiae* je izrazito jednostavno unošenje ciljanih genetičkih modifikacija u njegov genom jer se dvolančani lom (engl. *double strand break*, DSB) najčešće popravljaju homolognom rekombinacijom (Pâques i Haber, 1999).

Schizosaccharomyces pombe dobro je okarakteriziran kvasac koji se razmnožava vegetativno poprečnom diobom. Stanice su cilindričnog oblika s hemisfernim krajevima, promjera oko 3,5 µm i duljine 8 – 15 µm, najčešće u haploidnom obliku (Morgan, 2007). Genom kvasca *S. pombe* sekvencioniran je u potpunosti 2002. godine, a veličina mu iznosi oko 13,8 Mb te se sastoji od 3 velika kromosoma (Wood i sur., 2002). Za uzgoj se koristi podloga YES (Yeast Extract with Supplements) jer peptoni u podlozi YPD (Yeast Extract – Peptone –

Dextrose), koja se koristi za rad s kvascem *S. cerevisiae*, onemogućuju rast kvasca *S. pombe*. Uz podlogu YES koristi se još i podloga EMM (Edinburgh Minimal Medium) jer ostali standardni mediji, koji se koriste za uzgoj kvasca *S. cerevisiae*, kao što su SC (Synthetic Complete) i SD (Synthetic Defined) nisu u potpunosti odgovarajući za rast kvasca *S. pombe* (Hoffman i sur., 2015).

2.2. NEKONVENCIONALNI KVASCI

Kao što je već spomenuto u poglavlju 2.1., pod pojmom konvencionalni kvasci podrazumijevaju se kvasci *S. cerevisiae* i *S. pombe* koji imaju najširu upotrebu, najbolje su okarakterizirani i istraženi dok se pod pojmom nekonvencionalni kvasci misli na sve ostale vrste kvasaca (Spencer i sur., 2002).

Nekonvencionalni kvasci *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha* i *Komagataella (Pichia) pastoris* često su korišteni u biotehnologiji zbog poželjnih svojstava kao što su tolerancija na visoke temperature, asimilacija različitih izvora ugljika, jako uspješna sekrecija heterolognih proteina (Löbs i sur., 2017), osmotolerantnost, rast na visokim koncentracijama etanola, rast u prisustvu derivata furana i tolerancija na octenu kiselinu (Radecka i sur., 2015).

Osmotolerantnost, to jest sposobnost kvasaca da rastu u medijima s visokim koncentracijama soli ili šećera poželjna je karakteristika prilikom provođenja fermentacija u industrijskom mjerilu zbog korištenja visokih koncentracija supstrata (Radecka i sur., 2015). *Zygosaccharomyces rouxii* haploidni je kvasac izoliran iz kontaminirane hrane bogate šećerom ili soli (Martorell i sur, 2007; Restaino i sur., 1983) te je jedna od najosmotolerantnijih i najhalotolerantnijih do sada istraživanih vrsta kvasaca (Martorell i sur., 2007).

Kvasac *Kluyveromyces marxianus* izoliran je iz sira i drugih mliječnih proizvoda i postoji u haploidnom i diploidnom obliku (Radecka i sur., 2015). Poznat je po termotolerantnosti te može rasti na temperaturama od 47 °C (Limtong i sur., 2007), 49 °C i čak 52 °C (Banat i sur., 1992), a etanol može proizvoditi na temperaturama višim od 40 °C (Nonklang i sur., 2008; Limtong i sur., 2007; Kourkoutas i sur., 2002).

Kvasac *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* često nalazimo u nišama u kojima raste i kvasac *S. cerevisiae*, poput piva, vina, jabučnog vina (engl. *cider*) i slično (Piškur i sur., 2012). Prisustvo *B. bruxellensis* u fermentaciji vina ukazuje na toleranciju ovog kvasca prema visokim koncentracijama etanola (Piškur i sur., 2012) te sojevi izolirani iz vina pokazuju

moćnost rasta pri koncentracijama etanola između 10 i 16 % (Echeverrigaray i sur., 2013) i često uzrokuju promjenu okusa i mirisa te kvarenje vina.

Zadnjih godina, nekonvencionalni kvasci koriste se za proizvodnju rekombinantnih proteina. Tako na primjer kvasci koji oksidiraju metanol – *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Komagataella* spp., *Ogataea minuta*, *Candida* spp. (Johnson, 2012) u odgovarajućim uvjetima akumuliraju velike količine alkohol oksidaze. Zbog visoke razine ekspresije, promotor gena za alkohol oksidazu koristi se za ekspresiju heterolognih proteina koji se mogu izolirati iz tekućeg medija u kojem je rastao kvasac (van Dijken, 2002). Tako se pomoću kvasca *Hansenula polymorpha* proizvodi fitaza, a pomoću kvasca *Candida utilis* α -amilaza. Također, ekspresijski sustavi koji se temelje na jakim promotorima gena za alkohol oksidazu ili gliceraldehid fosfat dehidrogenazu kvasca *Pichia pastoris*, komercijalno su dostupni i imaju široku primjenu u proizvodnji heterolognih proteina (van Dijken, 2002).

2.2.1. Kvasac *Scheffersomyces stipitis*

Scheffersomyces stipitis, prethodno nazvan *Pichia stipitis*, homotalični je kvasac, najčešće postoji u haploidnom obliku, a izoliran je iz trulećeg drva i larvi insekata koji nastanjuju drvo (Tojo i Hirasawa, 2014). Genom mu je u potpunosti sekvenciran (Jeffries i sur., 2007). Sadrži gene koji kodiraju za celulaze, manaze, ksilanaze i druge enzime koji omogućavaju preživljavanje i rast u utrobi insekata koji nastanjuju drvo (Nardi i sur., 2006). Pripada skupini askomiceta odnosno grupi kvasaca (engl. *CUG clade*) koja pri translaciji kodona CUG ugrađuje serin umjesto leucina odnosno imaju alternativni genetički kod.

Kvasac *S. stipitis* fermentira šećere u aerobnim uvjetima, ali i u uvjetima niske koncentracije kisika, dok u anaerobnim uvjetima izravno fermentira glukozu, ksilozu, galaktozu i celobiozu (Tojo i Hirasawa, 2014). Ksiloza je građevna jedinica hemiceluloze poznata i kao „drvni šećer“ te je visoko zastupljena u prirodi (Nigam, 2001), no tek je nekoliko vrsta kvasaca može fermentirati i pritom proizvesti etanol (Nigam, 2001; Wang i sur., 1980) i male količine ksilitola. Kvasac *S. stipitis* jedan je od kvasaca s najvišom sposobnošću izravne fermentacije ksiloze u etanol što je posebno bitno pri proizvodnji bioetanola iz lignoceluloznih sirovina (Tojo i Hirasawa, 2014).

Proizvodnja etanola iz lignoceluloznih sirovina ekonomski i ekološki je zanimljiva zbog čega je kvasac *S. stipitis* opsežno istražen i korišten (Bajwa i sur., 2011). U industriji se koristi za proizvodnju etanola, mliječne kiseline i drugih spojeva iz celulozne biomase te su

genetičkim modifikacijama konstruirani sojevi koji bolje koriste ksilozu (Hahn-Hägerdal i sur., 2007). Kvasac *S. stipitis* koristan je i u proizvodnji različitih spojeva poput flavanoida i alkaloida visoke farmaceutske vrijednosti proizvedenih putem šikiminske kiseline (Cao i sur., 2017). Efikasnost fermentacije kod kvasca *S. stipitis* ovisi o koncentraciji kisika, za razliku od kvasca *S. cerevisiae* gdje ovisi o koncentraciji supstrata, te proizvodnja etanola započinje u trenutku kada je koncentracija kisika limitirajuća. Za proizvodnju etanola u kvascu *S. stipitis* odgovorna su dva gena *ADH1* i *ADH2*, koji kodiraju za kompleks alkohol-dehidrogenaze koja se aktivira u uvjetima smanjena parcijalnog tlaka kisika, a smatra se da je regulacija posredovana razinom hema (Papini i sur., 2012).

Mane kvasca *S. stipitis*, u odnosu na konvencionalne kvasce, sporija su potrošnja šećera, niska tolerancija na etanol i Crabtree-negativan efekt. Zbog toga se u biotehnologiji često koriste i geni iz kvasca *S. stipitis* eksprimirani u kvascu *S. cerevisiae* kako bi se omogućila fermentacija pentozna. Također, znatno je teže ciljano modificirati genom kvasca *S. stipitis* jer nisu razvijeni visokoefikasni postupci za transformaciju te izrazito često dolazi do nasumične integracije transformirajuće DNA (Jeffries i Headman Van Vleet, 2009). Prirodna rezistencija na antibiotike koji se najčešće koriste kao selektivni biljezi pri transformaciji i korištenje alternativnog sustava kodona dodatno otežavaju rad s ovim kvascem.

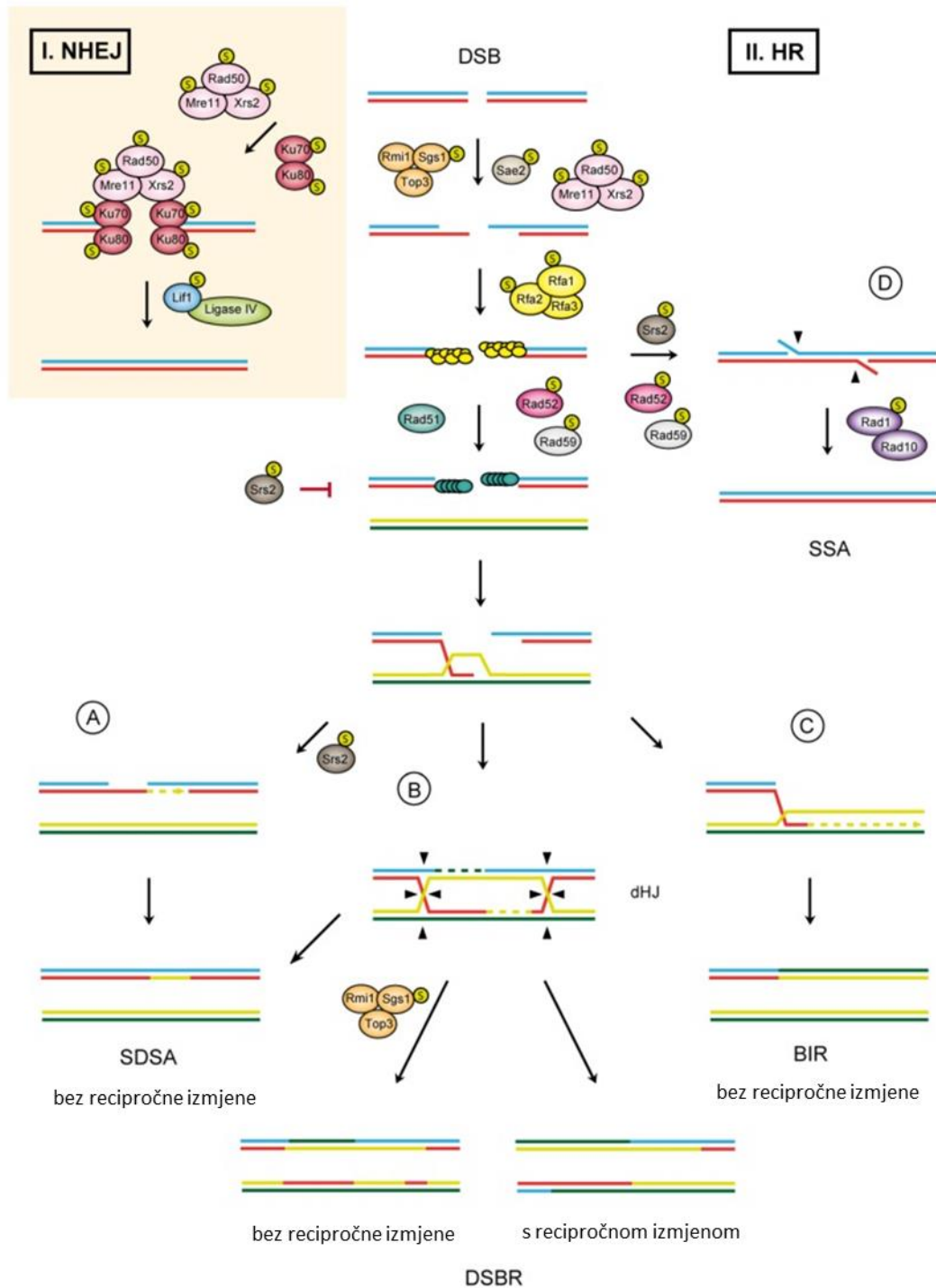
Unatoč ovim poteškoćama, Melake i suradnici (1996) razvili su sustav za sporulaciju i parenje kvasca *S. stipitis*, Yang i suradnici (1994) su razvili sustav za transformaciju koji se temelji na genu *URA3* kao selektivnom biljegu, a Lu i suradnici (1998) su koristili gen *LEU2*. Laplaza i suradnici (2006) razvili su selektivni biljeg koji se bazira na rezistenciji transformiranih stanica na antibiotik zeocin (kao biljeg je korišten gen *Shble*). Zahvaljujući razvoju protokola za transformaciju, replikativnih i integrativnih vektora te rekombinacijskih sustava, kao što je sustav *loxP/Cre* (Sugita i Nakase, 1999) omogućeno je uvođenje genetičkih modifikacija i početak industrijske primjene kvasca *S. stipitis* (Steensels i sur., 2014).

2.3. HOMOLOGNA REKOMBINACIJA

Dvolančani lom u DNA, potencijalno je letalno oštećenje za stanicu, a dva osnovna mehanizma popravka ovog oštećenja su nehomologno spajanje krajeva to jest ilegitimna rekombinacija (eng. *non-homologous end joining*, NHEJ, slika 1.I) i homologna rekombinacija (eng. *homologous recombination*, HR, slika 1.II). Razlika između ovih mehanizama je u potrebi za neoštećenom homolognom (donorskom) sekvencom, koja služi kao kalup za

popravlak dvolančanog loma tijekom homologne rekombinacije, dok pri ilegitimnoj rekombinaciji dolazi do ligacije krajeva oštećene DNA.

Odabir mehanizma za popravak dvolančanog loma ovisi o tipu i ploiditetu stanica te fazi staničnog ciklusa (Symington i Gautier, 2011). Nehomologna (ilegitimna) rekombinacija najčešći je mehanizam popravka dvolančanog loma u somatskim stanicama viših eukariota, a homologna rekombinacija u kvascu *S. cerevisiae* (Heslot i Gaillardin, 1992) zbog čega je upravo ovaj kvasac najvažniji modelni organizam korišten za istraživanje mehanizma u prvom redu homologne, ali i ilegitimne rekombinacije u eukariota (Symington i Gautier, 2011; Pâques i Haber, 1999). Kod homologne rekombinacije dolazi do prijenosa i/ili izmjene genetičke informacije između molekula nukleinskih kiselina s identičnim (homolognim) ili vrlo sličnim (homeolognim) sekvencijama. Također, tijekom mejoze, to jest tijekom stvaranja gameta, nastaju dvolančani lomovi koji potiču homolognu rekombinaciju koja je neophodna za pravilnu segregaciju kromosoma tijekom koje može doći do recipročne izmjene i inaktivacije gena što dovodi do nastanka novih kombinacija gena i do genetičke raznolikosti potomstva što omogućuje prilagodbu na promijenjene uvjete u okolišu (Alberts i sur., 2002).



Slika 1. Popravak dvolančanog loma homolognom i ilegitimnom rekombinacijom (prema Altmannova i sur., 2012). Na slici su prikazani kompleksi Rad50, Mre11, Xrs2, Ku70, Ku80, Lif1 i ligaza IV koji sudjeluju u nehomolognom spajanju krajeva te kompleksi Rmi1, Sgs1, Top3, Rad50, Mre11, Xrs2, Rfa1, Rfa2, Rfa3, Rad1, Rad10 i proteini Srs2, Rad51, Rad52, Rad59 koji sudjeluju mehanizmu homologne rekombinacije

Proces popravka dvolančanog loma homolognom rekombinacijom sastoji se od nekoliko koraka koji su zajednički svim eukariotskim organizmima (slika 1.II). Nakon nastanka dvolančanog loma, 5'-jednolančani krajevi DNA degradiraju se 5'-3' egzonukleaznom

aktivnošću te nastaju dugi 3'-jednolančani krajevi na koje se vežu proteini koji sudjeluju u homolognoj rekombinaciji i počinje potraga za homolognom, to jest donorskom DNA. Kada je donorska DNA pronađena, 3'-krajevi oštećene (recipijentne) DNA ulaze u homolognu neoštećenu molekulu DNA te dolazi do komplementarnog sparivanja i na 3'-jednolančani kraj oštećene DNA nastavlja se reparativna sinteza DNA. Ukoliko dođe do istiskivanja novosintetiziranog lanca iz donorske regije i komplementarnog sparivanja jednolančanih 3'-krajeva recipijentne regije riječ je o popravku mehanizmom SDSA (eng. *Synthesis Dependent Strand Annealing*, slika 1.A.). Ukoliko se i drugi 3'-kraj dvolančanog loma komplementarno spari s donorskom regijom i nastanu dvije Holliday-eve strukture (eng. *double Holliday junction*, dHJ) riječ je o popravku mehanizmom DSBR (eng. *Double Strand Break Repair*, slika 1.B.) te nastali intermedijer može biti razriješen sa ili bez recipročne izmjene. Ukoliko ne postoji drugi kraj loma, reparativna sinteza nastavlja se mehanizmom BIR (eng. *Break-induced Replication*, slika 1.C.; Altmannova i sur., 2012; Sung i Klein, 2006). Ako se dvolančani lom dogodio između direktno ponovljenih sekvenci, nakon procesiranja krajeva, u popravku SSA (eng. *Single strand Annealing*), komplementarno se sparuju jednolančani 3'-krajevi te „flap“-endonukleaze uklanjaju sekvencije između ponovljenih regija i jednu ponovljenu regiju (slika 1.D.).

