Transformacija kvasca Saccharomyces cerevisiae plazmidom koji sadrži gen YAP1 odgovoran za rezistenciju na inhibitore rasta

Jalšić, Lovro

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:561226

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lovro Jalšić

6755/BT

Transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* plazmidom koji sadrži gen *YAP1* odgovoran za rezistenciju na inhibitore rasta

ZAVRŠNI RAD

Modul: Genetičko inženjerstvo

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

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Transformacija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* plazmidom koji sadrži gen *YAP1* odgovoran za rezistenciju na inhibitore rasta

Lovro Jalšić, 6755/BT

Sažetak: Neki od spojeva koji nastaju kiselinskom predobradom lignoceluloznih materijala inhibiraju rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae* jer povećavaju količinu reaktivnih kisikovih spojeva u stanici. Gen *YAP1* kodira za transkripcijski faktor koji u prisutnosti reaktivnih kisikovih spojeva povećava razinu ekspresije mnogih gena čiji proteinski produkti sudjeluju u smanjenju oksidativnog stresa. Cilj ovog rada bio je transformirati odabrane diploidne sojeve kvasca *S. cerevisiae*, nastale križanjem prirodnih izolata iz vina (E5) i cvijeta kaktusa *Opunitha megacantha* (2421), plazmidom pSP-YAP1 koji sadrži gen *YAP1*. Prvo je restrikcijskom analizom provjerena struktura plazmida pSP-YAP1, nakon čega su transfomirani homozigotni diploidni sojevi E5 i 2421 te heterozigotni diploidni soj H2 nastao križanjem haploidnih sojeva E5 i 2421.

Ključne riječi: *Saccharomyces cerevisiae*, transformacija, *YAP1*, restrikcijska analiza, inhibitori rasta

Rad sadrži: 26 stranica, 4 slike, 3 tablice, 25 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

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

Rad predan: lipanj 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department for Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Transformation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* with plasmid containing growth inhibitor resistance gene *YAP1*

Lovro Jalšić 6755/BT

Abstract: Some compounds that are by-products of the acidic hydrolysis of a raw lignocellulosic material inhibit the growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to the accumulation of reactive oxygen species in the cell. *YAP1* gene encodes transcription factor that, in the presence of reactive oxygen species, increases the expression of genes that encode proteins involved in the response to oxidative stress. The aim of this work was to transform selected diploid *S. cerevisiae* strains that were constructed by mating of E5, a natural isolate from wine, and 2421, an isolate from the flower of the cactus *Opunitha megacantha*, with the plasmid pSP-YAP1 containing the *YAP1* gene. First, the structure of the plasmid pSP-YAP1 was confirmed by restriction mapping and then homozygote diploid strains E5 and 2421 and heterozygote diploid H2 strain were transformed successfully.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, transformation, *YAP1*, restriction analysis, growth inhibitor

Thesis contains: 26 pages, 4 figures, 3 tables, 25 references

Original in: Croatian

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

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

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

Thesis Delivered: June 2016

Sadržaj

1. Uvod ... 1
2. Teorijski dio ... 2
2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ... 2
2.2. Plazmidni vektori za transformaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ... 4
2.3. Gel elektroforeza ... 6
2.4. Transformacija stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ... 7
3. Materijali i metode ... 10
3.1. Materijali ... 10
3.1.1. Plazmidi ... 10
3.1.1.1.Plazmidi pSP-G2 i pSP-YAP1 ... 10
3.1.1.2 Plazmid pLUH ... 11
3.1.2. Mikroorganizmi ... 11
3.1.2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ... 11
3.1.3. Hranjive podloge i otopine ... 12
3.1.3.1. Hranjive podloge ... 12
3.1.3.2. Otopine ... 13
3.1.3.2.1. Otopina za pročišćavanje DNA ... 13
3.1.3.2.2. Otopine za gel elektroforezu ... 13
3.1.3.2.3. Otopine za cijepanje DNA ... 14
3.1.3.2.4. Otopina za transformaciju ... 14
3.1.3.2.5. Otopine za izolaciju genomske DNA kvasca ... 14
3.1.4. Kemikalije i enzimi ... 15
3.2. Metode ... 16
3.2.1. Pročišćavanje DNA fenolom, kloroformom i izoamilnim alkoholom ... 16
3.2.2. Cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama ... 16
3.2.3. Gel elektroforeza ... 16
3.2.4. Transformacija litijevim acetatom ... 17
3.2.5. Izolacija genomske DNA kvasca ... 17
3.2.6. Provjera dobivenih transformanata ... 18
4. Rezultati i rasprava ... 19
4.1. Provjera strukture plazmida pSP-G2 i pSP-YAP1 ... 19
4.2. Transformacija diploidnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ... 20

4.3. Izolacija DNA transformanata 21
5. Zaključci 23
6. Literatura 24

1. Uvod

Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina jedan je od glavnih smjerova razvoja industrije biogoriva (Yang i Wyman , 2008). Naime, bioetanol koji se može proizvesti iz šećerne trske ili kukuruznog škroba nije dovoljan za značajnije smanjenje upotrebe neobnovljivih izvora goriva. Međutim, velika dostupnost lignoceluloznih sirovina može omogućiti proizvodnju dovoljne količine bioetanola i rezultirati smanjem potrošnje neobnovljivih izvora goriva (Yang i Wyman , 2008). Jedan od problema kod proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina, fermentacijom s kvascem *Saccharomyces cerevisiae,* je inhibicija stanica kvasca inhibitorima nastalim kod procesa kiselinske predobrade sirovine (Yang i Wyman , 2008). Neki od inhibitora rasta koji nastaju predobradom su furfural i 5-hidroksimetilfurfural (HMF), koji povećavaju količinu reaktivnih kisikovih spojeva nastalih u stanicama kvasca (Kim i Hahn, 2013). Reaktivni kisikovi spojevi (O_2^- , H_2O_2 , $ONOO^-$ i OH^-) oštećuju staničnu membranu, proteine i DNA i induciraju apoptozu (Perrone i sur., 2008).

Gen *YAP1* kodira za protein Yap1, transkripcijski faktor koji se u prisutnosti reaktivnih kisikovih spojeva nakuplja u jezgri stanice i povećava razinu ekspresije mnogih gena čiji proteinski produkti sudjeluju u smanjenju oksidativnog stresa (Temple i sur., 2005). Dokazano je da prekomjerna ekspresija gena *YAP1* povećava rezistenciju stanica kvasca na oksidativni stres nastao zbog prisutnosti furfurala i HMF-a (Kim, Hahn, 2013) te da povećava rezistenciju na inhibitore rasta u hidrolizatu smreke, u kojem se nalazi veliki broj različitih inhibitornih spojeva (Alriksson i sur., 2010). Tehnikama genetičkog inženjerstva moguće je modificirati kvasac *S. cerevisiae* uvođenjem dodatnih kopija gena *YAP1* na plazmidu kako bi novokonstruirani soj bio otporniji na inhibitore rasta koji uzrokuju oksidativni stres u stanici.

Cilj ovog rada je provjeriti strukturu plazmida pSP-YAP1 restrikcijskom analizom, potvrditi da plazmid sadrži gen *YAP1* te transformirati odabrane diploidne sojeve kvasca *S. cerevisiae* plazmidom pSP-YAP1.

2. Teorijski dio

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je nepatogeni, jednostanični eukariot iz carstva *Fungi* i razreda *Ascomycetes*. Stanice su mu ovalne, dimenzija haploida je 4,76*4,19 μm, a dimenzija diploida 6,01*5,06 μm (Herskowitz, 1988). Generacijsko vrijeme laboratorijskih sojeva iznosi 90 minuta na kompleksnoj hranjivoj podlozi (YPD podloga), a na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi 140 minuta, dok optimalna temperatura za rast iznosi 28 -30 °C. Maksimalna gustoća stanica koja se postiže kod uzgoja u optimalnim uvjetima i kompleksnoj hranjivoj podlozi je $2*10^8$ st mL^{-1} (Sherman, 2002).