2.3.1. Primjena homologne rekombinacije

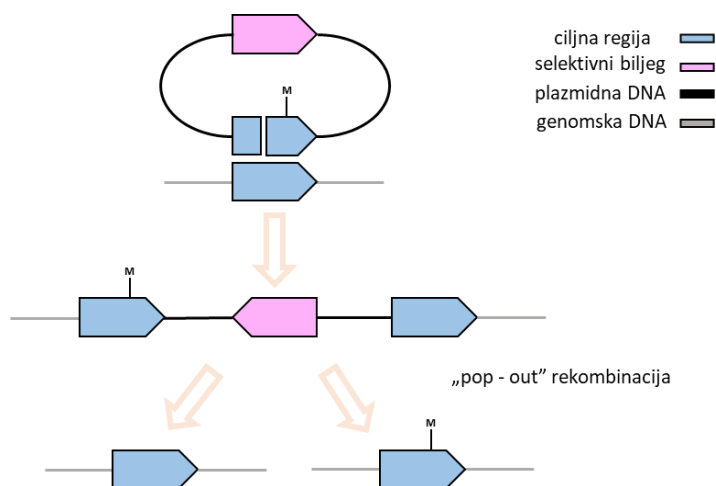
Homologna rekombinacija temelj je metoda za uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija (Lodish i sur., 2000). Zahvaljujući visokoj efikasnosti homologne rekombinacije, u konvencionalnom kvascu *S. cerevisiae* omogućeno je uvođenje preciznih ciljanih genetičkih promjena pomoću linearnih fragmenata DNA i lineariziranih integrativnih plazmida, a primjenjuju se dva pristupa: modifikacija gena u dva koraka opisana u poglavlju 2.3.1.1. te inaktivacija gena u jednom koraku opisana u poglavlju 2.3.1.2.

2.3.1.1. Modifikacija gena u dva koraka

Modifikacija gena u dva koraka odvija se uvođenjem željene modifikacije u regiju na integrativnom plazmidu, koja je homologna ciljnoj sekvenciji u genomu. Ovakav integrativni plazmid sadrži i selektivni biljeg za selekciju transformanata, a integracija plazmida usmjerava se u ciljnu sekvenciju u genomu uvođenjem dvolančanog loma u modificiranu regiju plazmida (slika 2.). Osim homolognom rekombinacijom, popravak dvolančanog loma na plazmidu može

se dogoditi i ilegitimnom integracijom koja se dešava s jako niskom frekvencijom (Schiestl i Petes, 1991).

Prilikom transformacije kvasca dolazi do komplementarog sparivanja lineariziranog plazmida i ciljne regije te su krajevi transformirajuće DNA okrenuti jedan prema drugome, zbog čega se ovakav tip genskog ciljanja naziva još i rekombinacija „krajevi unutra“ (eng. „ends-in“). Integracija plazmida dovodi do duplikacije ciljne regije pri čemu jedna kopija sadrži željenu modifikaciju, a između kopija se nalazi cjelokupna plazmidna DNA. Između homolognih ciljnih regija može se odviti i rekombinacija uz recipročnu izmjenu (eng. *crossing-over*) te dolazi do gubitka jedne od ciljnih regija i plazmida sa selektivnim biljekom („pop-out“ rekombinacija). Vjerojatnost da je u genomu zadržana modificirana ili nemodificirana verzija gena je jednaka stoga je potrebna detaljna molekularna analiza transformanata kako bi se utvrdilo prisustvo željene modifikacije.

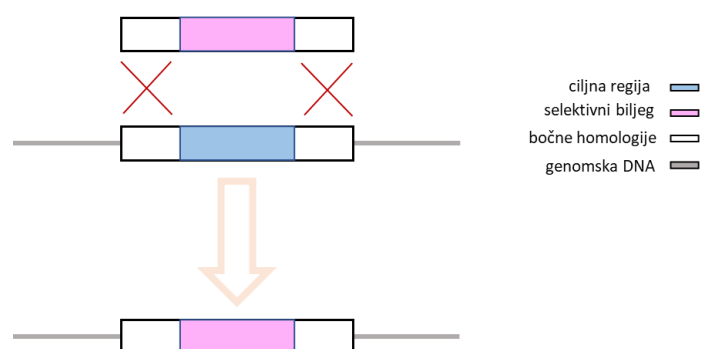


Slika 2. Shematski prikaz modifikacije gena u dva koraka rekombinacijom „krajevi-unutra“. M – modifikacija koja se želi unijeti u genom

2.3.1.2. Inaktivacija gena u jednom koraku

Inaktivacija gena u jednom koraku temelji se na zamjeni ciljne regije u genomu s transformirajućom DNA. Transformirajuća DNA je linearni fragment koji sadrži biljeg za selekciju omeđen bočnim homologijama to jest sekvencijama koje su homologne regijama koje okružuju ciljni gen u genomu (slika 3.). Prilikom transformacije dolazi do komplementarnog sparivanja bočnih homologija transformirajuće DNA s ciljnom regijom u genomu te su krajevi transformirajuće DNA okrenuti jedan od drugoga zbog čega se ovaj tip homologne rekombinacije još naziva i rekombinacija „krajevi van“ (eng. „ends-out“) ili zamjena gena (Rothstein, 1983).

Posljedica zamjene ciljnog gena sa selektivnim biljegom je inaktivacija tog gena, no transformacija može rezultirati i ilegitimnom integracijom transformirajućeg fragmenta, integracijom transformirajućeg fragmenta pored ciljne regije ili duplikacijom ciljnog kromosoma pri čemu jedna kopija nosi nemodificirani alel, a druga alel koji nastaje zamjenom gena (Štafa i sur., 2014; Svetec i sur., 2007). Kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* mehanizam homologne rekombinacije vrlo je uspješan te bočne homologije duge samo 40 parova baza omogućuju gensko ciljanje u otprilike 10 % slučajeva (Baudin i sur., 1993), dok produljenje bočnih homologija omogućuje uspješnost od 90 % (Pâques i Haber, 1999).



Slika 3. Shematski prikaz modifikacije gena u jednom koraku rekombinacijom „krajevi van“

2.3.2. Gensko ciljanje u nekonvencionalnim kvascima

Veliki nedostatak primjene nekonvencionalnih kvasaca je niska uspješnost uvođenja ciljanih genetičkih promjena. Prilikom unošenja egzogene DNA u stanicu dolazi do nasumične integracije lineariziranog vektora ili disrupcijske kazete u genom zbog ilegitimne rekombinacije koja se odvija puno češće od homologne rekombinacije (Vogl i sur., 2013; Näätäsaari i sur., 2012).

Kao rješenje ovog problema najčešće se povećava efikasnost homologne rekombinacije povećanjem dužine bočnih homologija na transformirajućem fragmentu DNA ili smanjenjem uspješnosti ilegitimne rekombinacije delecijom gena *KU70* i *KU80* (Yang i Blenner, 2020). Problem kod ovog pristupa je što mnogi nekonvencionalni kvasci postoje isključivo u haploidnom obliku pa delecija gena bitnih za popravak DNA ilegitimnom rekombinacijom utječe i na vitalnost stanica što smanjuje efikasnost transformacije kada je potreban brzi oporavak stanica (Zeeman i Steensma, 2002).

S razvojem genetičkog inženjerstva, napreduju i metode genskog ciljanja u organizmima u kojima je preferirana ilegitimna rekombinacija kao mehanizam popravka DNA te se

nekonvencionalni kvasci sve više koriste u proizvodnji terapijskih proteina, kemikalija, cjepiva i prehrambenih aditiva radi svojih poželjnih karakteristika (Yang i Blenner, 2020). Inaktivacija gena u nekonvencionalnim kvascima postiže se uvođenjem dvolančanog loma u ciljnu regiju (gen), koji se popravlja ilegitimnom rekombinacijom te se u tu svrhu mogu primijeniti: nukleaze koje djeluju poput aktivatora transkripcije (eng. *transcription activator-like effector nucleases*, TALENs) (Carroll, 2014; Li i sur., 2011), nukleaze s cinkovim prstima (eng. *zinc finger nucleases*, ZNF) (Doyon i sur., 2011), tehnologija CRISPR/Cas9 (Stovicek i sur., 2015) opisana u poglavlju 2.4. te *loxP/Cre* rekombinacijski sustav (Yang i Blenner, 2020).

Kvasac *S. stipitis* interesantan je modelni organizam zbog sposobnosti fermentacije ksiloze, iako niska uspješnosti genskog ciljanja uvelike otežava uređivanje genoma. Novija istraživanja pokazuju uspješnu primjenu sustava CRISPR/Cas9 i korištenje sojeva kvasca *S. stipitis* u kojima su inaktivirani geni *KU70* i *KU80* radi povećanja učinkovitosti homologne rekombinacije (Yang i Blenner, 2020).

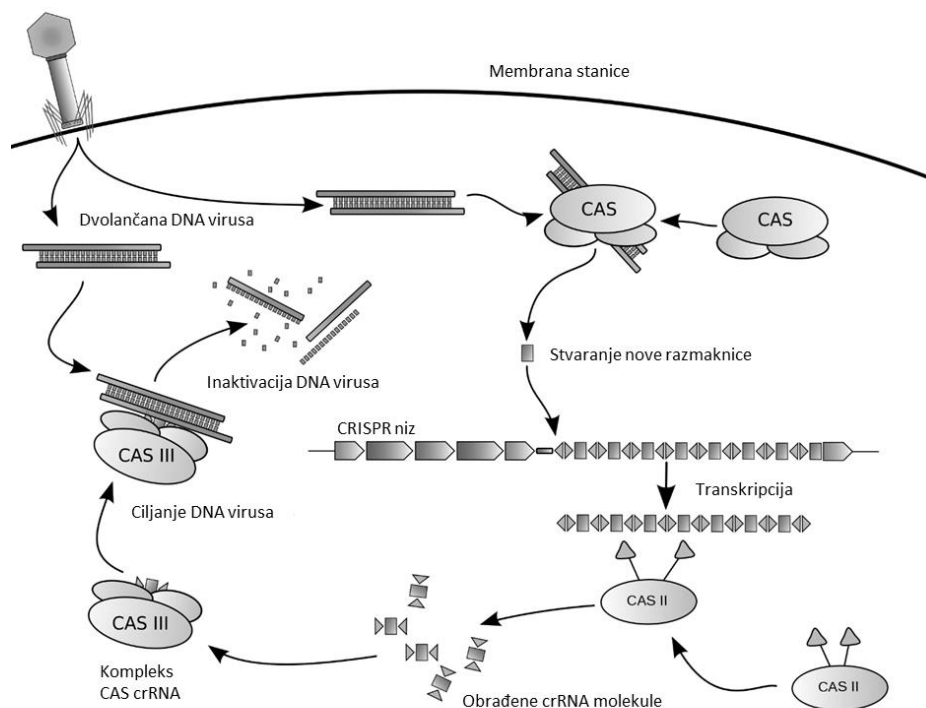
2.4. SUSTAV CRISPR/Cas9

Sustav CRISPR/Cas oblik je stečene imunosti (Marraffini i Sontheimer, 2008) i pronađen je u otprilike 50 % sekvenciranih bakterijskih genoma i gotovo 90 % sekvenciranih arheja (Hille i sur., 2018). Imunost stečena pomoću sustava CRISPR/Cas prirodan je proces u bakterija i arheja (Azangou-Khyavy i sur., 2020) koji sprječava infekciju virusima tako što prepoznaje stranu DNA virusa koja uđe u stanicu te ju degradira (Marraffini, 2015).

Sekvence CRISPR (eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) su kratka palindromska ponavljanja unutar genoma prokariota (Barrangou, 2015), a između palindromskih ponavljanja nalaze se razmaknice (eng. *protospacer*), regije koje potječu od fragmenata DNA bakteriofaga, koji su prethodno inficirali prokariotski organizam u kojem se nalaze i služe za obranu od budućih infekcija istim ili srodnim bakteriofazima.

Prvi korak u obrani od bakteriofaga je prepoznavanje strane DNA i njeno umetanje unutar lokusa CRISPR u obliku razmaknice, a u ovom procesu sudjeluju dva proteina: Cas1 i Cas2 (Aliyari i Ding, 2009). Proteini skupine Cas1 su nukleaze i integraze čija aktivnost ovisi o metalnom ionu te se vežu na DNA (Wiedenheft i sur., 2012), a proteini skupine Cas2 imaju endoribonukleaznu aktivnost (Nam i sur., 2012; Beloglazova i sur., 2008). Prepoznavanje, cijepanje i ugradnja fragmentirane virusne DNA ovisi o postojanju sekvencije PAM (eng. *protospacer adjacent motif*; Mojica i sur., 2009). Transkripcijom regije CRISPR i

procesiranjem nastalog transkripta nastaju kratke molekule RNA od kojih svaka sadrži jednu razmaknicu odnosno kratku sekvencu RNA (crRNA, eng. *CRISPR RNA*) koja je komplementarna dijelu genoma bakteriofaga. Takva molekula RNA tvori kompleks s proteinom Cas3 (Sinkunas i sur., 2011), ATP – ovisna translokaza i helikaza koja sudjeluje u razgradnji virusne DNA (He i sur., 2020), a bakterija je otporna na onaj virus za koji ima specifični kompleks crRNA/Cas. Bakterije su zaštićene od vlastitog sustava CRISPR/Cas jer je za aktivnost proteina Cas nužna sekvencija PAM, koja se ne ugrađuje u bakterijski genom (Marraffini i Sontheimer, 2010). Shematski prikaz sustava CRISPR/Cas u bakterija nalazi se na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz sustava stjecanja imunosti prokariota pomoću sustava CRISPR/Cas (prema Horvath i Barrangou, 2010)

2.4.1. Primjena sustava CRISPR/Cas9

Sustavi CRISPR/Cas, danas čine temelj metode koja se koristi za uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija (engl. *genome editing*, uređivanje genoma) u genome raznih organizama (Zhang i sur., 2014). Takav sustav za uređivanje genoma ima široku primjenu od bioloških istraživanja, proizvodnje biotehnoških produkata do liječenja bolesti (Hsu i sur., 2014). Prednost upotrebe sustava CRISPR/Cas naspram drugih proteina koji služe za

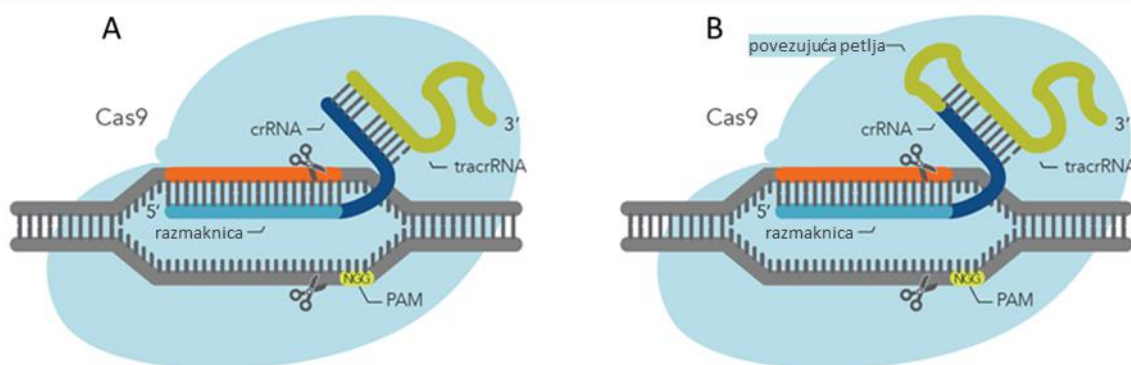
uređivanje genoma kao što su TALENs (eng. *transcription activator-like effector nuclease*) ili ZFNs (eng. *zinc finger nuclease*) leži u tome što nije potrebno modificirati protein Cas nego samo molekulu RNA što je puno jednostavnije.

Proteini Cas (eng. *CRISPR associated enzyme*) cijepaju nukleinske kiseline (DNA ili RNA) te su iz različitih bakterijskih vrsta izolirani različiti proteini Cas. U eksperimentima koji uključuju uređivanje genoma najčešće se koriste proteini Cas9 i Cas12. Protein Cas9 je endonukleaza izolirana iz bakterije *Streptococcus pyogenes*, a protein Cas12 (poznat kao i Cpf1) iz rodova *Acidaminococcus* ili *Lachnospiraceae*. Oba enzima uvode dvolančane lomove, a danas na tržištu postoje i modificirani oblici proteina kako bi se poboljšala njihova funkcija.

Druga komponenta sustava CRISPR/Cas je molekula gRNA (eng. *guideRNA*) koja s proteinom Cas9 tvori kompleks RNP (ribonukleoproteinski kompleks). Molekula gRNA komplementarno se sparuje s ciljnom sekvencom dugom otprilike 20 baza u čijoj se neposrednoj blizini nalazi sekvencija PAM. Nakon vezanja kompleksa RNP na ciljnu sekvencu, enzim Cas cijepa sekvencu na točno određenom mjestu.

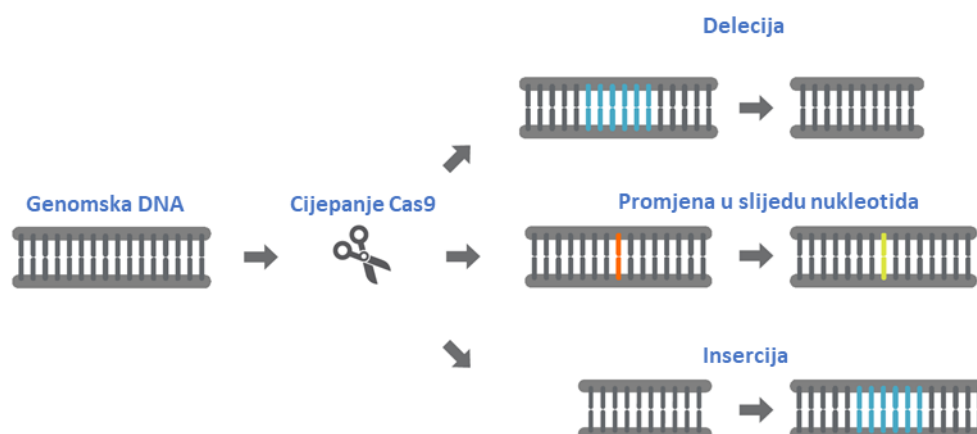
Aktivni kompleks RNP može se formirati unutar stanice, ukoliko su geni koji kodiraju za sintezu proteina Cas i gRNA uneseni u stanicu pomoću plazmida ili virusa, ili izvan stanice, ukoliko se za formiranje kompleksa RNP koriste izolirani protein Cas i sintetizirana molekula gRNA, a ovakav sustav komercijano je dostupan od kompanije Integrated DNA Technologies Inc (IDT).

Molekula gRNA može se dizajnirati na dva načina: kao dvokomponentni ili jednokomponentni sustav. Dvokomponentni sustav, koji je sličniji sustavu u prirodi, sastoji se od dvije kratke molekule RNA (tracrRNA i crRNA), dok se jednokomponentni sustav sastoji od jedne molekule sgRNA (slika 5.). Molekula crRNA sastoji se od dijela komplementarnog ciljnoj sekvenci (prikazan na slici 5. svjetlo plavom bojom) i dijela koji hibridizira s tracrRNA (prikazan na slici 5. tamno plavom bojom). Molekula tracrRNA se sastoji od dijela koji hibridizira s molekulom crRNA i dijela koji se veže za protein Cas9. Kod sustava u kojem se koristi molekula sgRNA, molekule crRNA i tracrRNA su dio jedne duže molekule RNA spojene petljom. Prednost uporabe dvokomponentnog sustava je što je molekula tracrRNA ista za svaki eksperiment, dok se molekula crRNA treba prilagoditi ciljanoj sekvenci (IDT).



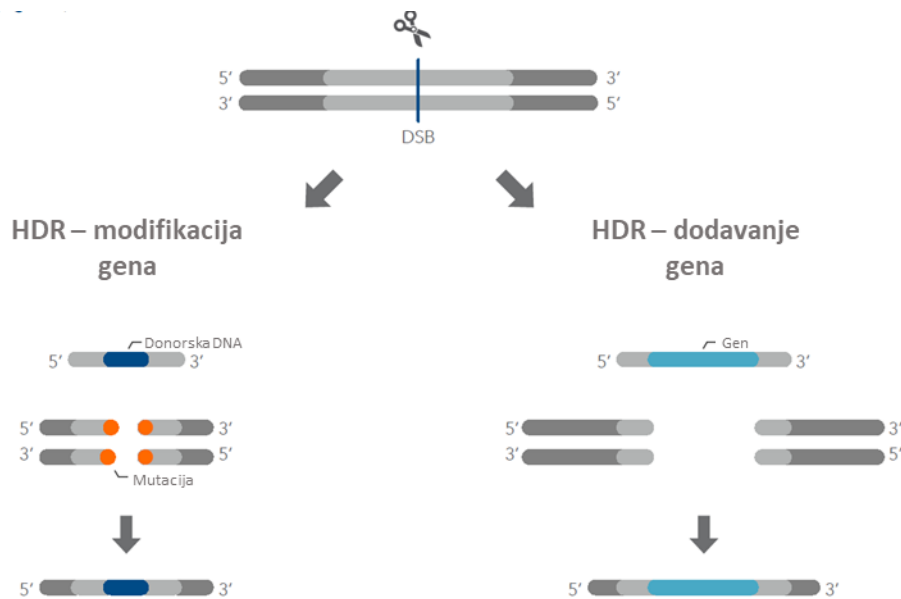
Slika 5. Usporedba sustava CRISPR/Cas9 s molekulom gRNA koja se sastoji od tracrRNA i crRNA (A) te molekulom sgRNA (B) (prema Integrated DNA Technologies, Inc)

Sustav CRISPR/Cas može se primjenjivati za disrupciju gena, a temelji se na nastanku dvolančanog loma izazvanog djelovanjem proteina Cas9 i potom popravkom ilegitimnom rekombinacijom. Nehomologno spajanje krajeva najčešće rezultira nastankom mutacija (male insercija, delecije i supstitucije baza) koje uzrokuju pomak okvira čitanja te posljedično inaktiviraju gen (slika 6., IDT).



Slika 6. Mogući ishodi popravka dvolančanog loma nehomolognim sparivanjem krajeva nakon djelovanja proteina Cas (prema Integrated DNA Technologies, Inc)

Osim za inaktivaciju gena, sustav CRISPR/Cas koristi se i za popravak mutacija u genima, zamjenu gena ili za stvaranje fuzioniranih proteina u staničnoj liniji (eng. *knock-in*). Ovakva primjena temelji se na popravku dvolančanog loma homolognom rekombinacijom (eng. *Homology Directed Repair*, HDR) pri čemu se kao homologna (donorska) DNA koristi linearni fragment unesen u stanicu transformacijom te pri popravku dvolančanog loma dolazi do uvođenja željene modifikacije (slika 7., IDT).



Slika 7. Mogući ishodi popravka dvolančanog loma homolognom rekombinacijom nakon djelovanja proteina Cas ukoliko se u stanice unese i linearni fragment DNA koji se koristi za popravak dvolančanog loma (*prema Integrated DNA Technologies, Inc*)

Danas se sustav CRISPR/Cas koristi i za mijenjanje ekspresije točno određenog gena upotrebom proteina koji nema endonukleaznu aktivnost, ali je fuzioniran s aktivatorom ili represorom ili za vizualizaciju određenog proces korištenjem sustava u kojem je protein Cas9 fuzioniran s fluorescentnim proteinom (Barrangou i Doudna, 2016).

3. MATERIJALI I METODE

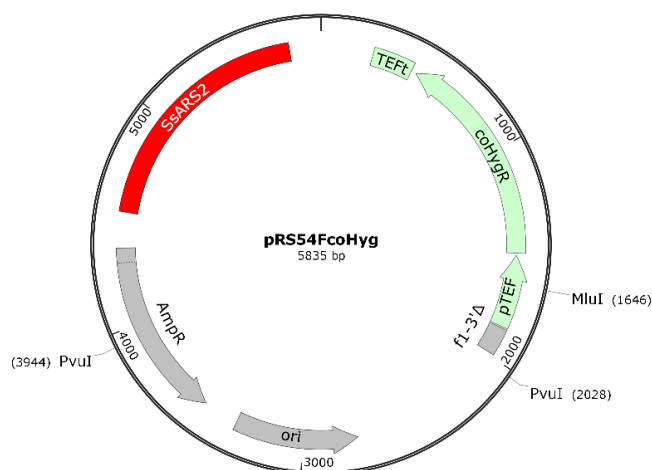
3.1. MATERIJALI

3.1.1. Plazmidi

U ovome radu korišteni su plazmidi pRS54FcoHyg i pMiniT2-SsURA3 i pMiniT2-SsUH koji sadrže bakterijsko ishodište replikacije *ori* te selektivni biljeg, gen *bla*, koji kodira za enzim β -laktamazu te je odgovoran za rezistenciju transformiranih stanica na antibiotik ampicilin.

3.1.1.1. Plazmid pRS54FcoHyg

Na slici 8. prikazan je replikativni plazmid pRS54FcoHyg, koji je prethodno konstruiran u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Matanović, usmeno priopćenje). Ovaj replikativni plazmid sadrži regiju *SsARS2*, koja omogućuje replikaciju plazmida u stanicama kvasca *Scheffersomyces stipitis* i kodon optimizirani gen *coHygR* (koji sadrži alternativni genetički kod) koji je odgovoran za rezistenciju transformiranih stanica na antibiotik higromicin.

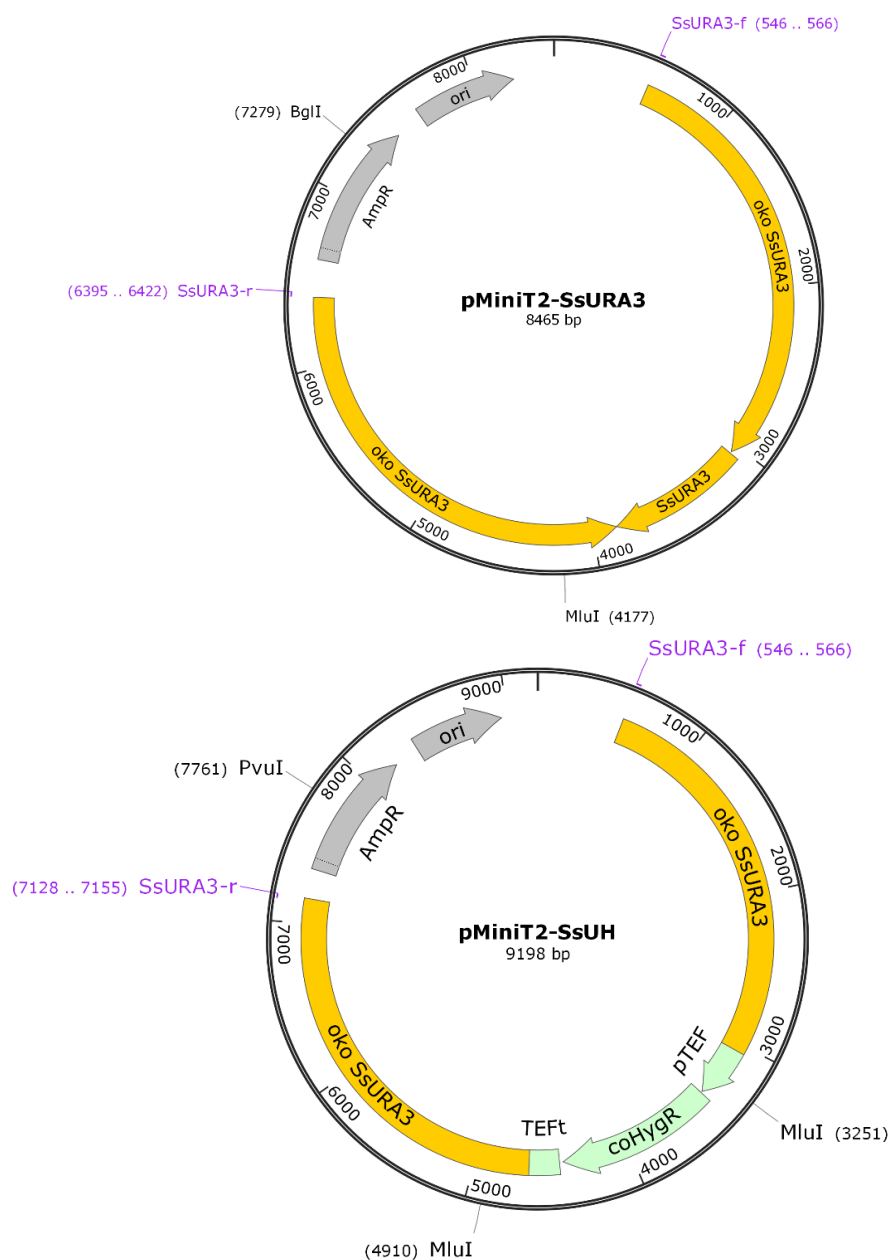


Slika 8. Mapa replikativnog plazmida pRS54FcoHyg s prikazanim regijama i restrikcijskim mjestima bitnim za ovaj rad

3.1.1.2. Plazmidi pMiniT2-SsURA3 i pMiniT2-SsUH

Integrativni plazmidi pMiniT2-SsURA3 i pMiniT2-SsUH (slika 9.) također su prethodno konstruirani u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama (Žunar,

usmeno priopćenje). Ovi plazmidi sadrže 2,5 kb uzvodno i nizvodno od otvorenog okvira čitanja *SsURA3* iz genoma kvasca *S. stipitis*. Dok plazmid pMiniT2-SsURA3 sadrži i otvoreni okvir čitanja gena *SsURA3*, u plazmidu pMiniT2-SsUH otvoreni okvir čitanja gena *SsURA3* zamijenjen je kodon optimiziranom regijom *coHygR* koja omogućuje transformiranim stanicama kvasca rast na podlozi s antibiotikom higromicinom. Ovisno o plazmidu koji se koristi kao kalup, korištenjem početnica SsURA3-f i SsURA3-r lančanom reakcijom polimerazom dobiva se fragment *SsURA3* (5876 pb) korišten za testiranje aktivnosti kompleksa RNP *in vitro* ili SsUH (6609 pb) koji se koristi za inaktivaciju gena *SsURA3* u genomu kvasca *S. stipitis* rekombinacijom krajevi-van.



Slika 9. Mape plazmida pMiniT2-SsURA3 i pMiniT2-SsUH s označenim regijama, restrikcijским mjestima i početnicama bitnim za ovaj rad

3.1.1.3. Oligonukleotidi

U ovome radu korištene su početnice: SsURA3-f (5'-CCACAGGTAAACAGCAAATG-3') i SsURA3-r (5'-CTGAGTTCTTATCTTTAGCTACAGAATT-3') za umnažanje fragmenata SsURA3 i SsUH, pri čemu su plazmidi pMiniT2-SsURA3 i pMiniT2-SsUH bili korišteni kao kalupi za lančanu reakciju polimerazom.

3.1.1.4. CRISPR/Cas9 ribonukleoproteinski kompleks (kompleks RNP)

U ovome radu korišteni su ribonukleoproteinski (RNP) kompleksi koji su dio Alt-R CRISPR-Cas9 sustava od IDT (Integrated DNA Technologies, Inc, Io, SAD) i sklopljeni su neposredno prije elektroporacije. Sustav se sastoji od tri komponente: specifične crRNA, univerzalne tracrRNA i nukleaze Cas9. Komplementarnim sparivanjem dijela regije crRNA i tracrRNA nastaje guide RNA (gRNA). Sekvencije specifičnih crRNA te imena guide RNA (gRNA) korištenih u ovom radu prikazane su u tablici 1. Sve tri specifične crRNA komplementarno se sparuju s regijama u otvorenom okviru čitanja gena *SsURA3*.

Tablica 1. Sekvencije specifičnih crRNA korištenih u ovom radu

crRNA	Sekvencija	gRNA
crRNA1	AltR1/rGrA rGrUrC rUrArC rArArG rArUrU rGrCrC rCrArA rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrCrU/AltR2	gRNA 1
crRNA2	AltR1/rGrA rGrUrC rUrArC rArArG rArUrU rGrCrC rCrArA rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR2/	gRNA 2
crRNA3	AltR1/rGrU rArGrA rUrGrA rArGrU rUrGrU rUrUrC rCrArC rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR/	gRNA 3

3.1.2. Mikroorganizmi

3.1.2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Za umnažanje dvolančanih plazmida korišten je soj bakterije *E. coli* DH5 α genotipa *F'endA1 hsdR17(rK-, mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NalR) relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)* (New Engand Biolabs, Ipswich, MA, SAD).

3.1.2.2. Kvasac *Scheffersomyces stipitis*

U ovome radu korišten je kvasac *S. stipitis* soj JCM 10742.

3.1.3. Hranjive podloge i otopine

3.1.3.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

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

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

Pripremljena podloga sterilizira se u autoklavu 20 minuta pri 121 °C i čuva pri sobnoj temperaturi. Kruta LB podloga se priprema dodatkom 15 g L⁻¹ agara prije autoklaviranja, a podloga s ampicilinom za selekciju transformanata dodatkom, 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 nakon sterilizacije i hlađenja.

3.1.3.2. Podloge za uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis*

Za uzgoj kvasca *Scheffersomyces stipitis* korištena je kompleksna (kompletna) podloga YPD:

Bacto pepton	20,0 g
Yeast extract	10,0 g
Glukoza	20,0 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Za pripremu krute podloge dodaje se 20 g L⁻¹ agara u tekući YPD nakon što se odmjeri odgovarajući volumen vode te se podloga sterilizira u autoklavu 20 minuta pri 121 °C i čuva pri sobnoj temperaturi.