Kvasac *S. cerevisiae* koristi se kao glavni modelni organizam kod proučavanja staničnih procesa eukariotskih organizama zbog kratkog generacijskog vremena, nepatogenosti i dobro razvijenih genetičkih metoda manipulacije. Naime, kvasac je prvi eukariotski organizam kojemu je sekvencioniran cijeli genom. Genom haploidne stanice veličine je 12 Mb, a raspoređen je u 16 kromosoma raspona veličine od 200 kb do 2200 kb (Goffeau i sur., 1996). Određeno je 6604 otvorenih okvira čitanja od kojih je 78 % eksperimentalno potvrđeno, 10 % nije eksperimentalno karakterizirano dok 12 % nije potvrđeno (Saccharomyces genome database). Haploidne i diploidne stanice razmnožavaju se vegetativno pupanjem, pri čemu nastaje stanica kćer koja je manja od stanice majke (Herskowitz, 1988). Nakon odvajanja (citokineze) stanica, na stanici majci i stanici kćeri ostaje hitinski ožiljak. Na stanici kćeri ožiljak se proširuje i nestaje kako stanica stari, dok na stanici majci ožiljak ostaje i proširuje se tijekom cijelog života. Zbog nakupljanja ožiljaka ograničen je i broj dioba stanice majke koji se procjenjuje na oko 30-50 (Powell i sur., 2003).

Haploidne stanice imaju **a** i α tip parenja. Stanice različitog tipa parenja mogu se pariti, pri čemu fuzijom a i α stanice i njihovih jezgri nastaje diploidna stanica a/α tipa parenja. Tip parenja određen je alelom u lokusu *MAT* koji se nalazi na III. kromosomu kvasca *S. cerevisiae*, a može biti *MAT***a** ili *MAT*α. Lokus *MATα* kodira za transkripcijske faktore α1 i α2, protein α1 aktivira transkripciju gena potrebnih za ekspresiju fenotipa α tipa parenja, dok protein α2 reprimira transkripciju gena potrebnih za ekspresiju fenotipa a tipa parenja. Lokus *MAT**a*** kodira za proteine a1 i a2, protein a1 ima ulogu u diploidnim stanicama a/α tipa parenja, dok uloga a2 proteina nije otkrivena. Stanice a tipa parenja proizvode feromon a-faktor (peptid od 12 aminokiselina), dok stanice α tipa parenja proizvode feromon α-faktor

(peptid od 13 aminokiselina). Feromoni koje proizvode stanice vežu se na receptore na površini stanica suprotnog tipa parenja i zaustavljaju stanični ciklus u G1 fazi, kada svaka stanica sadrži po jednu kopiju svakog kromosoma, te dolayi do fuzije i nastanka diploidne stanice. Diploidna stanica nastala parenjem je a/α tipa parenja, posjeduje alele *MAT***a** i *MAT*α te ne proizvodi ni jedan od feromona i receptora koje proizvode haploidne stanice. Razlog tome je što ekspresijom gena *MAT*α nastaje α2 protein koji reprimira gene za fenotip a tipa parenja, dok ekspresijom gena *MAT***a** nastaje a1 protein koji zajedno sa α2 proteinom tvori a1/α2 proteinski kompleks koji reprimira ekspresiju α1 proteina i gena nužnih za parenje. Diploidne stanice mogu se razmnožavati vegetativno pupanjem, ali mogu i ući u mejotičku diobu pri čemu iz jedne diploidne stanice nastaju 4 haploidne askospore. Za početak sporulacije potrebni su odgovarajući uvijeti, jer će diploidna stanica koje posjeduje alele *MAT***a** i *MAT*α sporulirati u uvjetima niske koncentracije dušika i ugljika. Ovakva regulacija sporulacije omogućena je proteinskim kompleksom a1/α2 koji reprimira ekspresiju gena *RME1* koji kodira za inhibitor mejoze. (Herskowitz, 1988).

Haploidni sojevi kvasca mogu biti homotalični ili heterotalični. Haploidni homotalični sojevi mijenjaju tip parenja, što znači da iz jedne homotalične stanice može nastati diploidna kolonije a/α tipa parenja. Suprotno tome, heterotalični sojevi ne mijenjaju tip parenja. Gen odgovoran za promjenu tipa parenja kod homotaličnih sojeva je gen *HO* koji kodira za endonukleazu koja stvara dvolančani lom u lokusu *MAT* koji se popravlja homolognom rekombinacijom koristeći lokuse *HML* i *HMR* kako kalup. Naime, lokusi *HML* i *HMR* nalaze se s lijeve i desne strane lokusa *MAT*, a u većini sojeva kvasca *S. cerevisiae* lokus *HML* sadrži utišanu regiju identičnu lokusu *MAT*α, dok lokus *HMR* sadrži utišanu regiju *MAT***a**. Djelovanjem endonukleaze Ho u lokusu *MAT* nastaju kratki 3' jednolančani krajevi dugi 4 baze. Dvolančani lom procesira se 5'-3' egzonukleazama pri čemu nastaju dulji 3'-jednolančani krajevi na koje se veže protein Rad51 koji sudjeluje u pronalaženju homologne regije za rekombinaciju. U slučaju kada se u *MAT* lokusu nalazi gen *MAT*α, za popravak homolognom rekombinacijom koristi se regija *HMR***a** što uzrokuje promjenu tipa parenja. Analogno tome, za popravak dvolančanog loma u lokusu *MAT***a** kao kalup koristi se lokus *HML*α (Haber, 2012). Dokazano je da stanice α tipa parenja preferencijalno koriste lokus *HMR* kao kalup za popravak dvolančanog loma u lokusu *MAT*, dok stanice a tipa parenja preferencijalno koriste lokus *HML* kao kalup za popravak dvolančanog loma u lokusu *MAT* (Haber, 2012). Promjena tipa parenja kod sojeva sa genotipom *HML*α i *HMR***a** uspješno se događa u 86 % slučajeva, dok se kod sojeva s obrnutim genotipom (*HML***a** i *HMR*α) promjena

parenja događa u 6 % slučajeva (Klar i sur., 1982). Bitno je naglasiti da je promjena tipa parenja moguća jer endonukleaza Ho ne može cijepati lokuse *HMLα* i *HMR***a** koji su gusto kondenzirani i heterokromatinizirani kako bi se onemogućila njihova ekspresija, ali i cijepanje.

Osim u proučavanju staničnih procesa u eukariotskim stanicama, *S. cerevisiae* ima široku primjenu u prehrambenoj industriji, proizvodnji alkohola i alkoholnih pića, krmiva i enzima, ima GRAS (engl. Generally Regarded As Safe) status, što znači da je bezopasan za ljudsko zdravlje. U industrijskoj proizvodnji bioetanola iz lignoceluloznih sirovina je pogodan zbog svoje tolerancije na visoke koncentracije etanola i niski pH koji se pojavljuju u takvim procesima. Također, pogodan je za ekspresiju i proizvodnju rekombinantnih proteina upravo zbog jednostavog unošenja gena koji kodiraju za rekombinantne proteine te postranslacijskih modifikacija proteina.

Sojevi YIIc17_E5 i UWOPS87-2421 izolirani su iz prirodnih staništa i sekvencionirani u sklopu *Saccharomyces* Genome Resequencing Project, tehnikom dideoksi sekvencioniranja. Soj YIIc17_E5 izoliran je iz vina, dok je soj UWOPS87-2421 izoliran sa cvijeta kaktusa *Opunitha megacantha* (Carter, 2005, Liti i sur., 2009). Rast homozigotnih i heterozigotnih diploidnih sojeva, konstruiranih križanjem ovih ishodnih sojeva, testiran je u prisustvu inhibitora rasta i fermentacije. Utvrđeno je da octena i levulinska kiselina imaju slabo inhibitorno djelovanje tek pri većim koncentracijama, dok 2-furaldehid značajno inhibira već pri nižim koncentracijama, ali se daljnjim povećanjem koncentracije ne primjećuje značajno povećanje inhibitornog djelovanja. Ipak, najznačajniji inhibitorni efekt ima etanol te već pri koncentraciji od 10% dolazi do snižavanja prinosa biomase (Pranklin, 2015).