Hranjive kompleksne YPD podloge s antibiotikom higromicinom pripremaju se dodatkom 900 µL L⁻¹ matične otopine antibiotika (BP2952-1MU, Fisher BioReagents), čija koncentracija iznosi 0,5 MU mL⁻¹, nakon sterilizacije i hlađenja podloge.

3.1.3.3. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

Amonijev acetat (8 M)

Otopina se priprema otapanjem 61,66 g amonijevog acetata u 100 mL destilirane vode.

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

Ampicilin (20 mg mL⁻¹)

Sterilizira se filtracijom i čuva pri 4 °C

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

18,61 g Na₂EDTA x 2 H₂O otopi se u 80 mL deionizirane vode, pH se podese dodatkom natrijevog hidroksida (približno 2 g peleta) i dopuni deioniziranom vodom do 100 mL.

Fenol

Redestilirani fenol otapa se pri 67 °C i zasićen je jednakim volumenom TE pufera pH 8,0. Ne sterilizira se i čuva se u tamnoj boci pri 4 °C.

Kloroform/izoamilni alkohol

Smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 24:1. Otopina se ne sterilizira i čuva se pri 4 °C.

Kalijev acetat (3 M; pH 4,8)

Otopina je 3 M u odnosu na kalij i 5 M u odnosu na acetat. Pripravljaju se tako da se u 60 mL 3 M otopine kalij acetata doda 11,5 mL ledene octene kiseline i 28,5 mL deionizirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

Natrijev acetat (3 M; pH 4,8)

24,6 g bezvodnog natrijevog acetata otopi se u deioniziranoj vodi, pH se podese ledenom octenom kiselinom i dopuni deioniziranom vodom do 100 mL. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri 4 °C.

NaOH/SDS

Natrijev hidroksid 0,2 mol L⁻¹

SDS 10,0 g L⁻¹

Otopina se ne sterilizira, a priprema se neposredno prije uporabe.

RNaza (10 mg/mL)

Ribonukleaza A se otopi u 10 mM Tris-Cl pH 7,5 i 15 mM natrijevom kloridu te zagrije 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon hlađenja do sobne temperature čuva se pri -20 °C.

TE pufer (pH 8,0 ili 7,4)

1 mol L ⁻¹ Tris-Cl pH 8,0 ili 7,4	10 mL
0,5 mol L ⁻¹ EDTA pH 8,0	2 mL
sterilna deionizirana voda	do 1000 mL

Priprema se iz sterilnih otopina.

Tris-HCl (1 M)

12,1 g Tris otopi se u 80 mL deionizirane vode, pH se do željene vrijednosti podese dodatkom koncentrirane kloridne kiseline i dopuni deioniziranom vodom do 100 mL.

Približne količine kiseline za pojedine pH vrijednosti su: pH 7,4 ~ 7,0 mL, pH 8,0 ~ 4,2 mL.

Sorbitol (1M)

18,2 g sorbitola se otopi u 50 mL deionizirane vode i dopuni do 100 mL. Otopina se sterilizira autoklaviranjem i čuva na sobnoj temperaturi.

SCE

sorbitol	182,72 g
natrij citrat dihidrat	33,50 g
EDTA dinatrijeva sol	45,00 g
sterilna deionizirana voda	do 1000 mL

Otopina se ne sterilizira.

STE

SDS	5,0 g
1 mol L ⁻¹ Tris-Cl pH 8,0	100 mL
0,05 mol L ⁻¹ EDTA pH 8,0	100 mL
sterilna deionizirana voda	do 1000 mL

Otopina se ne sterilizira.

Zimoliaza 20-T

15 mg enzima zimoliaze (Zymolyase 20-T) iz bakterije *Arthrobacter luteus* otopi se u 3 mL sterilnog glicerola koncentracije 400 mg mL⁻¹ i čuva pri -20 °C.

3.1.3.4. Otopine za transformaciju kvašćevih stanica

Sorbitol (1 M)

18,2 g sorbitola se otopi u 50 mL deionizirane vode i dopuni do 100 mL. Otopina se sterilizira autoklaviranjem i čuva na sobnoj temperaturi.

Litij acetat (1 M)

10,2 g litij acetata dihidrata se otopi u 70 mL deionizirane vode i dopuni do 100 mL. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva pri sobnoj temperaturi.

DTT/litij acetat

U sterilnim uvjetima se doda 3,5 mL 1 M DTT, 10 mL prethodno pripremljenog 1 M litij acetata te nadopuni sterilnom deioniziranom vodom do 100 mL.

3.1.3.5. Otopine za gel elektroforezu

Agarozni gel:

Priprema se otapanjem agaroze u TBE puferu (1,0 x) koji se priprema razrjeđivanjem 10 x TBE pufera. Koncentracija agaroze u gelu prilagođava se veličini fragmenata DNA koje želimo razdvojiti na gelu, a može iznositi od 7 do 20 g L⁻¹.

Boja za nanošenje uzoraka (6 x)

Bromfenol plavo	0,03 %
Ksilen cijanol FF	0,03 %
Glicerol	60 %
SDS	1 %
100 mmol L ⁻¹ EDTA pH 8,0	

Otopina se čuva pri 4 °C.

Etidij – bromid

Matična otopina priprema se u koncentraciji od 10 mg mL⁻¹, nije ju potrebno sterilizirati i čuva se također pri 4 °C u tamnoj boci. Otopina koja se koristi za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL matične otopine u jednu litru deionizirane vode i čuva se u tamnoj boci.

TBE pufer (10 x)

Tris	108,0 g L ⁻¹
Borna kiselina	55,0 g L ⁻¹
0,5 M EDTA pH 8,0	40,0 mL L ⁻¹

3.1.3.6. Otopine za hibridizaciju DNA po Southern-u

Navedene otopine ne moraju biti sterilne.

Amonijev acetat (1 M)

Priprema se razrjeđivanjem 8 mol L⁻¹ amonij acetata.

HCl (0,25 M)

Priprema se razrjeđivanjem koncentrirane kloridne kiseline (22 mL L⁻¹).

DNA-nosač (nespecifična DNA)

DNA sperme haringe otopljena u TE-puferu pH 8,0 u koncentraciji od 20 mg mL⁻¹.
Čuva se pri -20 °C.

Natrijev hidroksid (0,4 M)

18,2 g natrij hidroksida otopi se u deioniziranoj vodi i dopuni vodom do 100 mL.

Natrijev hidroksid/amonijev acetat

0,5 mol L⁻¹ natrijev hidroksid

1 mol L⁻¹ amonijev acetat.

Otopina A

SSC (20 x)	10,0 mL
10 % SDS	1,0 mL
deionizirana voda	89,0 mL

Otopina B

SSC (20 x)	0,5 mL
10 % SDS	1,0 mL
deionizirana voda	98,5 mL

Otopina za predhibridizaciju - za 100 mL otopine

SSC (20x)	25,0 mL
smjesa za sprječavanje nespecifičnih interakcija (engl. <i>blocking reagent</i>)	1,0 g
10 % natrijeva sol N-lauroil sarkozina	1,0 mL
10 % SDS	200 μ L

Otopina za hibridizaciju

Ima isti sastav kao otopina za predhibridizaciju samo što sadrži i 20-50 ng mL⁻¹ obilježene DNA (DNA-sonde) te 0,1 mg mL⁻¹ nespecifične DNA (DNA nosača).

Pufer 1

0,1 mol L ⁻¹ Tris-HCl pH 7,5
0,15 mol L ⁻¹ natrijev klorid

Pufer 2

Priprema se otapanjem smjese za sprječavanje nespecifičnih reakcija (engl. *blocking reagent*) u puferu 1 do koncentracije od 10 g L⁻¹

Pufer 3

1 mol L ⁻¹ Tris pH 9,7	50,0 mL
5 mol L ⁻¹ natrijev klorid	10,0 mL
1 mol L ⁻¹ magnezijev klorid	25,0 mL
pH 9,5 se podesi dodatkom HCl i dopuni deioniziranom vodom do 500,0 mL.	

Otopina za detekciju

Pufer 3	10 mL
x-fosfat	35 μ L
NBT	45 μ L

SSC (20 x)

natrijev klorid	175,35 g
natrijev citrat dihidrat	88,20 g
sterilna deionizirana voda	do 1000 mL

3.1.4. Kemikalije, enzimi, membrane

Tablica 2. Ostale kemikalije korištene u ovom radu

Kemikalije, enzimi i membrane	Proizvođač
Agaroz	<i>Appligene</i> , Illkirch, Francuska
Apsolutni etanol	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Bromtimol plavo (BTP)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
EDTA	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA, te odgovarajući pufferi	<i>New Engand Biolabs</i> , Ipswich, MA, SAD <i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, IN, SAD
Etidij bromid	<i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, IN, SAD
Izopropanol	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
Kemikalije za pripremu podloga	<i>Difco</i> , Detroit, SAD <i>Merck</i> , Darmstadt, Njemačka <i>Fluka</i> , Buchs, Švicarska
Kemikalije za pripremu ostalih otopina	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska <i>Alkaloid</i> , Skoplje, Makedonija
Membrane (najlonske, pozitivno nabijene) i komplet kemikalija za hibridizaciju DNA po Southern-u	<i>Roche Applied Science</i> , Indianapolis, IN, SAD
Natrijev acetat	<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska
PEG	<i>Fluka</i> , Buchs, Švicarska
Ribonukleaza A	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
Sorbitol	<i>Barr</i> , Zagreb, Hrvatska
Tris	<i>Sigma-Aldrich</i> , Buchs, Švicarska
Zimoliza (Zymolyaze 20-T)	<i>Seikugaku Kogyo Co.</i> , Tokyo, Japan

3.2. METODE

3.2.1. Metode za izolaciju i pročišćavanje DNA

3.2.1.1. Taloženje DNA amonij acetatom i etanolom

Najčešće korišten postupak taloženja DNA je pomoću amonij acetata i etanola, a provodi se tako da se volumenu DNA doda 1/3 volumena 8 M amonij acetata i 8/3 volumena

96 % etanola. Smjesa se potom inkubira najmanje 2 sata pri -20 °C, a talog DNA dobiva se centrifugiranjem 20 minuta na 11000 okretaja u minuti pri 4 °C.

3.2.1.2. Pročišćavanje DNA smjesom fenol/kloroform/izoamilni alkohol

Otopini DNA doda se jednaki volumen smjese fenol/kloroform/izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1. Smjesa se snažno promiješa te se centrifugira 2 minute na 11000 okretaja po minuti. Nakon centrifugiranja dolazi do odvajanja faza te se gornja faza pažljivo prenese u novu kivetu i ovaj korak se ponavlja sve dok je vidljiv proteinski talog nakon centrifugiranja koji se nalazi između gornje i donje faze. Kada je sav proteinski talog uklonjen, gornja faza se prenosi u novu kivetu te se dodaje jednaki volumen smjese kloroform/izoamilni alkohol kako bi se uklonio zaostali fenol. Smjesa se snažno promiješa te se centrifugira 2 minute na 11000 okretaja po minuti, a gornja faza se prenosi u novu kivetu.

3.2.1.3. Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena

Izolacija dvolančanog plazmida iz velikog volumena provedena je postupkom alkalne lize uz manje promjene. 500 mL prekonoćne kulture *Escherichia coli* centrifugirano je 10 minuta na 5000 okretaja po minuti kako bi se stanice istaložile. Dobiveni talog resuspendiran je u 5 mL TE pufera i ostavljen 5 minuta na ledu. Lizozim se dodaje sterilnim nastavkom te se suspenzija promiješa blagim okretanjem i inkubira 10 minuta na ledu. Potom se suspenziji dodaje 10 mL otopine natrijev hidroksid/SDS, otopina se promiješa blagim okretanjem te ponovno inkubira na ledu 10 minuta.

Nakon inkubacije, dodaje se 7,5 mL natrijevog acetata (3 M; pH 4,8) te se smjesa promiješa i inkubira 15 minuta na -20 °C. Sljedeći korak uključuje centrifugiranje 20 minuta na 6000 okretaja po minuti te se nakon supernatant prebaci u novu kivetu i slijedi ponovno centrifugiranje pri istim uvjetima (ovaj korak ponavlja se dva puta). Dobiveni bistri supernatant prebaci se u novu kivetu, određuje mu se volumen te se dodaje 0,6 V izopropanola i smjesa se ostavlja 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do taloženja DNA. Slijedi centrifugiranje suspenzije 30 minuta na 10000 okretaja po minuti nakon kojeg se supernatant baca, a talog dodatno suši vakuum sisaljkom. Posušeni talog otapa se u 400 µL TE pufera te slijedi fenolizacija (poglavlje 3.2.1.2.). Plazmidna DNA taložena je amonij acetatom i etanolom, a sam postupak opisan je u poglavlju 3.2.1.1. i otopljen u 50 – 100 µL TE pufera uz dodatak RNaze. Pomoću gel elektroforeze dobivenih uzoraka, provjerava se uspješnost izolacije plazmida.

3.2.1.4. Izolacija kvaščeve DNA iz stanica uzgojenih u tekućoj podlozi

3 mL kulture kvasca uzgoji se do stacionarne faze rasta te se centrifugira 3 minuta na 4000 okretaja po minuti. Nakon centrifugiranja, dobiveni talog stanica se resuspendira u 1 mL deionizirane vode, a postupak centrifugiranja se ponovi. Potom se talog stanica resuspendira u 1 mL SCE, ponavlja se centrifugiranje te se dobiveni talog otopi u 130 μ L SCE (ukupni volumen 200 μ L). Suspenziji se doda 20 μ L zimolijaze 20-T te slijedi inkubacija 20 minuta u vodenoj kupelji pri 70 °C. Nakon toga, uzorci se hlade na ledu 10 minuta uz dodatak 200 μ L kalijevog acetata (5 M; pH 4,8) kako bi se istaložili proteini. Tako pripremljeni uzorci se ostave na ledu u hladnjaku 2 sata ili preko noći.

Slijedi centrifugiranje 30 minuta na 10000 okretaja po minuti te se 970 μ L supernatanta prenese u novu kivetu uz dodatak 630 μ L izopropanola. Suspenzija se lagano pomiješa okretanjem i centrifugira 20 minuta na 10000 okretaja po minuti pri 4 °C. Supernatant se baca, a talog DNA se osuši vakuum sisaljkom i otopi u 300 μ L TE-pufera pH 8,0. Slijedi inkubacija 20 minuta u vodenoj kupelji pri 70 °C te taloženje amonijevim acetatom (8 M) i etanolom (poglavlje 3.2.1.1.). Uzorci se čuvaju na -20 °C 2 sata. Centrifugiranjem uzoraka 20 minuta na 11000 okretaja po minuti pri 4 °C dobije se talog DNA koji se otapa u 50 μ L TE-pufera i doda mu se 0,5 μ L RNaze da bi se razgradila prisutna RNA.

3.2.1.5. Izolacija DNA iz gela

Izolacija DNA iz gela provedena je prema uputama proizvođača komercijalnog seta kemikalija (New England Biolabs Ipswich, MA, SAD).

3.2.2. Cijepanje i modifikacija DNA

Cijepanje i modifikacija DNA provedeni su prema uputama proizvođača restrikcijskih i modifikacijskih enzima (New England Biolabs Ipswich, MA, SAD; Roche Applied Science Indianapolis, IN, SAD).

3.2.3. Priprema crRNA/tracRNA/Cas9 ribonukleoproteinskog (RNP) kompleksa

Ribonukleoproteinski (RNP) kompleksi korišteni u ovom radu dio su Alt-R CRISPR-Cas9 sustava od IDT (Integrated DNA Technologies, Inc, Io, SAD) i sklopljeni su neposredno prije elektroporacije. Kompleksi RNP pripremljeni su prema uputstvima IDT (Integrated DNA

Technologies, Inc) i modificirani prema protokolima za rad sa stanicama kvasca opisanim u Varela i sur. (2020) i Grahl i sur. (2017).

Specifična crRNA i univerzalna tracrRNA su otopljene u puferu IDT duplex do konačne koncentracije od 100 μM i čuvane su na $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Za sklapanje guide RNA (gRNA) korištene su ekvimolarne koncentracije crRNA i tracrRNA koje su razrijeđene u puferu IDT duplex do finalne koncentracije od 4 μM (po uzorku za transformaciju potrebno je 3,6 μL) i inkubirane su na $95\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 5 min i ostavljene na sobnoj temperaturi kroz 15 minuta kako bi se omogućilo komplementarno sparivanje crRNA i tracrRNA čime se formira guide RNA (gRNA). Alt-R S.p. Cas9 nukleaza (60 μM) neposredno prije upotrebe razrijeđena je do finalne koncentracije od 4 μM u sterilnoj deioniziranoj vodi (po uzorku se koristi koristi 3 μL).

Nakon što je sklopljena i ostavljena da se ohladi na sobnu temperaturu, gRNA pomiješana je s razrijeđenom nukleazom Cas9 (4 μM) u 1,2:1 odnosu (3,6 μL gRNA i 3 μL nukleaze Cas9) i inkubirana na sobnoj temperaturi minimalno 5 minuta, nakon čega je korišteno 6,6 μL kompleksa RNP po uzorku pri transformaciji.