2.2. Plazmidni vektori za transformaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Plazmidi su ekstrakromosomske molekule DNA koje se u stanici nalaze uglavnom u kružnom dvolančanom obliku, imaju vlastito ishodište replikacije, ali se oslanjaju na enzimski sustav i proteine domaćina za provođenje replikacije i transkripcije, te se repliciraju i nasljeđuju neovisno o kromosomskoj DNA (Sambrook i Russell, 2001). Za plazmide je poželjno da su "shuttle vektori", odnosno da sadrže ishodište replikacije *ori*, zbog koje se mogu replicirati u bakteriji *Escherichia coli*, radi lakšeg održavanja, umnažanja i izolacije plazmida u većim količinama. Ostala poželjna svojstva plazmidnih vektora su mala molekulska masa, veliki broj kopija po stanici, više jedinstvenih mjesta za restrikcijske enzime-MCS (multiple cloning

site), jednostavna selekcija stanica koje sadrže vektor i jednostavna selekcija vektora koji sadrži insert. Za transformaciju stanica kvasca postoje nekoliko vrsta plazmidnih vektora:

a) **Yeast episomal plasmid (YEp)** je vektor koji sadrži ishodište replikacije plazmida *2μ,* koji može biti prirodno prisutan u kvascu *S. cerevisiae,* i ishodište replikacije plazmida iz bakterije *E. coli* (*ori*). Kako sadrži navedena ishodišta replikacije, može transformirati i umnažati se u oba mikroorganizma. Uglavnom se u transformiranoj stanici kvasca nalazi 25-200 broja kopija YEp. Prednost ove vrste plazmida je visoka efikasnost transformacije (10^3-10^5 st μg^{-1} DNA), no nedostatak je nepravilna segregacija u stanicu kćer (Primrose i Twyman, 2006).
b) **Yeast replicating plasmid (YRp)** je vektor koji sadrži ishodište replikacije iz kromosoma kvasca (*ARS* sekvencije, autonomously replicating sequences) i ishodište replikacije iz bakterije *E. coli* (*ori*) pa se može replicirati i u *S. cerevisiae* i *E. coli*. Prednost YRp je visoka efikasnost transformacije (10^4 st μg^{-1} DNA), dok je nedostatak nepravilna segregacija u stanicu kćer (Primrose i Twyman, 2006).
c) **Yeast centromere plasmid (YCp)** je vektor koji sadrži *ARS* sekvenciju, ishodište replikacije iz bakterije *E. coli* (*ori*) i fragment DNA koji sadrži regiju *CEN3*. *CEN3* je centromerna regija 3. kromosoma kvasca *S. cerevisiae* koja omogućuje pravilnu segregaciju YCp u stanice kćeri u procesu mitoze i mejoze. Zbog prisutnosti regije *CEN3*, YCp se u stanici ponaša kao minikromosom, odnosno segregira na jednak način kao i kromosomi. Također, dokazano je da YCp ne integrira u genom kvasca. YCp se u stanicama nalazi u niskom broju kopija (1-2) što je prigodno za ekspresiju gena čiji produkt djeluje toksično na stanicu u većim koncentracijama. Nedostatak niskog broja kopija je teža izolacija plazmida iz stanica, dok je efikasnost transformacije ovim plazmidom visoka (10^4 st μg^{-1} DNA) (Primrose i Twyman, 2006 ; Clarke i Carbon 1980).
d) **Yeast artificial chromosome (YAC)** je umjetni kvaščev kromosom dobiven dodatkom telomera u YCp. Telomere su ponavljajuće sekvence nukleotida na krajevima kromosoma koje služe kao zaštita od degradacije kromosoma egzonukleazama i sprječavanja ligiranje krajeva 2 različita kromosoma (Tamarin, 2001). Cijepanjem ovog vektora odgovarajućom endonukleazom nastaje linearni umjetni kromosom koji na svojim krajevima ima telomere. U YAC-u se mogu klonirati fragmenti veći od 800 kb, što ga čini pogodnim za rad s velikim eukariotskim genima. Također je primijećeno da kloniranje fragmenata manjih od 20 kb ne rezultira do pravilnom segregacijom (Primrose i Twyman, 2006).

e) **Yeast integrative plasmid (YIp)** je kvaščev integrativni plazmid. Ne posjeduje vlastito ishodište replikacije zbog čega se ne može samostalno replicirati u stanici domaćina, već se mora ugraditi u genom homolognom rekombinacijom. Nedostatak YIp je niska efikasnost transformacije (10^2 st μg^{-1} DNA), no zbog ugradnje u genom nastaju stabilni transformanti transfomanti (Primrose i Twyman, 2006).

Vektor pSP-YAP1 sadrži gen *YAP1* koji kodira za transkripcijski faktor Yap1, odgovornan za adaptivni odgovor na oksidativni stres u kvascu *S. cerevisiae*. Naime, protein Yap1 ima strukturu leucinskog zatvarača i regulira ekspresiju oko 70 gena među kojima su geni koji kodiraju za tioredoksin reduktazu (*TTR1*), citosolnu katalazu (*CTT1*), tioredoksin 2 (*TRX2*), citosolnu superoksid dismutazu (*SOD1*), citokrom-c peroksidazu (*CCP1*) i enzime koji sudjeluju u metabolizmu sinteze glutationa (*GSH1*, *GTT1* i *GPX2*) (Temple i sur., 2005). Kada stanica nije pod utjecajem oksidativnog stresa, protein Yap1 se nalazi u citosolu, te su cisteinski aminokiselinski ostaci na položajima C303 i C598 u reduciranom obliku. Pojavom H_2O_2 (oksidativnog stresa) u stanici, tiolna skupina C36 cisteina u proteinu Gpx3 pretvara se u sulfensku kiselinu koja zatim reagira sa tiolnom skupinom C598 proteina Yap1, stvarajući disulfidni most između ova dva proteina koji se prenosi na C303 i C598 cisteinske aminokiselinske ostatke uz regeneraciju (redukciju) C36 tiolne skupine. Nastali C303-C598 disulfidni most omogućuje transport proteina Yap1 u jezgru preko transportnog proteina Pse1, gdje kao protein Yap1 kao transkripcijski faktor pojačava ekspresiju prethodno navedenih gena. Kada u stanici dođe do smanjenja koncentracije sojeva odgovornih za indukciju oksidativnog stresa, C303-C598 disulfidni most se reducira i protein Crm1 transportira protein Yap1 u citosol (Temple i sur., 2005).

2.3. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza je analitička i preparativna metoda koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i pročišćavanje nukleinskih kiselina. Metoda se zasniva na kretanju fragmenta nukleinskih kiselina prema pozitivnoj elektrodi kroz čvrsti nosač gel strukture, koji je uronjen u pufersku otopinu koja provodi električnu struju. Kretanje fragmenta nukleinske kiseline prema anodi posljedica je negativnog naboja fosfatnih skupina u strukturi nukleinskih kiselina. Molekula nukleinske kiseline se pod utjecajem električnog polja kreče kroz nosač, pri čemu brzina kretanja molekule ovisi o stupnju umreženosti gela (njegovoj koncentraciji), veličini molekule i njenoj konformaciji koju poprima u gelu. Kod veće koncentracije nosača nastaje struktura sa manjim porama koje stvaraju veći otpor prolasku fragmenta kroz gel., a

veći fragmenti kreću se sporije zbog stvaranja veće sile trenja prilikom prolaska kroz gel. Osim tpga, molekule DNA koje su u kružnoj, relaksiranoj konformaciji putuju najsporije kroz gel, dok o uvjetima elektroforeze ovisi hoće li najbrže putovati superzavijena ili linearna molekula DNA. Da bi se elektroforeza mogla odvijati, gel mora biti uronjen u otopinu (pufer) koja sadrži ione koji zatvaraju strujni krug. Kod primjene otopina visoke ionske jakosti, vodljivost otopine se značajno poveća i dolazi do jakog zagrijavanja i mogućeg taljenja gela, dok kod primjene otopina sa preniskom ionskom jakosti ne dolazi do razdvajanja fragmenta nukleinskih kiselina (Sambrook i Russell, 2001).

Nosači koji se koriste su agarozni i poliakrilamidni nosači. Izbor nosača ovisi o veličini fragmenta nukleinske kiseline koji se želi analizirati ili pročistiti. Tako je za fragmente manje od 2 kb najefikasniji poliakrilamidni gel, dok se za fragmente od 0,1 kb do 25 kb upotrebljava agarozni gel. (Sambrook i Russell, 2001). Puferi koji se koriste kod gel elektroforeze su TAE (tris-acetat, EDTA), TBE (tris-borat, EDTA) i TPE (tris-fosfat, EDTA). TAE pufer ima manji kapacitet, zbog čega ga je potrebno češće mijenjati, ali je razdvajanje i razlučivost većih fragmenta bolji. TBE i TPE imaju veći kapacitet od TAE, ali su skuplji i primjenjuju se kod gel elektroforeze manjih fragmenta (Sambrook i Russell, 2001).

Uzorak koji se nanosi u jažice miješa se sa bojilom za nanošenje uzorka koje sadrži bromfenol plavo, ksilen cijanol, glicerol, SDS i EDTA. Naime, bojilo povećava gustoću uzorka, olakšava nanošenje uzorka u jažice i omogućuje praćenje elektroforeze jer bromfenol plavo u agaroznom gelu putuje kao fragment linearne dvolančane DNA duljine 300 pb, dok ksilen cijanol u gelu putuje kao fragment veličine 4 kb. Poznavajući brzinu kojom se bojilo kreće, može se procijeniti položaj nukleinske kiseline u gelu i time pravovremeno zaustaviti elektroforezu tako da nukleinska kiselina ne izađe iz gela (Sambrook i Russell, 2001).

Za vizualizaciju dvolančane DNA u gelu najčešće se koristi etidij bromid koji interkalira između parova baza. Kada je etidij bromid interkaliran u uzvojnicu DNA, emitira vidljivu svjetlost valne duljine 590 nm kada se tretirani gel ozrači sa UV svjetlosti valne duljine od 302 nm i 366 nm. (Sambrook i Russell, 2001).

2.4. Transformacija stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Transformacija je proces unošenja egzogene DNA u stanicu pri čemu DNA mora proći kroz staničnu stijenku i staničnu membranu. Za provedbu transformacije bitno je moći razlikovati

transformirane od netransformiranih stanica što se postiže upotrebom selektoivnih markera. Najčešće korišteni selektivni markeri su auksotrofni markeri koji omogućuju rast transformiranih stanica na kemijski definiranim podlogama iako su stanica korištene za transfomaciju auksotrofni mutanti i ne mogu sintetizirati određeni esencijalni metabolit. Stanice se transfomiraju vektorom ili transfomirajućom DNA koja sadrži i gen koji kodira za enzim u biosintetskom putu metabolita za koji je stanica domaćin auksotrofni mutant i čime se komplementira auksotrofnost stanice. Na taj način na selektivnoj podlozi mogu narasti samo stanice koje su primile transfomirajuću DNA. Jedan od najčešće korištenih auksotrofnih selektivnih markera pri radu s kvascam *S. cerevisiae* je gen *URA3* koji omogućuje i pozitivnu i negativnu selekciju. Naime, transfomacijom stanica koje imaju mutaciju u genu *ura3,* s transfomirajućom DNA koja sadrži gen *URA3* omogućuje se rast transfomiranih stanica na podlozi koja ne sadrži uracil. No, gen *URA3* može se koristiti i kao negativni selektivni marker. Naime, orotidin-5-fosfat dekarboksilaza za koju kodira gen *URA3* katalizira pretvorbu 5-fluoroorotične kiseline (5-FOA) u fluorouracil koji inhibira rast stanica pa samo stanice koje nemaju funkconalan gen *URA3* mogu rasti u prisutnosti 5-FOA (Romanos, 1992).

Prva uspješna transformacija kvasca *S. cerevisiae* izvedena je 1978. godine metodom transformacije protoplasta kvasca (stanica kojima je enzimski razgrađena stanična stijenka) integrativnim plazmidom koji je sadržavao gen *LEU2*, dok je transformirani kvasac bio auksotrofni mutant za leucin koji ima inaktivan gen *leu2*. Transformacijom je dobiven kvasac koji u svoj genom ima integrirani *LEU2* gen i više nije auksotrofni mutant za leucin (Hinnen i sur. 1978).

Uz spomenutu metodu transformacije protoplasta koriste se i transformacija pomoću litijevog acetata i elektroporacija. Metoda transformacije kvasca pomoću litijevog acetata otkrivena je u istraživanju koje je pokazalo povećanu efikasnost transformacije stanica kvasca tretiranim alkalijskim kationima prije transformacije. Naime, tretiranje stanica litijevim acetatom pokazalo se kao najefikasnije u odnosu na druge spojeve koji disocijacijom daju jednovalentne katione (LiCl, CsCl, NaCl i drugi). Osim toga, dokazano je da ispitani jednovalentni ioni nemaju utjecaja na vijabilnost stanica kvasca, a da korištenje stanica u srednjoj logaritamskoj fazi, tretiranje stanica polietilen glikolom (PEG) i temperaturnim šokom (5 minuta na 42 °C) značajno povećava efikasnost transformacije. Prednosti transformacije litijevim acetatom u usporedbi sa transformacijom protoplasta su jednostavnost metode, izbjegavanje regeneracije stanične stijenke i mogućnost korištenja sojeva kvasca koji

su rezistentni ili osjetljivi na enzime koji razgrađuju staničnu stjenku. Efikasnost transformacije je slična onoj kod transformacije protoplasta, osim ako se koristi plazmid sa *2μ* ishodištem replikacije (Ito i sur. 1983).

Elektroporacija je metoda kojom se povećava permeabilnost stanične membrane korištenjem pulsirajućeg električnog polja koje stvori mikropore na staničnoj membrani i time olakšava ulazak egzogene DNA u stanicu. Elektroporacija se odvija pri visokim naponima u komorici za elektroporaciju. Optimalni električni kapacitet i napon koji se koristi pri elektroporaciji iznose 25 μF i 800-900 V. Koriste se stanice u logaritamskoj fazi rasta uz dodatak oko 0,1 μg DNA za transformaciju. Prednost metode je njezina brzina i jednostavnost, dok je efikasnost transformacije bliska onima transformacije protoplasta i transformacije litijevim acetatom (Delorme 1989).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

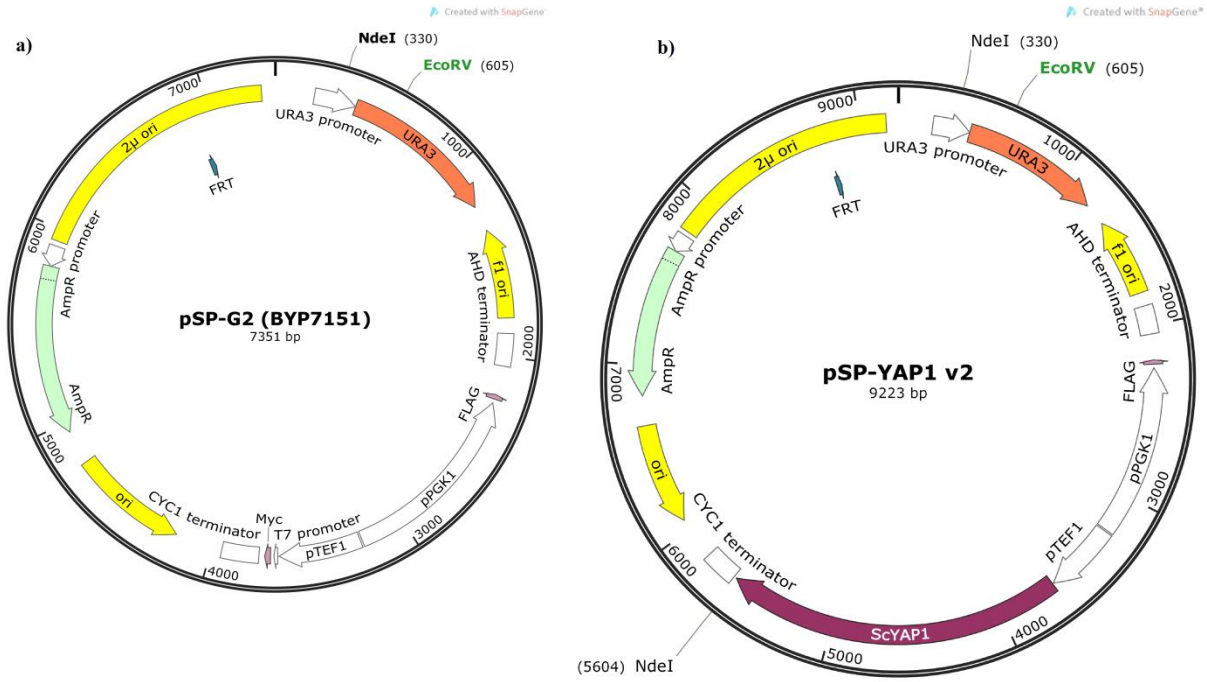
U ovome radu korištena su tri plazmida i četiri soja kvasca *S. cerevisiae* kako bi se kontruirali sojevi kvasca *S. cerevisiae* koji sadrže plazmide pSP-G2 i pSP-YAP1.