3.2.3.1. Provjera aktivnosti kompleksa RNP in vitro

Nakon što su kompleksi RNP1, RNP2 i RNP3 pripremljeni prema uputama opisanim u poglavlju 3.2.3., 1 μL svakog kompleksa RNP pomiješan je s fragmentom DNA koji sadrži regiju *SsURA3*, umnoženu lančanom reakcijom polimerazom, i inkubiran 60 min na $37\text{ }^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije, uzorci koji sadrže ciljnu regiju i komplekse RNP inaktivirani su inkubacijom na $65\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 10 minuta. Uspješnost *in vitro* cijepanja ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP koji sadrži Cas9 provjerena je gel elektroforezom.

3.2.4. Lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction* - PCR)

Metodom lančane reakcije pomoću Q5 polimeraze i pomoću početnica *SsURA3-f* i *SsURA3-r*, umnožene su regija *SsURA3* i disrupcijska kazeta *SsUH*, a plazmidi *pMiniT2-SsURA3* i *pMiniT2-SsUH* su korišteni kao kalup nakon linearizacije i izolacije iz gela. Reakcijska smjesa složena je prema uputama proizvođača (New Engand Biolabs Ipswich, MA, SAD), a uvjeti pri kojima se PCR provodio navedeni su u tablici 3. Nakon provedene lančane reakcije polimerazom uspješnost reakcije provjerena je gel elektroforezom.

Tablica 3. Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom

Korak	Temperatura	Trajanje	
Početna denaturacija	95 °C	30 sekundi	
Denaturacija	95 °C	10 sekundi	
Komplementarno sparivanje početnica	63 °C	10 sekundi	ponovljeno 29 puta
Sinteza DNA	72 °C	4 minute	
Završna sinteza	72 °C	5 minuta	
Hlađenje	22 °C	2 minute	

3.2.5. Transformacija kvašćevih stanica elektroporacijom

Za transformaciju stanica kvasca elektroporacijom korišten je prilagođeni protokol za transformaciju kvasca *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* (Miklenić i sur., 2015). Kolonija kvasca *Scheffersomyces stipitis* porasla na krutoj podlozi, nacijepi se u 200 mL kompletne kompleksne tekuće YPD podloge i stavi se na inkubaciju na tresilici pri 28 °C do koncentracije stanica od $6,5 \cdot 10^7$ st mL⁻¹ kako je preporučeno za srodni kvasac *Pichia pastoris* (protokol za elektroporaciju pri korištenju uređaja Bio-Rad MicroPulser, Bio-Rad)

Suspenzija stanica prebaci se u kivete i centrifugira 4 minute na 4000 okretaja po minuti. Supernatant se baci, a talog stanica resuspendira u sterilnoj deioniziranoj vodi i slijedi centrifugiranje 4 minute na 4000 okretaja po minuti. Ovaj korak ponavlja se dva puta te se nakon zadnjeg centrifugiranja talog resuspendira u 35 mL DTT/LiAc otopine. Slijedi inkubacija 45 minuta 28 °C na tresilici pri 80 okretaja u minuti. Nakon inkubacije, uzorak se centrifugira 4 minute na 4000 okretaja po minuti pri 4 °C. Talog se resuspendira u hladnoj, sterilnoj, deioniziranoj vodi te ponovi centrifugiranje. Slijedi resuspendiranje taloga u hladnom sorbitolu (1 M) te centrifugiranje 4 minute na 4000 okretaja po minuti pri 4 °C (ovaj korak ponavlja se dva puta). 50 µL suspenzije stanica prenese se u kivete i doda se 0,5 µL DNA, resuspendira se i ostavi 5 minuta na ledu.

Kiveta sa smjesom stanica i DNA stavi se u elektroporator i podvrgne pulsu električne energije. Potom se stanicama u što kraćem roku doda 1 mL smjese YPD/sorbitol, uzorci se ostave 20 minuta na sobnoj temperaturi te im se doda još 1 mL YPD tekuće podloge. Slijedi inkubacija minimalno 3 sata pri 28 °C na tresilici pri 180 okretaja u minuti.

Nakon inkubacije stanice se centrifugiraju, a talog resuspendira u sterilnoj deioniziranoj vodi te se nacjepljuju na selektivne podloge i inkubiraju 2 dana pri 28 °C.

3.2.6. Gel elektroforeza

Agarozni gel opisan u poglavlju 3.1.3.5. otapa se i hladi na oko 60 °C te izlijeva u nosač gela na koji je postavljen češalj za formiranje jažica. Kada se gel skrutne, češalj se izvadi, a nosač gela s gelom postavlja se u kadicu za elektroforezu koja je napunjena TBE puferom (1 x) tako da sloj pufera iznad gela bude debeo oko 1 mm. Uzorci DNA pomiješaju se s bojom za nanošenje uzoraka u odnosu 6:1 i unesu pipetom u jažice na gelu. Elektroforeza se u korištenim kadicama najčešće provodi pri naponu do 70 V u vremenu od 1 do 3 sata ovisno o koncentraciji agaroze i veličini fragmenata DNA koji se analiziraju. U ovom slučaju korišten je 0,8 %-tni agarozni gel i TBE pufer. Rezultat provedene elektroforeze, odnosno razdvojeni fragmenti DNA, vizualiziraju se namakanjem gela u otopini etidij-bromida 15 do 20 minuta te izlaganju ultraljubičastom (UV) svjetlu. Gel se fotografira kroz crveni filter.

3.2.7. Hibridizacija DNA po Southern-u

Hibridizacija DNA po Southern-u (eng. *Southern Blotting*) služi za detekciju određenih DNA sekvenci u uzorku. Temelji se na specifičnom sparivanju (hibridizaciji) neradioaktivno obilježene DNA sonde s komplementarnom sekvencom, a sam postupak uključuje gel elektroforezu DNA, prijenos DNA iz gela na membranu, hibridizaciju s probom te detekciju komplementarno sparene probe. Kemikalije korištene u ovom postupku nabavljene su od proizvođača Roche, Švicarska i korištene prema uputama, uz manje modifikacije.

Izolira se DNA iz stanica kvasca uzgojenih do stacionarne faze rasta (poglavlje 3.2.1.4.) te se pocijepa odgovarajućim restrikcijskim enzimima (poglavlje 3.2.2.). Sljedeći korak je gel elektroforeza uzoraka (poglavlje 3.2.4.) nakon koje se gel ispire u alkalnoj otopini koja uzrokuje fragmentiranje (depurinaciju) DNA te se DNA s gela prenosi na membranu (poglavlje 3.2.5.2.). Prijenos se vrši pomoću uređaja za prijenos 90 minuta vakuumom uz podtlak od 15 kPa. Fragmenti DNA ostaju fiksirani na membrani na poziciji koja odgovara onoj na gelu zahvaljujući pozitivnom naboja najlonske membrane. Membrana se potom ispire, DNA se dodatno fiksira na temperaturi od 130 °C 30 minuta i inkubira u predhibridizacijskoj otopini (3.2.5.3.) koja zasićuje membranu te sprječava nespecifično vezanje probe na membranu. Potom se membrana ispire u hibridizacijskoj otopini koja sadrži sve komponente kao i

prehibridizacijska otopina uz dodatak sonde sa digoksigeninom obilježenim deoksiuridin-trifosfatom (DIG-dUTP).

Zadnji korak je detekcija (poglavlje 3.2.5.4.) u kojoj se na sondu veže antitijelo antiDIG-fosfataza, a reakcija se inducira dodatkom susprata 5-bromo-4-kloro-3'-indolil fosfat i indikatora (NBT) koji daje ljubičasto obojenje.

3.2.7.1. Priprema DNA sonde

DNA sonde korištene u ovom radu pripremljene su metodom nasumičnog započinjanja sinteze DNA (eng. *Random priming*). Kao proba za hibridizaciju uzoraka korištena je digoksigeninom (Roche, Švicarska) obilježena proba *coHyg* koja hibridizira s genom *coHygR*, a obilježene DNA bakteriofaga λ i 1 kb marker (NEB) korištene su kao standardi za određivanje veličine fragmenata.

3.2.7.2. Prijenos DNA na membranu

Prijenos DNA slijedi nakon gel elektroforeze i vizualizacije DNA na gelu, a provodi se prvo inkubacijom gela 30 minuta u kloridnoj kiselini (0,25 M) te se nakon kratkog ispiranja u destiliranoj vodi gel inkubira 25 do 30 minuta u otopini natrijevog hidroksida (0,4 M) / amonijevog acetata (1 M). Postupak traje 1,5 sat, a provodi se u uređaju za prijenos vakuumom (Pharmacia Biotech) uz podtlak od 15 kPa pri čemu je gel stavljen na membranu i uronjen u 0,4 M natrijev hidroksid. Po završetku postupka, membrana se drži 15 minuta u amonijevom acetatu (1 M) te se 20 minuta inkubira pri 120 °C.

3.2.7.3. Predhibridizacija i hibridizacija

Predhibridizacija (inkubacija membrane) provodi se u zataljenoj plastičnoj vrećici koja sadrži oko 0,5 mL otopine za predhibridizaciju po 1 cm² membrane u trajanju od 2 do 3 sata pri 70 °C uz lagano tresenje. Potom slijedi hibridizacija, otopina za predhibridizaciju zamijeni se s oko 5 do 10 puta manjim volumenom otopine za hibridizaciju te se hibridizacija provodi preko noći (18 h) u istim uvjetima kao i predhibridizacija. Nakon završenih postupaka, membrana se ispiru otopinom A pri sobnoj temperaturi uz lagano tresenje dva puta po 5 minuta te otopinom B pri temperaturi od 70 °C još dva puta 20 do 30 minuta.

3.2.7.4. Detekcija

Kako bi došlo do detekcije željenih DNA sekvenci na membrani, membrana se kratko ispiru u puferu 1 potom 1 sat u puferu 2 te 30 minuta u puferu 2 koji sadrži 3 μL kompleksa antitijela i alkalne fosfataze. Potom slijedi ispiranje membrane dva puta po 15 minuta u puferu 1 te kratko ispiranje u puferu 3. Membrana se zatvori u plastičnu vrećicu s otopinom za detekciju koja sadrži 10 mL pufera 3 uz dodatak 35 μL x-fosfata (5-bromo-4-kloro-indolil-fosfat) i 45 μL NBT-a (nitrozo-plavi-tetrazolij) te slijedi inkubacija membrane u mraku pri 37 °C do pojave tamno obojenih vrpca (20 minuta do 24 sata). Detekcija se završava ispiranjem membrane velikom količinom deionizirane vode te sušenjem membrane na zraku.

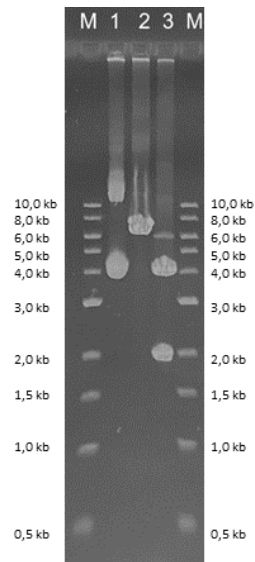
4. REZULTATI I RASPRAVA

Kvasac *Scheffersomyces stipitis* biotehnoški je zanimljiv organizam zbog poželjnih karakteristika, naročito radi izravne razgradnje ksiloze čime se razlikuje od većine ostalih kvasaca koji ne mogu direktno fermentirati pentoze. Glavni problemi koji onemogućuju širu primjenu kvasca *S. stipitis* su relativno niska uspješnost transformacije replikativnim vektorima (Cao i sur., 2018) i niska efikasnost uvođenja ciljanih genetičkih promjena zbog nasumične ugradnje transformirajuće DNA ilegitimnom rekombinacijom (Chen i sur., 2013). Cilj ovog rada bio je modificirati protokol za elektroporaciju nekonvencionalnog kvasca *S. stipitis*, kako bi se postizala viša efikasnost transformacije od literaturnih navoda i odrediti uspješnost genskog ciljanja rekombinacijom krajevi-van.

U prvom dijelu ovog rada provjerene su strukture prethodno konstruiranih plazmida pRS54FcoHyg, pMiniT2-SsURA3 i pMiniT2-SsUH (poglavlje 4.1.). Uvjeti koji povećavaju efikasnost elektroporacije kvasca *S. stipitis* određeni su transformacijom s replikativnim plazmidom pRS54FcoHyg, a transformanti su selekcionirani na kompletnoj kompleksnoj podlozi s antibiotikom higromicinom (poglavlje 4.2.). Koristeći uvjete za koje je utvrđeno da omogućuju najvišu efikasnost transformacije, određena je i uspješnost genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis*. Očekivani ishod nakon uspješnog genskog ciljanja je zamjena otvorenog okvira čitanja gena *SsURA3*, regijom *coHygR* koja se nalazi disrupcijskoj kazeti SsUH (poglavlje 4.3.). S obzirom na određenu izrazito nisku uspješnost genskog ciljanja analizirana je i potencijalna primjena sustava CRISPR/Cas9 za povećanje uspješnosti genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis* (poglavlje 4.4.).

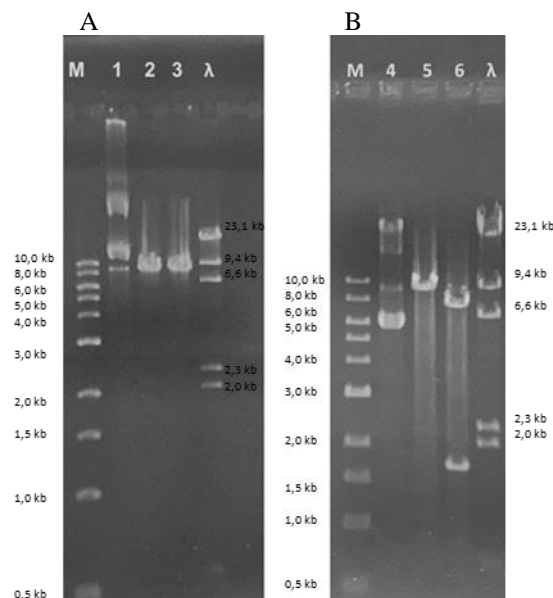
4.1. PROVJERA STRUKTURE PLAZMIDA pRS54FcoHyg, pMiniT2-SsURA3 i pMiniT2-SsUH

Plazmidi pRS54FcoHyg, pMiniT2-SsURA3 i pMiniT2-SsUH konstruirani su prethodno te je njihova struktura potvrđena restrikcijskom analizom (slike 10. i 11.).



Slika 10. Rezultati restrikcijske analize plazmida pRS54FcoHyg. M – DNA standard, 1 kb NEB, 1 – kružni plazmid, 2 – plazmid pocijepan enzimom MluI, 3 – plazmid pocijepan enzimom PvuI

U jažici 1 nalazi se nepocijepani plazmid te su vidljive dvije vrpce koje odgovaraju različitim konformacijama kružnog plazmida. U jažici 2 nalazi se plazmid pocijepan restrikcijskom endonukleazom MluI, koja cijepa na jednom mjestu u plazmidu, te je na gelu vidljiva jedna vrpca očekivane veličine od 5,8 kb. Restrikcijska endonukleza PvuI cijepa plazmid na dva mjesta pri čemu nastaju fragmenti veličine 3,9 i 1,9 kb koji su vidljivi u jažici 3 čime je potvrđena struktura plazmida pRS54FcoHyg.



Slika 11. Rezultati restrikcijske analize plazmida pMiniT2-SsURA3 (A) i pMiniT2-SsUH (B). M – DNA standard, 1 kb NEB, 1 – kružni plazmid pMiniT2-SsURA3, 2 – plazmid pMiniT2-SsURA3 pocijepan enzimom BglI, 3 – plazmid pMiniT2-SsURA3 pocijepan enzimom MluI, 4 – kružni plazmid pMiniT2-SsUH, 5 – plazmid pMiniT2-SsUH pocijepan enzimom PvuI, 6 – plazmid pMiniT2-SsUH pocijepan enzimom MluI

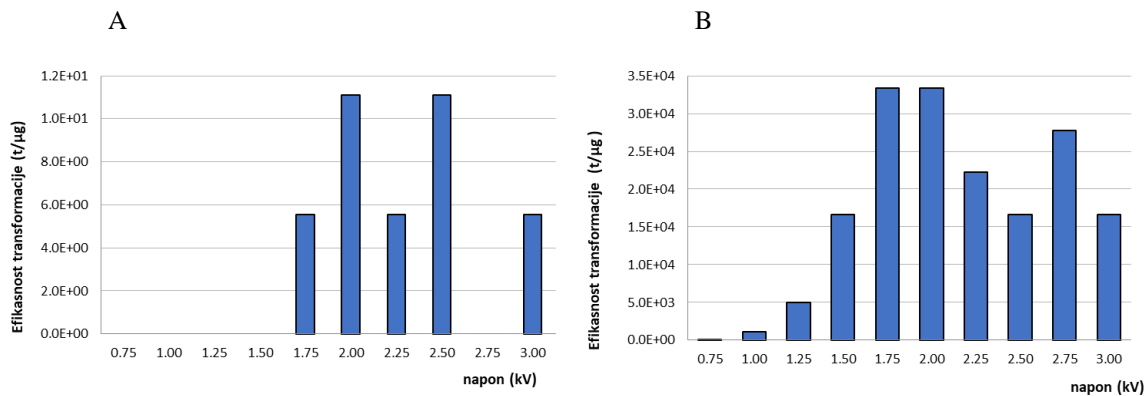
Restriksijski enzimi BglI i MluI cijepaju plazmid pMiniT2-SsURA3 na jednom mjestu te su na gelu vidljive vrpce veličine 8,5 kb (jažice 2 i 3), čime je potvrđena struktura plazmida pMiniT2-SsURA3.