3.1.1. Plazmidi

U ovome radu korišteni su plazmidi pSP-G2, pSP-YAP1 i pLUH. Svaki plazmid sadrži ishodišta replikacije *ori* i *2μ* zbog čega se mogu replicirati u bakteriji *E. coli* i kvascu *S. cerevisiae*, regiju *bla* koja kodira za enzim β-laktamazu (razgrađuje β-laktamske antibiotike) i regiju *URA3* koja omogućuje selekciju transformanata na podlogama bez uracila jer kodira za enzim koji sudjeluje u biosintetskom putu uracila. Svaki soj kvasca je transformiran sa svakim od navedenih plazmida.

3.1.1.1.Plazmidi pSP-G2 i pSP-YAP1

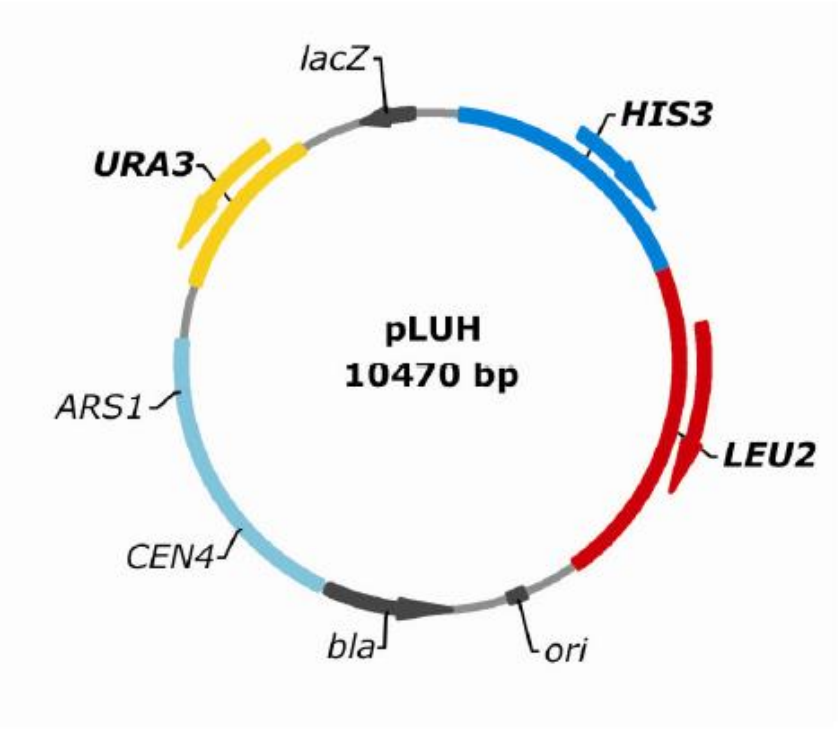
Plazmidi pSP-G2 i pSP-YAP1 su replikativni plazmidi (YEp) koji se razlikuju po tome što plazmid pSP-YAP1 sadrži gen *YAP1* veličine 1953 pb koji kodira za transkripcijski faktor Yap1 koji je stavljen pod regulaciju promotora *pTEF1* i terminatora *CYC1*.



Slika 1. Mape plazmida pSP-G2 (**A**) i pSP-YAP1 (**B**). Obilježene regije i restrikcijska mjesta bitna su za ovaj rad.

3.1.1.2 Plazmid pLUH

Plazmid pLUH, uz regiju *URA3* sadrži i regije *HIS3* i *LEU2* i korišten je za određivanje efikasnosti transformacije.



Slika 2**.** Replikativni plazmid pLUH. Obilježene regije i restrikcijska mjesta bitna su za ovaj rad.

3.1.2. Mikroorganizmi

3.1.2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

U ovom radu korištena su četiri diploidna soja kvasca *S. cerevisiae* čiji su genotipovi i fenotipovi naveden u Tablica 1. Ovi sojevi nastali su parenjem ishodnih sojeva NCYC 3612 i NCYC 3586 (haploidi α i **a** tipa parenja koji potiču od roditeljskog soja YIIc17_E5) i NCYC 3609 i NCYC 3582 (haploidi α i **a** tipa parenja koji potječu od roditeljskog soja UWOPS87-2421) (Cubillos i sur., 2009).

Tablica 1. Genotip i fenotip korištenih sojeva kvasca *S. cerevisiae*

Ime soja	Genotip	Fenotip	Literaturni navod
E5 diploid (homozigotni diploid)	*Mat a/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*	Ura^-His^-	Pranklin, 2015.
2421 diploid (homozigotni diploid)	*Mat a/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*	Ura^-	Pranklin, 2015.
H1 diploid (heterozigotni diploid)	*Mat a/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*	Ura^-	Pranklin, 2015.
H2 diploid (heterozigotni diploid)	*Mat a/α, ura3::KanMX/ura3::KanMX, ho::HygMX/ho::HygMX*	Ura^-	Pranklin, 2015.

3.1.3. Hranjive podloge i otopine

Sve podloge i otopine steriliziraju se u autoklavu 20 minuta pri 121 ˚C i čuvaju pri sobnoj temperaturi (osim ako nije posebno napomenuto) ili se pripremaju iz sterilnih matičnih otopina i sterilne deionizirane vode. Krute podloge dobiju se iz tekucih dodatkom 15,0 g L^{-1} agara prije sterilizacije.

3.1.3.1. Hranjive podloge

Minimalna hranjiva podloga sa izvorom dušika iz kvasca

izvor dušika iz kvasca (bez aminokiselina i amonijevog sulfata)	1,7 g L^{-1}
amonijev sulfat	5 g L^{-1}
glukoza	20g L^{-1}
smjesa nukleinskih baza i aminokiselina	1,3g L^{-1}

Minimalna hranjiva podloga sa izvorom dušika iz kvasca i histidinom

Sastav jednak prethodnoj podlozi uz dodatak 2,49 mL histidina koncentracije 2,40 ng mL^{-1}

Kemijski definirana podloga bez uracila

izvor dušika iz kvasca (bez aminokiselina i amonijevog sulfata)	1,7 g L^{-1}
amonijev sulfat	5 g L^{-1}
glukoza	20 g L^{-1}
smjesa nukleinskih baza i aminokiselina	1,3 g L^{-1}

Smjesa nukleinskih baza i aminokiselina

adenin sulfat	2,5 g
L-arginin-klorid	1,2 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g
L-glutaminska kiselina	6,0 g
L-histidin-klorid	1,2 g
L-leucin	3,6 g
L-llizin-klorid	1,8 g
L-metionin	1,2 g
L-fenilalanin	3,0 g
L-serin	22,5 g
L-treonin	12,0 g
L-triptofan	2,4 g
L-tirozin	1,8 g
L-valin	9,0 g

3.1.3.2. Otopine

U ovom radu korištene su otopine za izolaciju DNA, gel elektroforezu, transformaciju i cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama.

3.1.3.2.1. Otopina za pročišćavanje DNA

Smjesa fenol-kloroform-izoamilni alkohol

omjer fenol:kloroform:izoamilni alkohol	25:24:1

TE pufer pH 8

Tris-Cl (pH 8)	10 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

3.1.3.2.2. Otopine za gel elektroforezu

TBE pufer (10x)

Tris	108 g L^{-1}
borna kiselina	55 g L^{-1}
EDTA (0,5M ; pH 8)	40 mL L^{-1}

Agarozni gel (0,8 %)

agaroza	0,8 g
TBE pufer (1x) pripremljen razrjeđivanjem TBE pufera (10x)	100 mL

Bojilo za nanošenje uzorka

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

Otopina se može sterilizirati filtracijom i čuva se pri 4 °C

3.1.3.2.3. Otopine za cijepanje DNA

Otopine za cijepanje DNA pripremljene su prema uputama proizvođača restrikcijskih enzima („Pharmacia Biotech“, San Francisco, SAD; „New England Biolabs“, Ipswich, MA, SAD).

3.1.3.2.4. Otopina za transformaciju

50 % PEG_{4000}	16 mL
litijev acetat (1M, pH 7,0-7,1)	5 mL
Tris-HCl (1 M, pH 7,5)	0,2 mL
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,04 mL

3.1.3.2.5. Otopine za izolaciju genomske DNA kvasca

SCE

sorbitol	1,0 M
natrijev citrat	0,1 M
EDTA	0,06 M

Zimoliaza

zimoliaza 20-T	15mg
glicerol (0,4 g mL^{-1})	3mL

STE

SDS	5 g L^{-1}
tris-HCl (pH 8)	0,1 M
EDTA (pH 8)	0,05 M

Ribonukleaza A

RNAza A	10 mg μL^{-1}
tris-HCl pH (7,5)	0,01 M
NaCl	0,015 M

3.1.4. Kemikalije i enzimi

Agaroza: „Appligene“, Illkirch, Francuska

Amonijev acetat: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

Apsolutni etanol: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

Borna kiselina: „Fisher Scientific“, Pittsburgh, SAD

DNA bakteriofaga λ: „Fermentas International Inc.“, Ontario, Kanada

EDTA: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

Enzimi za cijepanje DNA i odgovarajući puferi:

„Pharmacia Biotech“, San Francisco, SAD

„New England Biolabs“, Ipswich, MA, SAD

Etidij bromid: „Roche Applied Science” Indianapolis, IN, SAD

Glicerol: „Carlo Erba Reagents“, Rodano, Italija

Izopropanol: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

Kemikalije za pripremu podloga: „Difco“, Detroit, SAD i „Merck“, Darmstadt, Njemačka

PEG: „Fluka“, Buchs, Švicarska

Ribonukleaza A: „Sigma-Aldrich“, Buchs, Švicarska

SDS: „Merck“, Hohenbrunn, Njemačka

Sorbitol: „Barr“, Zagreb, Hrvatska

Tris: „Sigma-Aldrich“, Buchs, Švicarska

Zimoliaza: „Seikugaku Kogyo Co.“, Tokyo, Japan

Kemikalije za pripremu ostalih otopina: „Fluka“, Buchs, Švicarska, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska i „Alkaloid“, Skoplje, Makedonija

3.2. Metode

U ovom radu provedene su metode izolacije i pročišćavanja DNA, cijepanja DNA restrikcijskim enzimima, gel elektroforeze i transformacije kvasca *S. cerevisiae*.

3.2.1. Pročišćavanje DNA fenolom, kloroformom i izoamilnim alkoholom

400 μL DNA izolirane iz velikog volumena pomiješa se s otopinom fenola, kloroforma i izoamilnog alkohola, nakon čega se centrifugira 5 minuta na 10000 okretaja u minuti i gornja vodena faza prenese se u novu kivetu. Postupak se ponavlja više puta, dok je nakon centrifugiranja vidljiv proteinski talog između gornje i donje faze. Gornja vodena faza se prenese u novu kivetu i uz dodatak 0,6 volumena izopropanola, centrifugira 5 minuta na 10000 okretaja u minuti. Supernatant se izlije, a iz kivete se ostatak supernatanta ukloni vakuum sisaljkom, te se otvorena kiveta se stavi uz plamenik da se DNA osuši. Osušena DNA se otopi u TE puferu i inkubira na 70 °C da se DNA otopi.

3.2.2. Cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama

Restrikcijska analiza je provedena cijepanjem plazmida pSP-G2 i pSP-YAP1 restrikcijskim endonukleazama *Eco*RV i *Nde*I prema uputama proizvođača. Restrikcijska smjesa se inkubira preko noći na 37 °C da bi prinos pocijepane DNA bio što veći.

3.2.3. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza se provodi u 0,8 % agaroznom gelu čiji je sastav naveden u poglavlju 3.1.3.2.2. Otopine za gel elektroforezu Agarozu je potrebno otopiti zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Otopina se zagrijava do vrenja, promiješa i provjeri ima li ostataka neotopljene agaroze. Ako agaroza nije potpuno otopljena, postupak zagrijavanja se ponavlja do potpunog otapanja agaroze. Potpuno otopljeni gel potrebno je ohladiti na ispod 60 °C prije izlijevanja u kalup. Dok se gel hladi, potrebno je dobro očistiti kalup i češalj za formiranje jažica etanolom i oblijepiti kalup trakom. Kada se gel u kalupu potpuno ohladi i očvrsne, ukloni se češalj i samoljepljiva traka. Gel zajedno sa kalupom se postavi u kadicu za horizontalnu elektroforezu. Kadica za elektroforezu se napuni TBE (1x) puferom do te razine da postoji tanki sloj pufera iznad gela.. Gel elektroforeza se provodi pri naponu od 60 V. Trajanje elektroforeze ovisi o veličini fragmenta koji se analiziraju, a elektroforeza se prekida kada migracijsko bojilo dolazi gotovo do kraja gela. Gel se nakon elektroforeze inkubira u etidij-bromidu i stavlja pod transiluminator na kojem se osvijetli UV zračenjem i fotografira preko crvenog filtra.

3.2.4. Transformacija litijevim acetatom

Odabrani sojevi za transformaciju se uzgoje u kompletnoj podlozi preko noći na 28° C do gustoće stanica oko $2,5*10^7$ st mL^{-1}. Gustoća stanica se utvrđuje brojanjem u Thoma-ovoj komorici. 100 mL kulture se centrifugira 5 minuta na 3000 okretaja u minuti, nakon čega se izlije supernatant. Stanice se resuspendiraju u 30 mL sterilne deionizirane vode, nakon čega se suspenzija stanica ponovno centrifugira pri istim uvjetima. Supernatant se ponovno izlije i stanice resuspendiraju u 850 μL sterilne deionizirane vode. Postupak centrifugiranja se ponovi pri istim uvjetima i stanice resuspendiraju u 900 μL sterilne deionizirane vode. Suspenzija stanica se raspodjeli u kivete u volumenima od 100 μL. Kivete sa suspenzijom stanica se centrifugiraju 5 minuta na 3000 okretaja u minuti, nakon čega se ukloni 80 μL supernatanta i doda do 10 μL otopine DNA. Na smjesu stanica i DNA se doda 350 μL otopine za transformaciju čiji je sastav naveden u poglavlju 3.1.3.2.4. Otopina za transformaciju Smjesa se promješa i inkubira 40 minuta na 28 °C i zatim se inkubira 40 minuta na 42 °C. Smjesa se centrifugira 5 minuta na 3000 okretaja u minuti i ukloni sav supernatant. Na talog se dodaje 200 μL kompletne podloge, resuspendira se talog i inkubira 20 minuta na 28 °C da bi se stanice oporavile od prethodnih koraka. Smjesa se centrifugira 5 minuta na 3000 okretaja u minuti i ukloni se sav supernatant. Stanice kvasca se resuspendiraju u 180 μL sterilne deionizirane vode, a na dvije podloge se nacjepljuje po 95 μL suspenzije stanica.