Restriksijski enzim PvuI cijepa plazmid pMiniT2-SsUH na jednom mjestu te je na gelu vidljiva vrpca veličine 9,2 kb (jažica 5), a cijepanjem enzimom MluI nastaju fragmenti veličina 7,5 kb i 1,7 kb (jažica 6) čime je potvrđena i struktura plazmida pMiniT2-SsUH.

4.2. OPTIMIZACIJA POSTUPKA TRANSFORMACIJE KVASCA *Scheffersomyces stipitis* ELEKTROPORACIJOM

Kako bi se odredili uvjeti koji omogućuju višu efikasnost transformacije kvasca *S. stipitis* elektroporacijom, kao osnovni protokol korišten je postupak za elektroporaciju kvasca *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* (Miklenić i sur., 2015) te je analiziran utjecaj promjene uvjeta elektroporacije koji su sugerirani od proizvođača sustava za elektroporaciju (Bio-Rad Gene Pulsar Xcell electroporation manual) i te od Cao i suradnika (2018). U svim eksperimentima transformacije korišten je replikativni plazmid pRS54FcoHyg koji sadrži ishodište replikacije iz kvasca *S. stipitis* i gen *coHygR* koji transformiranim stanicama omogućuje rezistenciju na antibiotik higromicin. Upotreba plazmida pRS54FcoHyg omogućila je usporedbu utjecaja različitih uvjeta elektroporacije na efikasnost transformacije.

Prva transformacija provedena je pri različitim vrijednostima napona, korišteno je 180 ng replikativnog plazmida pRS54FcoHyg, a postupak je opisan je u poglavlju 3.2.4. Za određivanje optimalnih vrijednosti napona korišten je aparat Bio-Rad MicroPulser, eksperiment je ponovljen dva puta, a rezultati su prikazani na slici 12. Prilikom provođenja drugog eksperimenta (slika 12.B.) efikasnost transformacije je porasla u odnosu na prvi eksperiment (slika 12.A.).

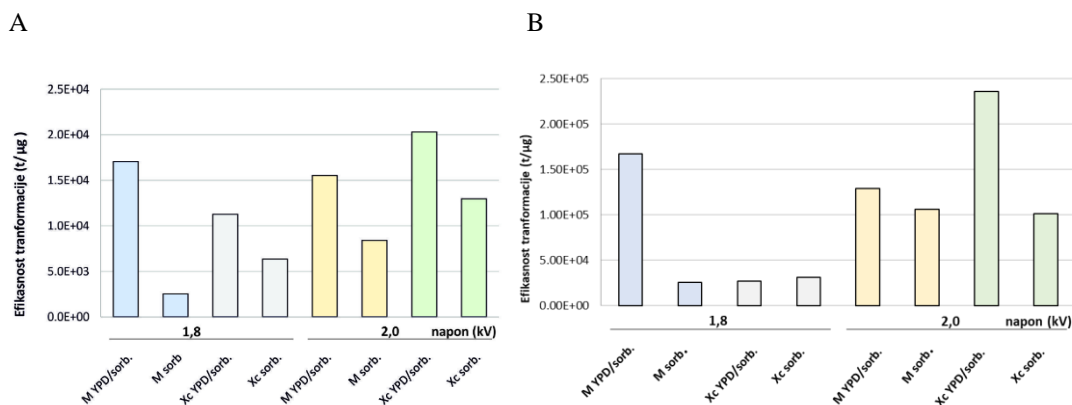


Slika 12. Ovisnost efikasnosti transformacije kvasca *S. stipitis* o naponu pri elektroporacijskom pulsu

Poput većine nekonvencionalnih kvasaca *S. stipitis* ima nisku efikasnost transformacije zbog čega su Cao i suradnici (2018) analizirali utjecaj napona na efikasnost elektroporacije i kao optimalan napon pri pulsu preporučili 2,5 kV. Međutim, prilikom izrade ovog rada stanice su transformirane dva puta koristeći raspon napona prikazan na slici 12. te je najviša efikasnost transformacije postizana pri 2,0 i 2,5 kV u prvom eksperimentu (slika 12.A.), a u drugom eksperimentu u kojem je došlo do porasta efikasnosti transformacije pri 1,75 i 2,0 kV (slika 12.B.). Vrijednosti od 1,75 kV i 2,0 kV odgovaraju upravo onima koje su preporučene u uputstvima za upotrebu uređaja Bio-Rad Gene Pulser Xcell Electroporation System za transformaciju kvasca *Pichia pastoris*, srodnog kvascu *S. stipitis* te su korištene u daljnjim transformacijama. Razlika u optimalnim vrijednostima napona pri elektroporacijskom pulsu, dobivenih u ovom istraživanju, u odnosu na one od Cao i suradnika (2018), mogla bi biti posljedica korištenja različitog uređaja za elektroporaciju i različitog tipa električnog pulsa. Naime, prilikom izrade ovog rada korišteni su Bio-Rad MicroPulser i Bio-Rad Gene Pulser Xcell Electroporation System te je korišten električni puls s eksponencijalnim padom napona (eng. *exponential decay*), dok ovaj podatak Cao i sur. (2018) nisu naveli. Temeljem rezultata prikazanih na slici 12, zaključeno je da su optimalne vrijednosti napona 1,75 kV i 2,0 kV te je daljnja optimizacija protokola za elektroporaciju napravljena upravo pri tim vrijednostima.

Prema protokolu za transformaciju kvašćevih stanica (poglavlje 3.2.4) nakon električnog pulsa stanicama se dodaje smjesa YPD i sorbitola (Miklenić i sur., 2015), no u protokolu za elektroporaciju srodnog kvasca *P. pastoris*, pomoću uređaja Bio-Rad MicroPulser sugerirana je upotreba 1 M sorbitola. Zbog toga, ispitana je razlika u efikasnosti transformacije nakon upotrebe sorbitola i smjese podloge YPD i sorbitola te je dodatno analiziran i utjecaj korištenja dva različita uređaja proizvođača Bio-Rad (Bio-Rad MicroPulser i Bio-Rad Gene Pulser Xcell Electroporation System). Oba uređaja za elektroporaciju redovito se koriste u laboratoriju i oba

imaju eksponencijalni pad napona pri električnom pulsu, no napredniji uređaj Gene Pulser Xcell omogućuje ručno podešavanje većeg broja parametara za elektroporaciju i veći raspon napona pri elektroporaciji. Transformacija je također provedena sa 180 ng replikativnog plazmida pRS54FcoHyg, eksperiment je ponovljen dva puta, a na slici 13. prikazani su rezultati prvog (slika 13.A.) i drugog (slika 13.B.) eksperimenta.



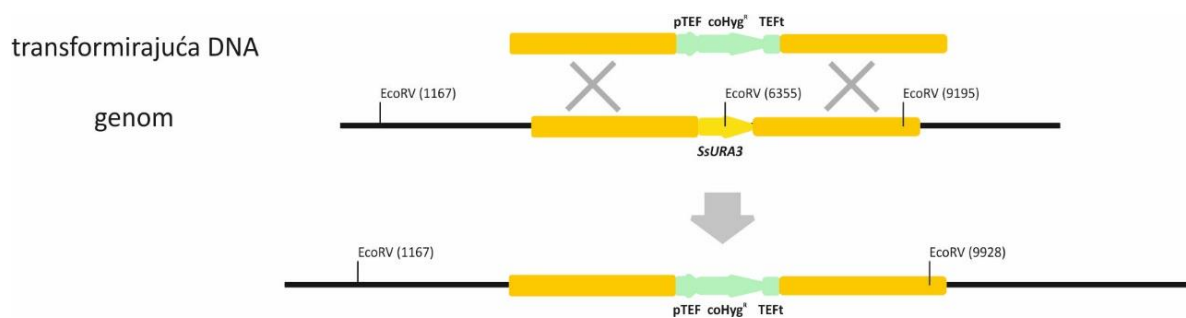
Slika 13. Ovisnost efikasnosti transformacije o otopini korištenoj nakon električnog pulsa i o korištenom sustavu za elektroporaciju. M–MicroPulser, Xc - Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad), YPD/sorb. – smjesa YPD/sorbitol, sorb. – sorbitol

Utvrđena je viša efikasnost transformacije ukoliko se nakon električnog pulsa stanicama doda smjesa YPD/sorbitola, te je u daljnjim transformacijama korišten puls od 2,0 kV, smjesa YPD/sorbitol i uređaj Gene Pulser Xcell Electroporation System (BIO RAD).

Efikasnost transformacije nekonvencionalnih kvasaca ovisi o metodi transformacije i uvjetima transformacije, no vrlo često pri transformaciji nije kao kontrola korišten replikativni plazmid čime je otežana usporedba rezultata koje su objavile različite istraživačke grupe. Prilikom transformacije kvasca *S. stipitis* elektroporacijom, i uz dodatak sorbitola nakon električnog pulsa, efikasnost transformacije bila je $1 \cdot 10^3$ transformanata μg^{-1} DNA (Puseenam i sur., 2015). Efikasnosti transformacije dobivene korištenjem osnovnog protokola od Miklenić i sur. (2015), uz dodatne modifikacije opisane u ovom radu, pokazuju povećanje do sto puta u odnosu na literaturne podatke.

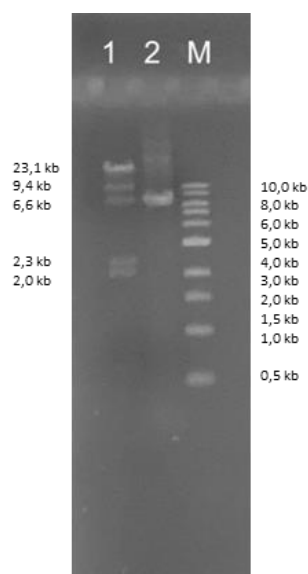
4.3. ODREĐIVANJE USPJEŠNOSTI GENSKOG CILJANJA U KVASCU *Scheffersomyces stipitis*

Nakon optimizacije postupka transformacije elektroporacijom analizirana je uspješnost genskog ciljanja. Za gensko ciljanje korišten je fragment SsUH dobiven umnažanjem regije SsUH, lančanom reakcijom polimerazom korištenjem početnica SsURA3-f i SsURA3-r, s lineariziranog plazmida pMiniT2-SsUH. Fragment SsUH dug je 6609 pb, a sadrži regiju *coHygR*, koja omogućuje transformantima rezistenciju na antibiotik higromicin, omeđenu s 2,5 kb sekvencijama koje se nalaze uzvodno i nizvodno od otvorenog okvira čitanja gena *SsURA3* (slika 14.). Pri uspješnom genskom ciljanju, dolazi do zamjene otvorenog okvira čitanja gena *SsURA3* u genomu kvasca *S. stipitis* disrupcijskom kazetom SsUH, te nastaju transformanti fenotipa Hyg^R Ura⁻.



Slika 14. Shematski prikaz sustava za određivanje uspješnosti genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis*. Prikazani su transformirajuća DNA i ciljna regija u genomu te rezultat uspješnog genskog ciljanja. Tamno žutom bojom naznačene su bočne homologije duljine 2,5 kb koje rekombiniraju pri čemu dolazi do zamjene otvorenog okvira čitanja gena *SsURA3* genom *coHygR*

Fragment SsUH umnožen je lančanom reakcijom polimerazom koristeći linearizirani i iz gela pročišćeni plazmid pMiniT2-SsUH, nakon čega je provedena gel elektroforeza kako bi se potvrdilo uspješno umnažanje disrupcijske kazete SsUH (slika 15.) te je kvasac *S. stipitis* transformiran fragmentom SsUH.



Slika 15. Provjera umnožavanja disrupcijske kazete SsUH lančanom reakcijom polimerazom. 1 – DNA standard, genom bakteriofaga λ pocijepan enzimom HindIII, 2- fragment SsuH, M – DNA standard, 1 kb NEB

Transformacija je provedena sa 725 ng disrupcijske kazete SsUH, pri uvjetima koji su prethodno omogućili najvišu efikasnost transformacije (poglavlje 4.2.), a za provjeru uspješnosti transformacije korišteno je 20 ng replikativnog plazmida pRS54FcoHyg te je efikasnost transformacije iznosila $1,05 \cdot 10^6$ transformanata μg^{-1} DNA. Dobiveno je 6478 transformanata na temelju čega se može zaključiti da je efikasnost transformacije linearnim fragmentom bila 8935 transformanata μg^{-1} . Transformacijom kvasca *S. stipitis* linearnim fragmentom, koristeći metodu pomoću litijevog acetata, efikasnost transformacije iznosila je 40–50 transformanata μg^{-1} DNA (Lu i sur., 1998) dok je 125 ± 65 transformanata μg^{-1} DNA dobiveno ukoliko su kompetentne stanice kvasca prije elektroporacije zamrznute i transformirane integrativnim vektorom (Maassen i sur., 2008). Maassen i suradnici (2008) povećali su efikasnost transformacije na 869 ± 5 transformanata μg^{-1} DNA kada su kompetentne stanice i transformirajuću DNA temeljito miješali pipetom tijekom odmrzavanja, a najviša efikasnost transformacije dobivena je kada su stanice bile zamrznute samo 1 h. Također, primijećen je pad u efikasnosti transformacije od 90 % ako su stanice smrznute duže vremena (Maassen i sur., 2008). Zhao i suradnici (2020) koristili su linearizirani fragment veličine 4,2 kb pri elektroporaciji kvasca *S. stipitis* te je efikasnost transformacije iznosila 677 transformanata μg^{-1} , dok je pri korištenju duljeg fragmenta (14,9 kb) efikasnost transformacije pala na 248 transformanata μg^{-1} . Li i suradnici (2017) su također koristili lineariziranu DNA, i transformacijom pomoću litijevog acetata dobili su do 62 transformanata μg^{-1} transformirajuće DNA. Uz povećanje efikasnosti replikativnim plazmidom, opisano u prethodnom poglavlju,

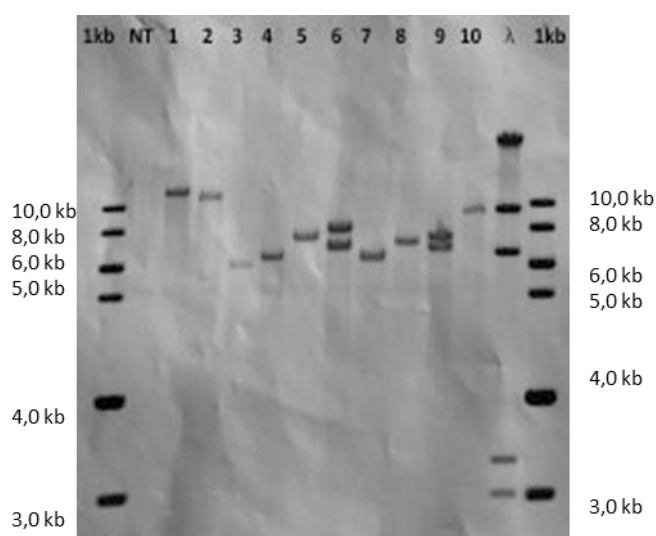
modificirani protokol za elektroporaciju rezultirao je i znatnim povećanje efikasnosti transformacije linearnim fragmentima DNA.

Analiziran je fenotip transformanata dobivenih transformacijom s disrupcijskom kazetom SsUH kako bi se odredila uspješnost genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis*. Od ukupno 6478 transformanata dobivenih transformacijom s kazetom SsUH i rezistentnih na antibiotik higromicin (fenotip Hyg^R), 520 je precijepljeno na kompletne hranjive podloge koje sadrže antibiotik higromicin i replicirano na hranjive podloge koje ne sadrže uracil kako bi se utvrdio postotak transformanata kod kojih je došlo do uspješne zamjene gena (tablica 4.), to jest do genskog ciljanja (fenotip Hyg^R Ura⁻) dok su transformanti fenotipa Hyg^R Ura⁺ nastali nekim od aberantnih transformirajućih događaja (Štafa i sur., 2014; Svetec i sur., 2007).

Tablica 4. Rezultati fenotipske analize transformanata. Kod transformanata fenotipa Hyg^R Ura⁻ došlo je do genskog ciljanja, dok su transformanti fenotipa Hyg^R Ura⁺ nastali nekim aberantnim transformacijskim događajem

Broj transformanata	
Fenotip Hyg ^R Ura ⁻	0
Fenotip Hyg ^R Ura ⁺	520

Kako bi se potvrdila nasumična ugradnja transformirajuće DNA 10 transformanata fenotipa Hyg^R Ura⁺ podvrgnuto je hibridizaciji po Southern-u (slika 16.)



Slika 16. Molekularna analiza 10 transformanata dobivenih transformacijom s disrupcijskom kazetom SsUH. 1 kb – DNA standard, 1 kb NEB. NT- genomska DNA netransformiranog soja *S. stipitis*, 1 –10 genomska DNA izolirana iz transformanata pocijepana enzimom EcoRV, λ- DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII, kao sonda korištena je digoksinom obilježena regija *coHyg*

Kako su porasli transformanti rezistentni na antibiotik higromicin, ali nije došlo do željene zamjene gena, jer svih 520 od 520 ispitanih transformanata ima fenotip Hyg^R Ura⁺ može se zaključiti da je uspješnost genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis* manja od 0,2 %. Štoviše, molekularna analiza hibridizacijom po Southern-u (slika 16) potvrdila je nasumičnu integraciju transformirajuće DNA u genom.

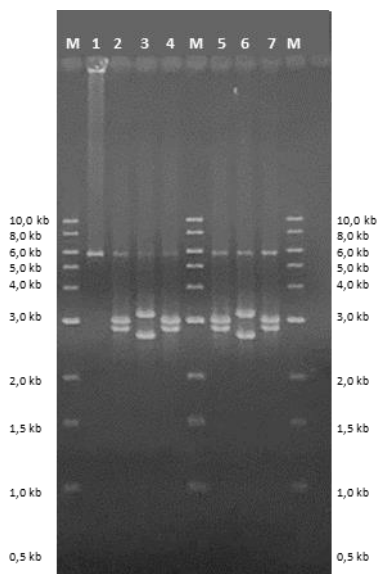
Uspješnost genskog ciljanja u nekonvencionalnim kvasacima, pa tako i u kvascu *S. stipitis*, najčešće je manja od 1 % (Chen i sur., 2013). Kako bi se osiguralo uspješnije gensko ciljanje preporučuje se upotreba bočnih homologija dugih od 200 do 2000 pb (Klinner i Schafer, 2004), iako često ni duge bočne homologije nisu dovoljne za uspješno gensko ciljanje (Fraczek i sur., 2018), što je potvrđeno i u ovom radu. Povećanje efikasnosti genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis* moglo bi se postići inaktivacijom gena *KU80* i/ili *KU70*, čiji proteinski produkti sudjeluju u popravku dvolančanog loma ilegitimnom rekombinacijom (Maassen i sur., 2008) ili upotrebom sustava CRISPR/Cas9 (Cao i sur., 2018).

4.4. UPOTREBA CRISPR/CAS9 RIBONUKLEOPROTEINSKOG KOMPLEKSA PRI GENSKOM CILJANJU

U ovome radu istražena je i upotreba sustava CRISPR/Cas9 za povećanje uspješnosti genskog ciljanja u kvascu *S. stipitis*, a korištene su 3 specifične molekule crRNA, koje se komplementarno sparuju sa sekvencijama u otvorenom okviru čitanja gena *SsURA3*. Sekvencija crRNA1 određena je koristeći program CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) dok su sekvence crRNA2 i crRNA3, koje su nabavljene kasnije, određene pomoću programa koji je integriran u IDT portal (https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM). Ove specifične crRNA1, crRNA2 i crRNA3 nakon komplementarnog sparivanja s univerzalnom tracrRNA, formiraju gRNA1, gRNA2 i gRNA3. Dodatkom razrijeđenog proteina Cas9 otopini koja sadrži gRNA1, gRNA2 i gRNA3 nastaju ribonukleoproteinski (RNP) kompleksi – kompleksi RNP1, RNP2 i RNP3 (poglavlje 3.2.3.)

Prije provođenja samog eksperimenta elektroporacije s kompleksima RNP i disrupcijskom kazetom, provjerena je aktivnost kompleksa RNP1, RNP2 i RNP3 *in vitro*, u vodi i u puferu PBS, (poglavlje 3.2.3.1.) Naime, protokoli proizvođača IDT, čije su komponente korištene za formiranje kompleksa RNP, za elektroporaciju stanica u kulturi preporučuju razrjeđivanje proteina Cas9 u puferu PBS dok se prema protokolima za elektroporaciju kvasaca preporuča

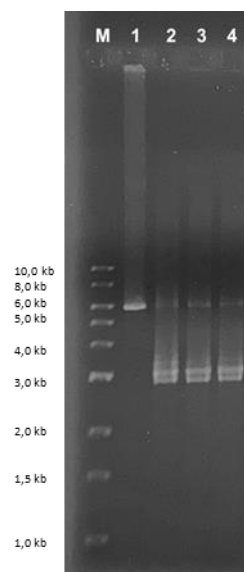
se razrjeđivanje proteina Cas9 u vodi. Rezultati provjere aktivnosti kompleksa RNP1, RNP2 i RNP3 prikazani su na slici 17.



Slika 17. Provjera aktivnosti kompleksa RNP1, RNP2 i RNP3 *in vitro*. M – DNA standard 1 kb NEB, 1- ciljna regija *SsURA3* umnožena lančanom reakcijom polimerazom, 2- cijepanje ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP1 razrijeđenim s vodom; 3- cijepanje ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP2 razrijeđenim s vodom; 4- cijepanje ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP3 razrijeđenim s vodom; 5- cijepanje ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP1 razrijeđenim s puferom PBS; 6- cijepanje ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP2 razrijeđenim s puferom PBS; 7- cijepanje ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP3 razrijeđenim s puferom PBS

Iz rezultata prikazanih na slici 17., možemo zaključiti da su kompleksi RNP1, RNP2 i RNP3, koji sadrže gRNA1, gRNA2 i gRNA3, aktivni to jest cijepaju ciljnu sekvencu *SsURA3* neovisno o mediju za razrjeđivanje proteina Cas9 što je izrazito bitno jer pri elektroporaciji kvasaca nije moguće koristiti pufer PBS. S obzirom na to da se molekule crRNA1, crRNA2 i crRNA3 komplementarno sparuju s različitim regijama u otvorenom okviru čitanja *SsURA3* cijepanjem nastaju fragmenti različitih veličina, što se vidi u uzorcima 2-4 to jest 5-7.

Ispitan je i utjecaj električnog pulsa od 1,8 i 2,0 kV na aktivnost jednog kompleksa RNP (kompleks RNP1 koji je sadržavao crRNA1), a rezultati su prikazani na slici 18.



Slika 18. Utjecaj izlaganja električnom pulsu na aktivnost kompleksa RNP *in vitro*. M – DNA standard 1 kb NEB, 1- ciljna regija *SsURA3* umnožena lančanom reakcijom polimerazom, 2- cijepanje ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP1; 3- cijepanje ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP1 nakon podvrgavanja električnom pulsu od 1,8 kV, 4- cijepanje ciljne regije *SsURA3* kompleksom RNP1 nakon podvrgavanja električnom pulsu od 2,0 kV

Na temelju rezultata prikazanih na slici 18. može se zaključiti da električni puls od 1,8 kV i 2,0 kV ne utječe na stabilnost i aktivnost kompleksa RNP.

U prvom eksperimentu provedenom s kompleksom RNP korišteno je 5 ng plazmida pRS54FcoHyg (efikasnost transformacije iznosila je $1,92 \cdot 10^6$ transformanata μg^{-1}) i 550 ng disruptijske kazete SsUH pročišćene iz gela. Kako je u uputama proizvođača navedena sugestija da se pri elektroporaciji koristi i nespecifična jednolančana DNA (eng. *electroporation enhancer*, EE), svi su uzorci napravljeni u dvije paralele, jednoj bez nespecifične DNA i drugoj sa nespecifičnom DNA. Elektroporacija je provedena prema uvjetima opisanim u poglavlju 4.2. Ukratko, korišten je elektroporator Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad), a nakon pulsa od 2,0 kV na stanice je dodana otopina YPD/sorbitol i stanice su inkubirane 3 sata prije nacjepljivanja. Svim dobivenim transformantima analiziran je fenotip precjepljivanjem na hranjivu podlogu koja sadrži antibiotik higromicin te repliciranjem na podlogu koja ne sadrži uracil. Rezultati elektroporacije prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Broj transformanata i njihov fenotip nakon transformacije disruptivskom kazetom SsUH, korištene su pojedinačne molekule gRNA u sklopu kompleksa RNP

Uzorci	Broj transformanata	Fenotip Hyg ^R Ura ⁻	Fenotip Hyg ^R Ura ⁺
0	0	0	0
gRNA1	7	0	7
gRNA1 + EE	370	0	370
gRNA2	18	0	18
gRNA2 + EE	91	1	90
gRNA3	13	0	13
gRNA3 + EE	144	0	144

Iz rezultata prikazanih u tablici 5. može se vidjeti da je dodatak nespecifične jednolančane DNA (eng. *electroporation enhancer*, EE), povećao broj transformanata za 5-50 puta. Analiza fenotipa otkrila je da je samo jedan transformant, dobiven koristeći gRNA2 imao fenotip Hyg^R Ura⁻, koji se očekuje nakon uspješnog genskog ciljanja.

U nastavku istraživanja korišteno je 5 ng plazmida pRS54FcoHyg (efikasnost transformacije iznosila je $1,96 \cdot 10^6$ transformanata μg^{-1}) i 440 ng disruptivske kazete SsUH pročišćene iz gela te kompleks RNP2. U ovom eksperimentu analiziran je utjecaj duljine inkubacije u neselektivnim uvjetima nakon elektroporacijskog pulsa (3, 9 i 18 sati), a prije nacijepeljivanja na selektivnu podlogu. Naime, ne postoji literaturni podatak koji bi sugerirao koje je vrijeme potrebno za ulazak kompleksa RNP u stanicu kvasca i jezgru, te za uvođenje dvolančanog loma u ciljnu regiju i popravak dvolančanog loma homolognom rekombinacijom pri čemu bi se disruptivska kazeta koristila za inaktivaciju gena *SsURA3* rekombinacijom „krajevi van“. Svim dobivenim transformantima analiziran je fenotip i rezultati su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Broj transformanata i njihov fenotip dobiven transformacijom disrupcijskom kazetom SsUH i kompleksom RNP2 pri različitim vremenima inkubacije u neselektivnim uvjetima prije naciepljivanja na selektivnu podlogu

Uzorci	Vrijeme inkubacije (h)	Broj transformanata	Fenotip Hyg ^R Ura ⁻	Fenotip Hyg ^R Ura ⁺
0	3	0	0	0
gRNA2	3	0	0	0
gRNA2	9	0	0	0
gRNA2	18	31	0	31
gRNA2 + EE	3	12	0	12
gRNA2 + EE	9	19	0	19
gRNA2 + EE	18	406	0	406

Iako je u eksperimentu čiji su rezultati prikazani u tablici 6. efikasnost transformacije kružnim replikativnim plazmidom pRS54FcoHyg bila najviša, pri inkubaciji od 3 i 9 sati nisu dobiveni transformanti dok je nakon 18 sati inkubacije dobiven mali broj transformanata fenotipa Hyg^R Ura⁺ koji sugeriraju ilegitimnu integraciju transformirajuće DNA. Kada je uzorku dodana i nespecifična jednolančana DNA (eng. *electroporation enhancer*, EE) ponovo je uočen porast broja transformanata, iako ni u ovom slučaju nisu dobiveni transformanti željenog fenotipa. Povećanje broja transformanata nakon 18 sati inkubacije u neselektivnim uvjetima može se objasniti klonalnim razmnožavanjem stanica nakon elektroporacije.

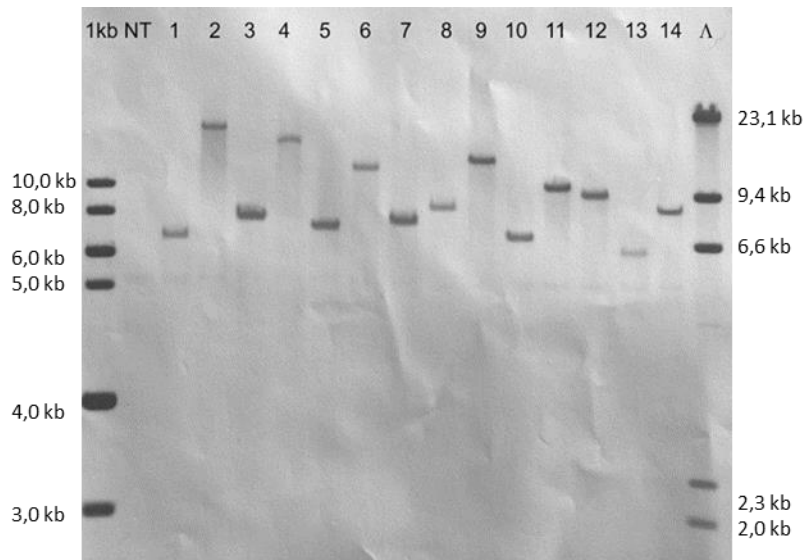
Dodatno, ispitano je i bi li se za povećanje uspješnosti genskog ciljanja mogle koristiti kombinacije molekula gRNA, kako bi se inducirao nastanak dvolančana jaza u genu *SsURA3* koji bi se mogao popraviti homolognom rekombinacijom koristeći disrupcijsku kazetu SsUH kao donorsku DNA. Za transformaciju je korišteno 800 ng disrupcijske kazete, a efikasnost transformacije bila je $1,72 \cdot 10^5$ transformanata μg^{-1} , a u sve je uzorke dodana i nespecifična DNA, te je inkubacija nakon električnog pulsa trajala 6 sati. Rezultati su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Broj transformanata i njihov fenotip dobiven pri transformaciji disrupcijskom kazetom SsUH i kombinacijama molekula gRNA

Uzorci	Broj transformanata	Fenotip Hyg ^R Ura ⁻	Fenotip Hyg ^R Ura ⁺
0	0	0	0
gRNA1 + EE	118	0	118
gRNA2 + EE	163	0	163
gRNA3 + EE	108	0	108
gRNA1+gRNA2 + EE	86	0	86
gRNA2+ gRNA3 + EE	91	0	91
gRNA3 + gRNA1 + EE	142	0	142

Iz rezultata prikazanih u tablici 7. može se vidjeti da niti pojedinačne gRNA niti kombinacije gRNA to jest ni pojedinačni ili kombinacije kompleksa RNP nisu rezultirali nastankom transformanata koji imaju fenotip Hyg^R Ura⁻ što sugerira uspješno gensko ciljanje.

Tijekom provođenja eksperimenata u svrhu povećanja uspješnosti genskog ciljanja potpomognutog sustavom CRISPR/Cas9 ispitane su aktivnosti tri molekule gRNA to jest tri kompleksa RNP, dodatak jednolančane nespecifične DNA (eng. *electroporation enhancer*), različiti vremenski intervali inkubacije u neselektivnim uvjetima (3, 6, 9 i 18 sati) nakon elektroporacije te kombinacije dvije molekule gRNA to jest dva kompleksa RNP. Efikasnost transformacije, neovisno o vremenu trajanja inkubacije i molekuli gRNA koja je korištena, uvijek je iznosila više od $5 \cdot 10^5$ transformanata μg^{-1} . Dodatak nespecifične jednolančane DNA dovodi do povećanja broja transformanata za otprilike 5-50 puta, a porast broja transformanata primijećen je i s produljenjem vremena inkubacije u neselektivnoj podlozi nakon elektroporacije. Unatoč visokoj efikasnosti transformacije, samo je u jednom slučaju, s gRNA2, nastao transformant fenotipa Hyg^R Ura⁻. Kako bi se utvrdilo da li primjena kompleksa RNP, RNP2 i RNP3 utječe na mjesto ugradnje disrupcijske kazete SsUH u genom kvasca *S. stipitis* to jest postoji li preferencija prilikom ugradnje kazete uz CRISPR/Cas sustav, 14 transformanata analizirano je hibridizacijom po Southern-u (slika 19.).



Slika 19. Molekularna analiza 14 transformanata dobivenih transformacijom s disruptivskom kazetom SsUH i kompleksima RNP1, RNP2 i RNP3. 1kb – DNA standard, 1 kb NEB, NT- genomska DNA netransformiranog soja *S. stipitis*, 1 –14 genomska DNA izolirana iz transformanata i pocijepana enzimom EcoRV, transformanti 1-4 dobiveni su s kompleksom RNP1; 4-9 s kompleksom RNP2; 10-14 s kompleksom RNP3. λ - DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII. Kao sonda korištena je digoksinom obilježena regija *coHyg*

Na temelju rezultata prikazanih na slici 19. može se vidjeti da dodavanje kompleksa RNP1, RNP2 i RNP3 nije utjecalo na ugradnju disruptivske kazete SsUH u genom, a čak ni transformant broj 5, fenotipa $\text{Hyg}^R \text{Ura}^-$ nije nastao zamjenom gena jer je u tome slučaju očekivan fragment veličine 8,8 kb.

Rezultati prikazani u ovom poglavlju sugeriraju da, iako aktivni *in vitro*, kompleksi RNP1, RNP2 i RNP3 najvjerojatnije ne ulaze u stanicu kvasca *S. stipitis* pri uvjetima transformacije elektroporacijom koji su korišteni u ovome radu zbog čega nije niti primijećena povećana uspješnost zamjene gena.

Pri primjeni CRISPR/Cas9 sustava u kvascu *S. stipitis*, uspješnost genskog ciljanja iznosila je niskih 16 %, ukoliko nisu bili korišteni sojevi u kojima su inaktivirani geni čiji proteinski produkti sudjeluju u nehomolognom spajanju krajeva (Zhao i sur., 2020). Cao i suradnici (2018) su koristeći soj *S. stipitis* u kojem je provedena disruptivna genomska analiza i CRISPR/Cas9 sustav povećali uspješnost inaktivacije gena s manje od 1% na više od 80%. Dvolančani lom nastao tijekom cijepanja ciljane regije popravljen je uz nastanak insercije i/ili delecijom (eng. *indel mutation*) što je jednostavnije od inaktivacije gena rekombinacijom krajevi-van (Cao i sur., 2018).