3.2.5. Izolacija genomske DNA kvasca

Transformirani kvasci nacijepe se u 4 mL selektivne tekuće podloge i inkubiraju 2 dana (do stacionarne faze) na tresilici i 28 °C. Kultura se nakon inkubacije centrifugira 5 minuta na 3000 okretaja u minuti i odlije supernatant. Stanice koje su u talogu se resuspendiraju u 800 μL sterilne deionizirane vode. Stanice se zatim ponovno centrifugiraju pri istim uvjetima, izlije supernatant i talog resuspendira u 800 μL SCE. Postupak centrifugiranja se ponovi i talog se otopi u SCE do ukupnog volumena 200 μL. U otopinu se doda 20 μL zimoliaze i inkubira 1 sat na 37 °C. Nakon inkubacije se dodaje 800 μL STE i promiješa okretanjem. Otopina se inkubira 20 minuta u kupelji na 70 °C i zatim 10 minuta u ledu. U otopinu se doda 200 μL kalijevog acetata (5 M, pH 4,8) i inkubira preko noći u ledu u frižideru. Nakon inkubacije se otopina centrifugira 30 minuta na 11000 okretaja u minuti. 970 μL supernatanta se prebaci u novu kivetu, doda 630 μL izopropanola i promiješa okretanjem. Otopina se centrifugira 20 minuta na 11000 okretaja u minuti, nakon čega se supernatant odlije i talog osuši. Osušeni talog se otopi u 300 μL TE pufera i inkubira 20 minuta u kupelji na 70 °C. U otopinu se dodaje 1/3 volumena 8 M amonijevog acetata i 8/3 volumena apsolutnog etanola.

Otopina se inkubira 2 sata na -20 ˚C nakon čega se centrifugira 20 minuta na 11000 okretaja u minuti. Supernatant se odlije i u talog dodaje 50 µL TE pufera i 0,5 µL RNAze i inkubira u kupelji na 60 ˚C.

3.2.6. Provjera dobivenih transformanata

Izolirana genomska DNA transformiranih kvasaca se analizira gel elektroforezom na 0,8 % agaroznom gelu. Priprema gela i provođenje elektroforeze opisano je u poglavlju 3.2.3. Gel elektroforeza

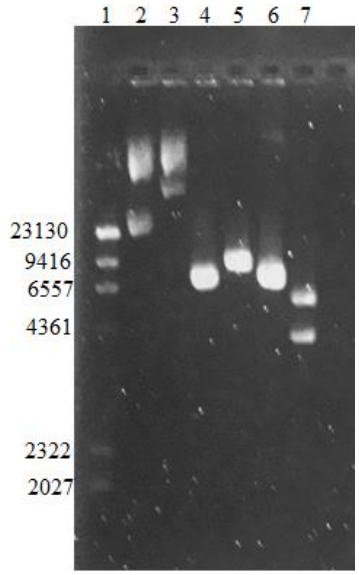
4. Rezultati i rasprava

Cilj ovog rada je bio transformirati 4 diploidna soja kvasca *S. cerevisiae* (E5, 2421, H1, H2) plazmidom pSP-YAP1. Prvo je provjerena struktura plazmida pSP-YAP1 (poglavlje

4.1. Provjera strukture plazmida pSP-G2 i pSP-YAP1) a nakon toga su transformirani sojevi kvasca *S. cerevisiae* (poglavlje 4.2. Transformacija diploidnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae*) metodom pomoću litijevog acetata.

4.1. Provjera strukture plazmida pSP-G2 i pSP-YAP1

Kako bi se provjerila njihova struktura, plazmidi pSP-G2 i pSP-YAP1 pocijepani su restrikcijskim endonukleazama *Eco*RV i *Nde*I, a nastali fragmenti razdvojeni su gel elektroforezom u agaroznom gelu. Mape plazmida s naznačenim restrikcijskim mjestima prikazane su na Slika 1. U plazmidu pSP-G2 postoji jedno restrikcijsko mjesto za enzime *Eco*RV i *Nde*I, dok u plazmidu pSP-YAP1 postoji jedno restrikcijsko mjesto za enzim *Eco*RV i dva restrikcijska mjesta za *Nde*I od kojih se jedno restrikcijsko mjesto za *Nde*I nalazi se u genu *YAP1*. Kao marker koristila se DNA bakteriofaga λ pocijepana restrikcijskim enzimom *Hin*dIII (Slika 3).



Slika 3. Rezultat provjere strukture plazmida pSP-G2 i pSP-YAP1. 1- DNA bakteriofaga λ pocijepana enzimom *Hin*dIII, 2- nepocijepani plazmid pSP-G2, 3-nepocijepani plazmid pSP-YAP1, 4-pSP-G2 pocijepan s *Eco*RV, 5-pSP-YAP1 pocijepan s *Eco*RV, 6-pSP-G2 pocijepan s *Nde*I, 7-pSP-YAP1 pocijepan s *Nde*I. Veličina fragmenata markera označena sa lijeve strane izražena je u parovima baza.

Na Slika 3 prikazani su rezultati provjere strukture plazmida. U drugoj jažici vidljive su dvije vrpce koje odgovaraju superzavijenom (donja vrpca) i relaksiranom (gornja vrpca) plazmidu pSP-G2. U trećoj jažici nalazi se plazmid pSP-YAP1 u superzavijenom obliku (donja vrpca) i relaksiranom obliku (gornja vrpca). U jažici 4 nalazi se plazmid pSP-G2 pocijepan s enzimom *Eco*RV, koji cijepa na jednom mjestu u plazmidu, vidljiva je jedna vrpca veličine 7351 pb koja odgovara veličini lineariziranog plazmida pSP-G2. U jažici 5 nalazi se plazmid pSP-YAP1 pocijepan enzimom *Eco*RV, koji također cijepa na jednom mjestu u plazmidu, i vidljiva je jedna vrpca veličine 9223 pb koja odgovara veličini lineariziranog plazmida pSP-YAP1. U jažici 6 nalazi se plazmid pSP-G2 pocijepan s enzimom *Nde*I, koji cijepa na jednom mjestu u plazmidu, i vidljiva je vrpca koja odgovara veličini lineariziranog plazmida. U jažici 7 nalazi se plazmid pSP-YAP1 pocijepan enzimom *Nde*I i vidljive su dvije vrpce. Naime, gen *YAP1* sadrži restrikcijsko mjesto za enzim *Nde*I, zbog čega plazmid pSP-YAP1 sadrži dva restrikcijska mjesta za enzim *Nde*I, a cijepanjem nastaju vrpce veličine 5274 pb i 3949 pb. Navedene vrpce na gelu odgovaraju očekivanim veličinama čime je potvrđena struktura plazmida.

4.2. Transformacija diploidnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanice kvasca transformirane su plazmidima pLUH, pSP-G2 i pSP-YAP1 prema protokolu opisanom u poglavlju **Pogreška! Izvor reference nije pronađen.** Zbog niske efikasnosti transformacije i malog broja dobivenih transformanata, eksperiment je proveden dva puta i u Tablica 2 prikazani su rezultati drugog eksperimenta.

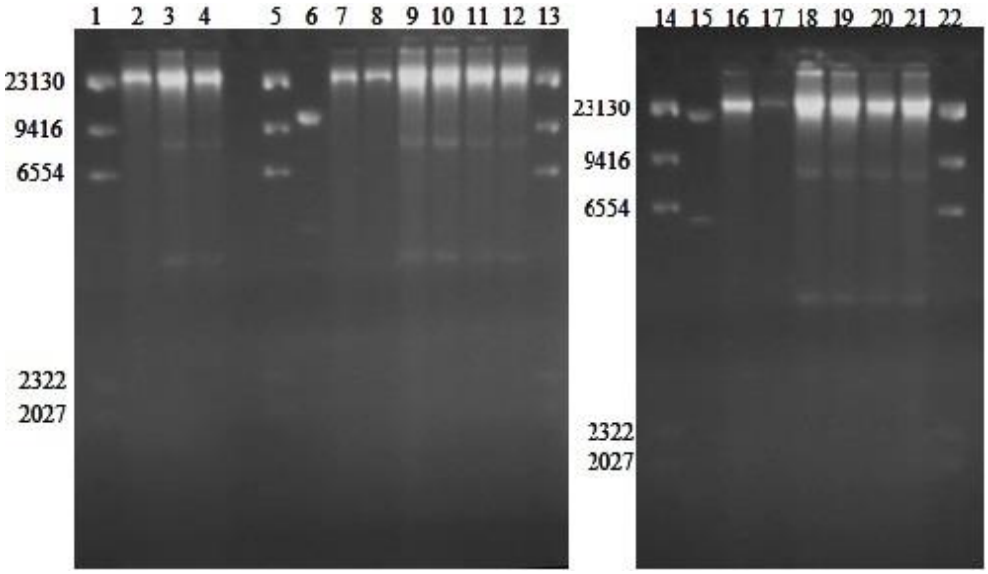
Tablica 2. Broj dobivenih transformanata i efikasnost transformacije. Efikasnost transformacije izražena je kao broj dobivenih transformanata po μg DNA

	Soj 2421	**Soj E5**	**Soj H1**	**Soj H2**
Efikasnost transformacije (pLUH)	552 tr μg^{-1}	80 tr μg^{-1}	128 tr μg^{-1}	152 tr μg^{-1}
pSP-G2	220	107	0	261
pSP-YAP1	110	129	0	295

Soj H1 jedini nije uspješno transformiran plazmidima pSP-G2 i pSP-YAP1. Naime, diploidni sojevi E5, 2421, H1 i H2 potječu od prirodnih izolata i već je prije uočeno da je za uspješnu transformaciju potrebno koristiti veću masu plazmidne DNA i modificirati protokol koji se inače koristi za transformaciju laboratorijskih sojeva (Pranklin, 2015). Kako bi se u budućnosti povećala efikasnost transformacije ovih sojeva, potrebno je odrediti koji od parametara transformacije najviše utječe, to jest podiže efikasnost transformacije (inkubacija na 28 °C ili 42 °C ili produljenje trajanja inkubacije u YPD prije nacjepljivanja na selektivne podloge). Stanice transformirane plazmidom pSP-G2 će u daljnjim istraživanjima služiti kao kontrola za usporedbu utjecaja gena *YAP1* na rezistenciju različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae* na inhibitore raste i ferementacije.

4.3. Izolacija DNA transformanata

Svi ishodni sojevi sadrže gen *URA3* disruptiran insercijom gena *kanMX* u okvir čitanja gena *URA3*, dok korišteni plazmidi sadrže gen *URA3*. Kako su transformanti uzgajani u minimalnim podlogama (soj E5 uzgajan je na minimalnoj podlozi sa histidinom jer je auksotrofni mutant za histidin) može se zaključiti da sadrže plazmide pSP-G2 i pSP-YAP1. Kako bi provjerili da li možemo izolirati i na gelu vizualizirati plazmide pSP-G2 i pSP-YAP1 pristupljeno je izolaciji DNA transfomanata uzgojenih u 4 mL kemijski definirane podloge koja ne sadrži uracil. Cjelokupna nepocijepana DNA nanesena je u gel, a kao kontrole korišteni su plazmidi pSP-G2 i pSP-YAP1 izolirani iz bakterije *E. coli* i DNA netransfomiranih sojeva (Slika 4). Naime, ukoliko su plazmidi u transformantima prisutni u dovoljno velikom broju kopija, očekuje se da nošenjem nepocijepanje izolirane DNA na gel kromosomska DNA zaostane u jažicama, dok će plazmidna DNA ući u gel i biti vidljiva kao dvije vrpce (superzavijeni i relaksirani plazmid).



Slika 4. Rezultati gel elektroforeze izolirane genomske DNA transformanata. 1, 5, 13, 14, 22- DNA bakteriofaga λ pocijepana enzimom *Hin*dIII, 2- DNA netransformiranog soja 2421, 3- DNA netransformiranog soja E5, 4- DNA netransformiranog soja H2, 6- nepocijepani plazmid pSP-G2, 7 i 8- DNA transformanata soja 2421, 9 i 10- DNA transformanata soja E5, 11 i 12- DNA transformanata soja H2, 15- nepocijepani plazmid pSP-YAP1, 16 i 17 - DNA transformanata soja 2421, 18 i 19- DNA transformanata soja E5, 20 i 21- DNA transformiranata soja H2.

Na rezultatima gel elektroforeze može se vidjeti da je iz svih uzorka uspješno izolirana DNA. U uzorcima koji potječu od transformanta s fenotipom Ura^+ nisu vidljive vrpce koje potječu od plazmidne DNA, što se može objasniti premalom izoliranom masom plazmidne DNA za vizualizaciju etidij bromidom. Naime, plazmidna DNA moglabi se uočiti ukoliko se ponovi izolacija iz većeg volumena kulture kvasca ili ukoliko bi se DNA nakon gel elektroforeze prenijela na membranu i napravila hibridizacija po Southern-u koristeći kao probu za hibridizaciju plazmid pSP-G2.

5. Zaključci

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Provjerom strukture plazmida pSP-G2 i pSP-YAP1 potvrđeno je da korišteni plazmidi imaju strukturu koja je prikazana na mapama plazmida.

2. Sojevi 2421, E5 i H2 su uspješno transformirani plazmidima pSP-G2 i pSP-YAP1.

6. Literatura

Alriksson, B., Horváth, I.S., Jönsson, L.J. (2010) Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors, *Process Biochemistry*, **45 (2)**, 264-271.

Armaleo, D.,Ye, G.N., Klein T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C., Johnston, S.A. (1990) Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.*, **17 (2)**:97-103.

Carter, D. M. (2005) Saccharomyces genome resequencing project. Wellcome Trust Sanger Institute <http://www.sanger.ac.uk/research/projects/genomeinformatics/sgrp.html> pristupljeno 21.lipnja 2016.

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

Cubillos, F.A., Louis, E.J., Liti, G. (2009) Generation of a large set of genetically tractable haploid and diploid *Saccharomyces* strains. *FEMS Yeast Res* **9**, 1217-1225.

Daehee Kim, Ji-Sook Hahn (2013) Roles of the Yap1 Transcription Factor and Antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s Tolerance to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural, Which Function as Thiol-Reactive Electrophiles Generating Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 5069-5077

Delorme, E. (1989) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by Electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 2242-2246.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**:**546**, 563-547.

Haber, J.E. (2012) Mating-Type Genes and MAT Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **191**, 33–64.

Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, **52**, 536-553.

Hinnen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R. (1978) Transformation of yeast. *Genetics*, **75**, 1929-1933.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983) Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations. *Journal of Bacteriology*, **153**, 163-168.

Klar, A.J.S., Hicks, J.B., Strathern, J.N. (1982) Directionality of Yeast Mating-Type Interconversion. *Cell*, **28**, 551-561.

Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Vassiliki, K., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O'Kelly, M.J.T., van Oudenaarden, A., Barton, D.B.H., Bailes, E., Nguyen, A.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, **458**, 337-341.

Perrone, G.G., Tan, S. X., & Dawes, I. W. (2008) *Biochimica et Biophysica Acta*, **1783**, 1354–1368.

Powell, C.D., Quain, D.E., Smart, K.A. (2003) Chitin scar breaks in aged *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **149**, 3129–3137.

Pranklin, A. (2015) Konstrukcija i određivanje osjetljivosti hibridnih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na inhibitore rasta. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.

Primrose, S.B., Twyman, R. (2006) Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7. izd., Wiley-Blackwell, Oxford.

Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J., (1992) Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *Yeast*, **8**, 423-488.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3. izd., Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York.

Sherman, F. (2002) Getting Started with Yeast. *Methods Enzymol*, **350**, 3-41.

Stanford University, Saccharomyces genome database <http://www.yeastgenome.org/>. Pristupljeno 25. travnja 2016.

Tamarin, R.H. (2001) Principles of genetics, 7. izd., McGraw-Hill Publishers, New York.

Temple, M.D., Perrone, G.G., Dawes, I.W. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol*. **15 (6)**, 319-26.

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