Upotreba kompleksa RNP od proizvođača Integrated DNA Technologies pri elektroporaciji, dovela je do povećanja uspješnosti zamjene gena u kvascima roda *Candida* do čak 70 % (Grahl i sur., 2017). Varela i suradnici (2020) povećali su uspješnost zamjene gena u kvascu *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* također koristeći sustav RNP od Integrated DNA Technologies i elektroporaciju te je upotrebom kraćih bočnih homologija omogućeno gensko ciljanje od 11 % za gen *URA3* i 10 % za gen *ADE1*.

Wang (2018) na temelju svog istraživanja s kvascem *Cryptococcus neoformans* i srodnim vrstama, sugerira elektroporaciju kao uspješnu metodu za unos kompleksa RNP, no za uspješnu disrupciju gena ne preporučuje ovu metodu transformacije. Kao uspješnu metodu transformacije i unosa kompleksa RNP, Voigt i suradnici (2020) preporučuju transformaciju protoplastiranjem kojom su povećali stopu homologne rekombinacije u plijesni *Knufia petricola*, a Kunitake i suradnici (2019) su dobili visoku uspješnost genskog ciljanja u kvascu *Pseudozyma antarctica*. Također, Abdallah i suradnici (2017) su razvili jednostavan i učinkovit sustav za uređivanje gena u plijesni *Aspergillus fumigatus* koji uključuje transformaciju protoplasta i unos kompleksa RNP te fragmenata koji služe kao kalupi za popravak i sadrže kratke homologne regije (mikrohomologije).

Prilikom izrade ovog rada, kao metoda transformacije i unosa kompleksa RNP korištena je isključivo elektroporacija stoga je u daljnjem istraživanju potrebno ispitati ima li transformacija protoplastiranjem pozitivan učinak na uspješan unos kompleksa RNP. Transformacija protoplasta dobro je opisana kod kvasca *S. cerevisiae* (Hinnen i sur., 1978), i ukoliko omogućuje unos kompleksa RNP i disrupcijske kazete u kvasac *S. stipitis* mogla bi dovesti i do povećanja uspješnosti genskog ciljanja rekombinacijom krajevi-van.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. U ovom radu poboljšan je protokol za transformaciju kvasca *Scheffersomyces stipitis* elektroporacijom koji omogućuje visoku efikasnost transformacije replikativnim plazmidima i linearnim fragmentima DNA koja je do 100 puta viša u odnosu na literaturne vrijednosti.
2. Rezultati u radu ukazuju da je uspješnost ciljane zamjene gena rekombinacijom krajevi- van u kvascu *S. stipitis* niska čak i ukoliko su bočne homologije dugačke 2,5 kb te bi se moglo zaključiti da je manja od 0,2 %.
3. Iako je *in vitro* pokazano da CRISPR/Cas ribonukleoproteinski (RNP) kompleksi imaju odgovarajuću aktivnost, njihova primjena *in vivo* nije rezultirala povećanjem uspješnosti genskog ciljanja.

6. LITERATURA

Al Abdallah Q, Ge W, Fortwendel JR (2017) A Simple and Universal System for Gene Manipulation in *Aspergillus Fumigatus*: *In Vitro*-Assembled Cas9-Guide RNA Ribonucleoproteins Coupled With Microhomology Repair Templates. *mSphere* **2**, <https://doi.org/10.1128/mSphere.00446-17>

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Biology of the Cell*, 4. izd., Garland Science, New York, str. 845.

Aliyari R, Ding SW (2009) RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunol Rev* **227**, 176 – 188. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00722.x>

Altmannova V, Krejci L, Spirek M, Zhao X (2012) Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res* **40**, 5795 – 5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>

Azangou-Khyavy M, Ghasemi M, Khanali J, Boroomand-Saboore M, Jamalkhah M, Soleimani M, Kiani J (2020) CRISPR/Cas: From Tumor Gene Editing to T Cell-Based Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol* **11**, 2062. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02062>

Bajwa PK, Phaenark C, Grant N, Zhang X, Paice M, Martin VJJ, Trevors JT, Lee H (2011) Ethanol production from selected lignocellulosic hydrolysates by genome shuffled strains of *Scheffersomyces stipitis*. *Bioresource Technol* **102**, 9965 – 9969. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.027>

Banat IM, Nigam P, Marchant R (1992) Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. *World J Microb Biot* **8**, 259 – 263. <https://doi.org/10.1007/BF01201874>

Barrangou R (2015) The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Curr Opin Immunol* **32**, 36 – 41. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.008>

Barrangou R, Doudna JA (2016) Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol* **34**, 933 – 941. <https://doi.org/10.1038/nbt.3659>

Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**, 3329 – 3300. <https://doi.org/10.1093/nar/21.14.3329>

- Beloglazova N, Brown G, Zimmerman MD, Proudfoot M, Makarova KS, Kudritska M, i sur. (2008) A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *J Biol Chem* **283**, 20361 – 20371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803225200>
- Cai P, Gao J, Zhou Y (2019) CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications. *Microb Cell Fact* **18**, 63. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1112-2>
- Cao M, Gao M, Lopez-Garcia CL, Wu Y, Somwarpet Seetharam A, Severin AJ, Shao Z (2017) Centromeric DNA Facilitates Nonconventional Yeast Genetic Engineering. *ACS Synth Biol* **6**, 1545 – 1553. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00046>
- Cao M, Gao M, Ploessl D, Song C, Shao Z (2018) CRISPR – Mediated Genome Editing and Gene Repression in *Scheffersomyces Stipitis*. *Biotechnol J* **13**, 9. <https://doi.org/10.1002/biot.201700598>
- Carroll D (2014) Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem* **83**, 409 – 439. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035418>
- Chen X, Jiang ZH, Chen S, Qin W (2010) Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. *Int J Biol Sci* **6**, 834–844. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6.834>
- Chen Z, Sun H, Li P, He N, Zhu T, Li Y (2013) Enhancement of the Gene Targeting Efficiency of Non-Conventional Yeasts by Increasing Genetic Redundancy. *PLoS One* **8**, e57952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057952>
- Echeverrigaray S, Randon M, da Silva K, Zacaria J, Longaray Delmare AP (2013) Identification and characterization of non-saccharomyces spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. *World J Microb Biot* **29**, 1019 – 1027. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1265-9>
- Fraczek MG, Naseeb S, Delneri D (2018) History of genome editing in yeast. *Yeast* **35**, 361 – 368. <https://doi.org/10.1002/yea.3308>
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, i sur. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546 i 563 - 567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

- Grahl N, Demers E, Crocker AW, Hogan DA (2017) Use of RNA-Protein Complexes for Genome Editing in Non-*albicans* *Candida* Species. *mSphere* 2ee00218-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00218-17>
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 937 – 953. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0827-2>
- He L, St. John James M, Radovicic M, Ivancic-Bace I, Bolt EL (2020) Cas3 Protein—A Review of a Multi-Tasking Machine. *Genes* **11**, 208. <https://doi.org/10.3390/genes11020208>.
- Heslot H, Gaillardin C (1992) Molecular biology and genetic engineering of yeasts, CRC Press, Boca raton, Florida.
- Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E (2018) The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell* **172**, 1239 – 1259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>
- Hinnen A, Hicks JB, Fink GR (1978) Transformation of yeast. *P Natl A Sci USA* **75**, 1929 – 1933. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.4.1929>
- Hoffman CS, Wood V, Fantes PA (2015) An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* **201**, 403 – 423. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181503>
- Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**: 167 – 170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**, 1262 – 1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- IDT (2021) The CRISPR Basics Handbook. IDT – Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/pages>. Pristupljeno 8. srpnja 2021.
- Jeffries TW, Grigoriev IV, Grimwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, i sur. (2007) Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol* **25**, 319 – 326. <https://doi.org/10.1038/nbt1290>
- Jeffries TW, Headman Van Vleet JR (2009) *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res* **9**, 793 – 807. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00525.x>

- Johnson EA (2012) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts — the ascomycetes. *Appl Microbiol Biot* **97**, 503 – 517. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4497-y>
- Klinner U, Schafer B (2004) Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *Fems Microbiol Rev* **28**, 201 – 223. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.002>
- Kourkoutas Y, Dimitropoulou S, Kanellaki M, Marchant R, Nigam P, Banat IM, Koutinas AA (2002) High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Bioresource Technol* **82**, 177 – 181. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00159-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00159-6)
- Kunitake E, Tanaka T, Ueda H, Endo A, Yarimiza T, Katoh E, Kitamoto H (2019) CRIPSR/Cas9-mediated gene replacement in the basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica*. *Fungal Genet Biol* **130**, 82 – 90. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.012>
- Lane MM, Morrissey JP (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol Rev* **24**, 17-26. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2010.01.001>
- Laplaza JM, Torres BR, Jin YS, Jeffries TW (2006) Sh ble and Cre adapted for functional genomics and metabolic engineering of *Pichia stipitis*. *Enzyme Microb Tech* **38**, 741 – 747. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.02>
- Li H, Fan H, Li Y, Shi GY, Ding ZY, Gu ZH, Zhang L (2017) Construction and application of multi-host integrative vector system for xylose-fermenting yeast. *FEMS Yeast Res* **17**, 1 – 9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox055>
- Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, i sur. (2011) Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **39**, 6315 – 6325. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr188>
- Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W (2007) Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technol* **98**, 3367 – 3374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.044>
- Löbs A, Schwartz C, Wheeldon I (2017) Genome and metabolic engineering in nonconventional yeasts: Current advances and applications. *Synth Syst Biotechnol* **2**, 198 – 207. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.002>
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology*, 4. izd., W. H. Freeman & Company, New York.

- Lu P, Davis BP, Hendrick J, Jeffries TW (1998) Cloning and disruption of the bisopropylmalate dehydrogenase gene (*LEU2*) of *Pichia stipitis* with *URA3* and recovery of the double auxotroph. *Appl Microbiol Biot* **49**, 141 – 146. <https://doi.org/10.1007/s002530051150>
- Maassen N, Freese S, Schruff B, Passoth V, Klinner U (2008) Nonhomologous end joining and homologous recombination DNA repair pathways in integration mutagenesis in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *FEMS Yeast Res* **8**, 735 – 743. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00383.x>
- Marraffini LA (2015) CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* **526**, 55 – 61. <https://doi.org/10.1038/nature15386>
- Marraffini LA, Sontheimer EJ (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**, 1843 – 1845. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
- Marraffini LA, Sontheimer EJ (2010) Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* **463**, 568 – 571. <https://doi.org/10.1038/nature08703>
- Martorell P, Stratford M, Steels H, Fernández-Espinar MT, Querol A (2007) Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int J Food Microbiol* **114**, 234 – 242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.014>
- Melake T, Passoth V, Klinner U (1996) Characterization of the genetic system of the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Curr Microbiol* **33**, 237 – 242. <https://doi.org/10.1007/s002849900106>
- Miklenić M, Žunar B, Štafa A, Svetec IK (2015) Improved electroporation procedure for genetic transformation of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Res* **15**, 8. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov096>
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* **155**, 733 – 740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
- Morgan DO (2007) *The cell cycle: principles of control*, New Science Press, London.

- Näätsaari L, Mistlberger B, Ruth C, Hajek T, Hartner FS, Glieder A (2012) Deletion of the *Pichia Pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS One* **7**, 39720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039720>
- Nam KH, Ding F, Haitjema C, Huang Q, DeLisa MP, Ke A (2012) Double-stranded endonuclease activity in *Bacillus halodurans* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated Cas2 protein. *J Biol Chem* **287**, 35943 – 35952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.382598>
- Nardi JB, Bee CM, Miller LA, Nguyen NH, Suh SO, Blackwell M (2006) Communities of microbes that inhabit the changing hindgut landscape of a subsocial beetle. *Arthropod Struct Dev* **35**, 57 – 68. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2005.06.003>
- Nigam JN (2001) Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *J Appl Microbiol* **90**, 208 – 215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01234.x>
- Nonklang S, Abdel-Banat BMA, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, i sur. (2008) High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3–1042. *Appl Environ Microb* **74**, 7514 – 7521. <https://doi.org/10.1128/AEM.01854-08>
- Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J (2000) Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol R* **64**, 34–50. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.34-50.2000>
- Papini M, Nookaew I, Uhlén M, Nielsen J (2012) *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* **11**, 136 – 159. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-136>
- Pâques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol R* **63**, 349 – 404. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.349-404.1999>
- Piškur J, Ling Z, Marcet-Houben M, Ishchuk OP, Aerts A, LaButti K, i sur. (2012) The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *Int J Food Microbiol* **157**, 202 – 209. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.008>

- Puseenam A, Tanapongpipat S, Roongsawang N (2015) Co-expression of Endoxylanase and Endoglucanase in *Scheffersomyces stipitis* and Its Application in Ethanol Production. *Appl Biochem Biotech* **177**, 1690 – 1700. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1846-1>
- Radecka D, Mukherjee V, Quintilla Mateo R, Stojiljkovic M, Foulqie – Moreno MR, Thevelein JM (2015) Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res* **15**, 53 – 67. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
- Restaino L, Bills S, Tscherneff K, Lenovich LM (1983) Growth characteristics of *Saccharomyces rouxii* isolated from chocolate syrup. *Appl Environ Microb* **45**, 1614 – 1621. <https://doi.org/10.1128/aem.45.5.1614-1621.1983>
- Rothstein RJ (1983) One-step gene disruption in yeast. *Method Enzymol* **101**, 202 – 211. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)01015-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)01015-0)
- Schiestl RH, Petes TD (1991) Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *P Natl Acad Sci USA* **88**, 7585 – 7589. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7585>
- Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2011) Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J* **30**, 1335 – 1342. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.41>
- Spencer JF, Ragout de Spencer AL, Laluce C (2002) Non-conventional yeasts. *Appl Microbiol Biot* **58**, 147 – 156. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0834-2>
- Steensels J, Snoek T, Meersman E, Picca Nicolino M, Voordeckers K, Verstrepen KJ (2014) Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 947 – 995. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12073>
- Sugita T, Nakase T (1999) Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*. *Syst Appl Microbiol* **22**, 79 – 86. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80030-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80030-7)
- Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Bio* **7**, 739 – 750. <https://doi.org/10.1038/nrm2008>

- Svetec IK, Štafa A, Zgaga Z (2007) Genetic side effects accompanying gene targeting in yeast: the influence of short heterologous termini. *Yeast* **24**, 637 – 652. <https://doi.org/10.1002/yea.1497>
- Symington LS, Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* **45**, 247 – 271. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132435>
- Štafa A, Miklenić M, Žunar B, Lisnić B, Symington LS, Svetec IK (2014) Sgs1 and Exo1 suppress targeted chromosome duplication during ends-in and ends-out gene targeting. *DNA Repair* **22**, 12 – 23. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.07.004>
- Thompson LH, Schild D (2001) Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* **477**, 131 – 153. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00115-4)
- Tojo S, Hirasawa T (2014) Research Approaches to Sustainable Biomass Systems, Academic Press, Cambridge, str. 243 – 258.
- van Dijken H (2002) The 21st International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY 2001) “Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Ecology of Non-conventional Yeasts (NCY)”. *FEMS Yeast Res* **1**, 337 – 338. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00053.x>
- Varela C, Bartel C, Onetto C, Borneman A (2020) Targeted gene deletion in *Brettanomyces bruxellensis* with an expression-free CRISPR-Cas9 system. *Appl Microbiol Biot* **104**, 7105 – 7115. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10750-5>
- Voigt O, Knabe N, Nitsche S, Erdmann EA, Schumacher J, Gorbushina AA (2020) An advanced genetic toolkit for exploring the biology of the rock-inhabiting black fungus *Knufia petricola*. *Sci Rep-UK* **10**, 22021. 22021 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79120-5>
- Vogl T, Hartner FS, Glieder A (2013) New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotech* **24**, 1094 – 1101. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.024>
- Wang P (2018) Two Distinct Approaches for CRISPR-Cas9-Mediated Gene Editing in *Cryptococcus neoformans* and Related Species. *mSphere* **3**, ee00208 – 18. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00208-18>
- Wang PY, Shopsis C, Schneider H (1980) Fermentation of a pentose by yeasts. *Biochem Bioph Res Co* **94**, 248 – 254. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(80\)80213-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(80)80213-0)

Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**, 331 – 338. <https://doi.org/10.1038/nature10886>

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, i sur. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871 – 880. <https://doi.org/10.1038/nature724>

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

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

Zeeman AM, Steensma HY (2002) The acetyl co-enzyme A synthetase genes of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **20**, 13 – 23. <https://doi.org/10.1002/yea.936>

Zhang F, Wen Y, Guo X (2014) CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* **23**, 40 – 46. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>

Zhao Y, Yao Z, Ploessl D, Ghosh S, Monti M, Schindler D, i sur. (2020) Leveraging the Hermes Transposon to Accelerate the Development of Nonconventional Yeast-based Microbial Cell Factories. *ACS Synth Biol* **9**, 1736 – 1752. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00123>

Zorgo E, Chwialkowska K, Gjuvslund AB, Garré E, Sunnerhagen P, Liti G, i sur. (2013) Ancient evolutionary trade-offs between yeast ploidy states. *PLoS Genet* **9**, 57 – 64. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003388>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Lada Ćurković, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis