

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Klara BOJANOVIČ

**UPORABA RNAi ZA ODKRIVANJE GENOV  
VIRULENTNIH DEJAVNIKOV KVASOVKE**

*Candida glabrata*

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Klara BOJANOVIČ

**UPORABA RNAi ZA ODKRIVANJE GENOV VIRULENTNIH  
DEJAVNIKOV KVASOVKE *Candida glabrata***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**DEVELOPMENT OF RNAi TOOLS TO STUDY VIRULENT GENES  
IN *Candida glabrata* YEAST**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju na Department of Biology, Faculty of Science, Lund University (Sweden).

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Tadejo Matos, za somentorja prof. dr. Jureta Piškurja in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Mentorica: doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.

Somentor: prof. dr. Jure Piškur

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Vladimir Kotnik, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Jure Piškur  
Univerza v Lundu, Fakulteta za znanost, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Klara Bojanovič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.25+602.6:582.28:577.2.083(043)=163.3
KG	kvasovke/ <i>Candida glabrata</i> /RNAi/virulenčni geni/molekularno kloniranje/rekombinantni plazmidi/protismiseln konstrukti/lasnični konstrukti
AV	BOJANOVIČ, Klara, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	MATOS, Tadeja (mentorica)/PIŠKUR, Jure (somentor)/MANDIĆ-MULEC, Ines (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2013
IN	UPORABA RNAi ZA ODKRIVANJE GENOV VIRULENTNIH DEJAVNIKOV KVASOVKE <i>Candida glabrata</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XIII, 69 str., 8 pregli., 19 sl., 2 pril., 38 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AB	<p><i>Candida glabrata</i> je bila v preteklosti poznana kot relativno nepatogena saprofitna kvasovka normalne človeške mikrobne flore, v zadnjih treh desetletjih pa število sistemskih okužb s <i>C. glabrata</i> narašča. Kljub temu, da je <i>C. glabrata</i> postala porajajoča se patogena kvasovka, je znanih le nekaj genov in mehanizmov, ki so povezani z virulenco te kvasovke. Zato želimo razširiti znanje o njenem virulenčnem potencialu. V ta namen je v razvoju RNAi orodje, s katerim lahko utišamo izražanje tarčnih genov in na ta način raziskujemo njihovo funkcijo. Za našo raziskavo smo izbrali 7 genov, ki so zelo verjetno povezani z virulenco <i>C. glabrata</i>. S pomočjo metod molekularnega kloniranja smo pomnožili potrebne elemente (promotorji, smiseln in protismiseln deli ter terminatorji) tarčnih genov ter z njimi razvili rekombinantne plazmide s protismiselnimi in lasničnimi konstrukti tarčnih genov. Ugotovili smo, da je ligacija protismiselnih konstruktov uspešnejša od ligacije lasničnih konstruktov. Nastale rekombinantne plazmide smo transformirali v predhodno ustvarjena seva kliničnega izolata ter divjega tipa z vnešenima genoma za encima Dicer in Argonaut. Uspešno smo ustvarili vseh 7 protismiselnih konstruktov in 2 lasnična ter jih transformirali v <i>C. glabrata</i>. Tako smo ustvarili 18 novih rekombinantnih sevov, ki jih bomo študirali v prihodnosti.</p>

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 579.25+602.6:582.28:577.2.083(043)=163.3
CX	yeasts/ <i>Candida glabrata</i> /RNAi/virulence genes/molecular cloning/recombinant plasmids/antisense constructs/hairpin constructs
AU	BOJANOVIČ, Klara
AA	MATOS, Tadeja (supervisor)/PIŠKUR, Jure (co-advisor)/MANDIĆ-MULEC, Ines (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY	2013
TI	DEVELOPMENT OF RNAi TOOLS TO STUDY VIRULENT GENES IN <i>Candida glabrata</i> YEAST
DT	M. SC. THESIS (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO	XIII, 69 p., 8 tab., 19 fig., 2 ann., 38 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	In the past <i>Candida glabrata</i> has been known as a relatively non-pathogenic saprophyte yeast of normal human microbial flora, but in the last 3 decades the incidence of the infections with <i>C. glabrata</i> has increased. Even though <i>C. glabrata</i> is an emerging human pathogen so far little is known about genes and mechanisms that are connected to its pathogenicity. We attempted to expand the knowledge about virulence potential of <i>C. glabrata</i> . Recently RNAi tools have been developed in our laboratory to study the gene expression. For this study we chose 7 genes that are likely responsible for the virulence of <i>C. glabrata</i> . With the methods of molecular cloning we amplified all of the required elements (promoters, sense and antisense parts and terminators) of the target genes and constructed recombinant plasmids with antisense and hairpin constructs of the target genes. We noticed that the ligation of antisense construct was more efficient than the ligation of hairpin constructs. New recombinant plasmids were transformed into developed strains with introduced gene for the enzymes Dicer and Argonaute. We successfully constructed all 7 antisense and 2 hairpin constructs and transformed them into <i>C. glabrata</i> . All together we created 18 new recombinant strains which will be tested for their gene expression and different traits.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC .....	VIII
KAZALO SLIK .....	IX
KAZALO PRILOG .....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
SLOVARČEK .....	XII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE .....	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	3
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>4</b>
2.1 <i>Candida glabrata</i> – LASTNOSTI, EPIDEMIOLOGIJA, KLINIČNE MANIFESTACIJE .....	4
2.2 PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI .....	5
2.3 RNA INTERFERENCA (RNAi) .....	9
2.4 RNAi V BRSTEČIH SE KVASOVKAH .....	11
2.5 PRIMERJAVA METOD: DELECIJA GENA PROTI ZMANJŠANJU IZRAŽANJA GENA .....	12
2.6 MOLEKULARNO KLONIRANJE .....	13
2.6.1 Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo.....	14
2.6.2 Restriktionsko-ligacijska metoda.....	14
2.6.3 Vektor.....	15
2.7 TRANSFORMACIJA .....	16
2.7.1 Transformacija pri bakterijah.....	16
2.7.2 Elektroporacija .....	17

<b>2.7.3 Transformacija pri kvasovkah .....</b>	<b>17</b>
<b>2.7.4 Selekcija transformant .....</b>	<b>18</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 POTEK DELA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 SEVI, PLAZMIDI IN IZBRANI GENI ZA RAZISKAVO.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.1 Sevi in plazmid .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.2 Geni za raziskovanje.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 MATERIALI .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.1 Mikrobiološka gojišča.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.2 Pufri in raztopine .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.3 Laboratorijska oprema .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.4 Reagenti .....</b>	<b>32</b>
<b>3.4 METODE .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.1 Izolacija celotne kvasne DNA .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....</b>	<b>33</b>
3.4.2.1 Pomnoževanje DNA z PCR .....	33
3.4.2.2 PCR za prekrivanje fragmentov .....	34
3.4.2.3 Kontrolni PCR na osnovi kolonije .....	37
3.4.2.4 Kontrolni PCR novonastalih rekombinantnih kvasnih sevov .....	37
<b>3.4.3 Agarozna gelska elektroforeza.....</b>	<b>38</b>
<b>3.4.4 Ekstrakcija fragmentov DNA iz agaroznega gela.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.5 Restrikcija.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.6 Defosforilacija .....</b>	<b>41</b>
<b>3.4.7 Ligacija.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4.8 Priprava kompetentnih <i>E. coli</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.9 Transformacija v <i>E. coli</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.10 Izolacija plazmida iz <i>E. coli</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4.11 Transformacija kvasovke <i>C. glabrata</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>3.4.12 Seleksijski test presajanja .....</b>	<b>45</b>
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>46</b>

<b>5 RAZPRAVA .....</b>	<b>59</b>
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>64</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>65</b>
<b>8 VIRI.....</b>	<b>66</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Geni, ki so povezani z virulenco pri <i>C. glabrata</i> .....	8
Preglednica 2: V raziskavi uporabljeni mikroorganizmi in plazmid.....	22
Preglednica 3: Geni, ki smo jih uporabili v raziskavi ( <i>Candida</i> Genome Database, 2012).....	24
Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema. ....	30
Preglednica 5: Ostali uporabljeni pripomočki v laboratoriju. ....	31
Preglednica 6: Uporabljeni reagenti. ....	32
Preglednica 7: Novi rekombinantni plazmidi s protismiselnim in zankastim konstruktom. .....	54
Preglednica 8: Novi sevi kvasovk <i>C. glabrata</i> z RNAi mehanizmom in protismiselnimi ter lasničnimi konstrukti. ....	57

## KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizem delovanja RNAi: dsRNA in RNA lasnice so s pomočjo encima Dicer razrezane v male siRNA, ki nato aktivirajo kompleks RISC (Bio-it World, 2003)....	10
Slika 2: Kladogram prikazuje posamezne vrste iz kraljestva gliv (Drinnenberg in sod., 2009).....	12
Slika 3: Shema poteka dela.....	20
Slika 4: Plazmid P1061. ....	22
Slika 5: Celotna genomska DNA kvasovke <i>C. glabrata</i> CBS 138. ....	46
Slika 6: Protismiseln konstrukt s promotorskim in terminatorskim zaporedjem. ....	46
Slika 7: Lasnični konstrukt s promotorskim in terminatorskim zaporedjem. ....	47
Slika 8: Standardna 1 kb DNA lestvica in PCR pomnožki za lasnični in protismiseln konstrukt gena CAGL0A00517g.....	47
Slika 9: Očiščeni PCR pomnožki za lasnični in protismiseln konstrukt gena CAGL0A00517g. ....	48
Slika 10: Nastali združeni fragmenti po PCR reakciji za gen CAGL0A00517g.....	49
Slika 11: Shema restrikcije protismiselnih in lasničnih insertov.....	50
Slika 12: Fragmenti po restrikciji z <i>BglII</i> in <i>SphI</i> za gen CAGL0A00517g. ....	50
Slika 13: Vektor P1061 pred in po restrikciji z encimom <i>SphI</i> .....	51
Slika 14: Rekombinantni plazmidi. ....	52
Slika 15: Kontrolni PCR na osnovi kolonij za gen CAGL0M05049g. ....	53
Slika 16: Restriktijsko kartiranje plazmidov z encimom <i>SacI</i> .....	54
Slika 17: Rezanje rekombinantnih plazmidov z encimom <i>SacII</i> .....	55
Slika 18: Preverjanje stabilnosti transformiranih kvasovk na minimalnem in bogatem gojišču.....	56
Slika 19: Kontrolni PCR za prisotnost lasničnih in protismiselnih vključkov v genomu kvasovk <i>C. glabrata</i> .....	58

## KAZALO PRILOG

Priloga A: V raziskavi uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnožitev promotorjev, smiselnih in protismiselnih delov tarčnih genov ter terminatorjev

Priloga B: Sekvence protismiselnih in lasničnih vključkov tarčnih genov

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>bp</b>	bazni par
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina
<b>RNAi</b>	angl. RNA interference
<b>rpm</b>	obrati na minuto
<b>YNB</b>	angl. nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate
<b>YPD</b>	angl. yeast peptone dextrose

## SLOVARČEK

<b>pseudohife</b>	skupki celic v obliki verižice, ki nastanejo pri brstenju in se ne ločijo od materinske celice in so podobni hifam
<b>saprofit</b>	organizem, ki razgrajuje živalske in rastlinske ostanke
<b>dimorfizem</b>	sposobnost nekaterih gliv, da rastejo v filamentozni in kvasni obliki
<b>kandidoza</b>	glivična okužba z eno izmed vrst rodu <i>Candida</i>
<b>lektin</b>	protein, ki se veže na ogljikove hidrate in povzroči zlepljanje, precipitacijo
<b>kariotip</b>	število in lastnosti kromosomov določene vrste
<b>ABC transporter</b>	od ATP-odvisen transmembranski protein, ki transportira različne substrate skozi membrane celic
<b>ergosterol</b>	sterol, ki je sestavni del celične membrane pri glivah
<b>ortologi</b>	geni, ki so prisotni v različnih vrstah in so podobni zaradi skupnega izvora, nastali pa so z ločitvijo vrst
<b>mRNA</b>	informacijska RNA, na podlagi katere v procesu transkripcije nastane določen protein
<b>konstitutivni promotor</b>	promotor, ki regulira gene, ki se izražajo neprekinjeno in skrbijo za osnovni metabolizem celic
<b>inducibilni promotor</b>	promotor, ki regulira gene, ki se izražajo le ob določenem dražljaju ali le ob določenem času
<b>rekombinantna DNA</b>	molekula DNA, ki je sestavljena iz fragmenotv DNA različnega izvora
<b>smiselna veriga dvojne vijačnice</b>	veriga dvojne vijačnice, ki izgleda kot mRNA in kodira zapis za protein
<b>protismiselna veriga dvojne vijačnice</b>	veriga, ki je komplementarna smiselni verigi in ne nosi zapisa za protein, ampak je le matrica za nastanek mRNA
<b>terminator</b>	del DNA zaporedja, ki je pomemben za ustavitev prepisovanja mRNA med transkripcijo

<b>prototrof</b>	celice, ki same sintetizirajo vse aminokisline, nukleotide in vitamine ter lahko zato rastejo na minimalnem gojišču
<b>avksotrof</b>	celice, ki imajo okvarjen vsaj en gen, zaradi katerega ne morejo rasti na minimalnem gojišču, zato potrebujejo dodan avksotrofni marker
<b>lasnični konstrukt</b>	konstrukti, ki vsebujejo palindromsko zaporedje tarčnega gena in po prepisu tvorijo dsRNA molekulo, ki vmes vsebuje zanko
<b>protismiselni konstrukt</b>	vsebuje protismiselni del tarčnega gena in ob izražanju skupaj s tarčnim genom tvori dsRNA
<b>RT-PCR</b>	reverzna transkripcija s sledično verižno reakcijo s polimerazo (angl. reverse transcription polymerase chain reaction)
<b>cDNA</b>	DNA, ki nastane z reverznim prepisom mRNA

## 1 UVOD

Kvasovke *Candida* spp. so najpogosteje izolirane v ustni votlini in urogenitalnem traktu, zaznamo pa jih pri približno 31-55 % zdravih ljudi. V zadnjem času se je število glivičnih sistemskih in sluzničnih okužb povečalo, prav tako pa se je povečala tudi smrtnost zaradi le-teh. V krvnih kulturah imunsko oslabljenih bolnikov se tako med glivnimi povzročitelji najpogosteje diagnosticira kvasovke *Candida* spp. (Silva in sod., 2012), sicer pa so te kvasovke četrti najpogosteje izoliran mikroorganizem v hemokulturah hospitaliziranih bolnikov (Fidel in sod., 1999). Do nedavnega je bila *Candida albicans* diagnosticirana kot povzročitelj več kot 80 % kandidoz in je tako najpogostejši človeški patogen med glivnimi okužbami, v zadnjih letih pa se število kandidoz, ki jih povzročajo ostale kvasovke rodu *Candida*, signifikantno povečuje in dandanes so le-te znane kot pomembni porajajoči se oportunistični patogeni (Silva in sod., 2012). V preteklosti je bila *Candida glabrata* poznana kot relativno nepatogen saprofit normalne mikrobne flore zdravih pozameznikov, ki redko povzroča resne okužbe pri človeku (Fidel in sod., 1999). *C. glabrata* je sedaj poznana kot drugi najpogostejši pozvročitelj kandidoze pri človeku (Fidel in sod., 1999). Poleg okužb imunsko oslabljenih bolnikov pa povzroča tudi vaginalne kandidoze, ki se pojavijo pri treh četrtinah vseh zdravih imunsko kompetentnih žensk vsaj enkrat v življenju (Mardh in sod., 2002).

Vzroki za naraščajoče porajanje kandidoz v zadnjih tridesetih letih so verjetno povečanje števila okuženih z virusom HIV, vedno starejša populacija, povišanje števila imunsko oslabljenih ljudi, pogosta uporaba širokospektralnih antibiotikov in večje število invazivnih kirurških posegov. Razlog za to pa so lahko tudi izboljšane diagnostične metode (Silva in sod., 2012).

*C. glabrata* se je v raziskavah na živalskih modelih pred leti izkazala za relativno nepatogeno kvasovko, ki ima le nekaj atributov, ampak visoka umrljivost ter vedno večja incidenca okužb pričata, da temu ni tako. Število raziskav s *C. glabrata* je manjše v primerjavi s *C. albicans*, zato o patogenosti in virulenčnih dejavnikih kvasovke ni veliko znanega (Fidel in sod., 1999). *C. glabrata* je filogenetsko bližnji sorodnik *Saccharomyces*

*cerevisiae*, obe vrsti pa sta dokaj oddaljeni od *C. albicans* (Dujon in sod., 2004). Posebna je tudi v tem, da ni dimorfna, saj jo najdemo le v kvasni obliki, prav tako pa je haploid, medtem ko sta *S. cerevisiae* in *C. albicans* običajno diploidni glivi. *C. glabrata* izkazuje velike raznolikosti v kariotipih in med okužbo se njen genom lahko spreminja zelo hitro (Polakova in sod., 2009).

RNAi mehanizem je mehanizem utišanja genov, ki je evolucijsko zelo ohranjen med evkarionskimi organizmi in ima pomembno vlogo pri razvoju in delovanju mnogih celic. Zanimivo je, da tega mehanizma ne najdemo pri nekaterih brstečih se kvasovkah kot je *S. cerevisiae* in *C. glabrata*, medtem ko je prisoten na primer pri *C. albicans* (Drinnenberg in sod., 2009). V zadnjih letih je RNAi mehanizem postal široko uporabljeno orodje za raziskovanje in analiziranje funkcij posameznih genov, vse od praživalskih do človeških. Poleg raziskovalnega pa ima tudi velik farmacevtski potencial za zdravila, ki bi utišala gene, ki so povezani z razvojem bolezni (Leung in Whittaker, 2005).

Vse torej kaže na to, da moramo *C. glabrata* razumeti bolje, da se lahko proti njej borimo in da ugotovitve v raziskavah *C. albicans* ne moremo preprosto prenesti na *C. glabrata* (Fidel in sod., 1999). V laboratoriju prof. Jureta Piškurja v Lundu na Švedskem v ta namen razvijajo RNAi orodje, s katerim želijo dobiti vpogled v virulenčni potencial *C. glabrata* in kasneje karakterizirati novo odkrite gene, povezane z virulenco, kar bo odprlo nove možnosti za razvoj vrstno-specifičnih zdravil.

### 1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

Namen raziskave je s pomočjo molekularnih metod razviti RNAi orodje za raziskovanje funkcij posameznih genov za raziskovanje virulenčnega potenciala kvasovke *C. glabrata*.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pomnožiti promotorje, smiselne in protismiselne dele določenih genov ter terminatorje z verižno reakcijo s polimerazo ter jih uspešno združiti z vektorjem v rekombinantne plazmide z ligacijo.
- Uspešno transformirati rekombinantne konstrukte v kvasovke *C. glabrata*.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 *Candida glabrata* – LASTNOSTI, EPIDEMIOLOGIJA, KLINIČNE MANIFESTACIJE

*Candida glabrata* je kvasovka, ki je bila v preteklosti znana kot nepatogen saprofit, danes pa jo štejemo med porajajoče se patogene glive (Silva in sod., 2012). Opisanih je že preko 200 vrst *Candida* spp., vendar 95 % okužb povzročajo le nekatere med njimi: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* in *C. tropicalis* (Pfaller in Diekema, 2004). Podatki kažejo, da je *C. albicans* kriva za več kot polovico kandidoz, okužbe z ostalimi vrstami *Candida*, kot na primer *C. glabrata* (14 %), *C. tropicalis* (14 %), *C. parapsilosis* (7 %), *C. krusei* (2 %) pa so vedno pogostejše (Lass-Flörl, 2009). Ti odstotki so nekoliko različni v različnih državah po svetu, razlikujejo pa se tudi med skupinami bolnikov in glede na mesto okužbe (Silva in sod., 2012). Epidemiološke študije v Evropi in Združenih državah Amerike kažejo, da je incidenca kandidoz začela naraščati po letu 1970 (Lass-Flörl, 2009), število okužb pa še vedno narašča, predvsem pri imunsko oslabljenih bolnikih. V zadnjih tridesetih letih relativna incidenca okužb s *C. albicans* pada, narašča pa število okužb z ostalimi vrstami *Candida*. Signifikanten porast je opažen predvsem pri okužbah, povzročenih s *C. glabrata* (Silva in sod., 2012). Problem predstavlja predvsem zato, ker je zelo odporna proti azolom in ostalim antimikotikom, ki jih uporabljam za zdravljenje (Pfaller in Diekema, 2004). Smrtnost zaradi okužb s kvasovkami *Candida* spp. se v Evropi giba med 28-59 %, odvisno od vrste kvasovke in države, najvišji delež smrtnosti pa so zaznali pri bolnikih okuženih s *C. glabrata* (Lass-Flörl, 2009).

Kvasovke *Candida* spp. so del normalne mikrobne flore človeka na koži ter v prebavnem in urogenitalnem traktu, najdemo pa jih tudi v okolju. Tako je vzrok za okužbe s *Candida* spp. lahko endogen ali eksogen (Lass-Flörl, 2009). *C. glabrata* je gliva, ki se pojavlja le v kvasni obliki, saj ne tvori niti psevdohif pri temperaturah nad 37 °C in je edina med vrstami *Candida*, ki ni dimorfna. Tako je bila v preteklosti klasificirana v rod *Torulopsis* ravno zaradi te lastnosti (Fidel in sod., 1999). Kvasovka je sferične oblike in velikosti 1-4

um. Od ostalih vrst *Candida* spp. se razlikuje tudi po tem, da jo v naravi najdemo le v haploidni obliki, medtem ko je večina ostalih diploidnih (Silva in sod., 2012). Od *C. albicans* jo ločimo dokaj preprosto – *C. glabrata* kvasne celice so manjše, prav tako so kolonije na gojišču manjše, na komercialnem kromatogenem gojišču se *C. albicans* obarva modro-zeleno, medtem ko se *C. glabrata* obarva vijolično-roza (Fidel in sod., 1999). CBS 138 je sekvencioniran sev kvasovke *C. glabrata* in ima trinajst kromosomov (A-M). Velikost genoma je 12,3 Mb in ima 5283 kodirajočih se zaporedij (Dujon in sod., 2004).

*C. glabrata* povzroča različne klinične slike, in sicer od površinskih do sistemskih okužb. Med površinske okužbe štejemo okužbe žrela (akutna pseudomembranozna kandidoza), vagine, prebavnega (najpogosteje požiralnik) in urinarnega trakta. Večina imunsko kompetentnih žensk ima občasne in ne komplikirane vaginoze, nekje 10 % žensk pa trpi za bolj resnimi in pogostimi okužbami. Okužbe urinarnega trakta so pogostejše pri bolnikih s katetri in med hospitaliziranimi bolniki *Candida* spp., povzročajo nekje 10 % teh okužb, kjer je *C. glabrata* na drugem mestu med njimi (Fidel in sod., 1999).

## 2.2 PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI

Kandidoza je glivična okužba z eno izmed vrst rodu *Candida* z različnimi kliničnimi znaki (Lass-Flörl, 2009). DNA tipizacija sevov vrst rodu *Candida* pri bolnikih, obolelih z AIDS-om, je pokazala, da kandidoz verjetno ne povzročajo določeni bolj patogeni sevi, ampak lahko pride do okužbe s katerim koli sevom ob spremembri normalne mikrobne flore ali padcu gostiteljevih obrambnih mehanizmov (Fidel in sod., 1999). Da lahko mikroorganizem povzroči bolezensko stanje, mora imeti virulentne dejavnike, ki povzročijo škodo pri gostitelju (Fidel in sod., 1999). Kot predpogoj za okužbo je najprej potrebna kolonizacija sluzničnih membran ali prebavnega trakta (Lass-Flörl, 2009; Silva in sod., 2012). *Candida* ima kar nekaj virulentnih dejavnikov kot so adhezija ter tvorba biofilmov in hidrolitičnih encimov, problem pa je lahko tudi visoka odpornost na različne antimikotike, posebej azole.

*C. glabrata* ima adhezine na celični površini, imenovane *EPA*, ki ji omogočajo pritrditev na površine medicinskih aparatov kot so urinski katetri in žilni vsadki. Prav tako pa je že sama površina celic *C. glabrata* hidrofobna, kar ji olajša pritrjevanje na hidrofobne podlage. Epa1p je od kalcija odvisen lektin in kljub velikemu številu *EPA* genov se adhezija *in vitro* zmanjša zgolj z delecijo *EPA1*. Da se *C. glabrata* dobro prilagaja okoljskim spremembam, priča to, da na primer *EPA6* *in vitro* ni izražen, kar pa se spremeni med okužbo urinarnega trakta *in vivo*. *Candida* spp. tvori biofilme, ki pripomorejo k zmanjšani občutljivosti na terapije z antimikotiki in zaščitijo kvasne celice pred gostiteljevim imunskim sistemom (Silva in sod., 2012). Ko so celice v stresu, je za preživetje zelo pomembna prilagoditev izražanja določenih genov. Pri *S. cerevisiae*, *C. albicans* in *Schizosaccharomyces pombe* je Msn2p pomemben transkripcijski faktor pri odzivu na različne stresne pogoje v okolju in pri *C. glabrata* so odkrili dva ortologa; Cg *MSN2* in Cg *MSN4*, ki sta prav tako zelo pomembna pri odzivu na stres (Roetzer in sod., 2008).

Pomemben virulenčni dejavnik je tudi tvorba hidrolitičnih encimov, ki pomagajo poškodovati tkivo gostitelja. Tako je znano, da *C. glabrata* tvori sekrecijske aspartil proteinaze, imenovane Saps, fosfolipaze in hemolizine. Saps so proteinaze, ki poškodujejo strukturne proteine in proteine, ki so del imunskega odziva v membranah sluznic. Fosfolipaze poškodujejo celične membrane gostiteljevih celic, kar lahko povzroči izpostavitev receptorjev, na katere se kvasovka nato pritrdi. Hemolizini so glavni faktor, ki patogenemu mikroorganizmu omogočajo preživetje in obstoj v gostitelju, saj z razgradnjo rdečih krvničk kvasovki priskrbijo zadostne količine železa, ki so običajno limitni faktor (Silva in sod., 2012).

*C. glabrata* je zelo odporna proti konvencionalnim antimikotikom, njeni mehanizmi rezistence pa so tako pridobljeni kot prirojeni (Silva in sod., 2012). *C. glabrata* je že po naravi manj dovetna za flukonazol in amfotericin B v primerjavi z ostalimi kvasovkami *Candida*, a kaže tudi zmožnost hitrega razvoja odpornosti proti azolom. Raziskave kažejo, da subinhibitorne koncentracije flukonazola povečajo odpornost kvasovk (Pfaller in Diekema, 2004). Flukonazol spada med azole in je najpogosteje uporabljen antimikotik, ki

ustavi biosintezo ergosterolov z inhibicijo encima lanosterol demetilaza, ki lanosterol pretvori v ergosterol (Silva in sod., 2012). Glavni mehanizmi za razvoj odpornosti pri *C. glabrata* so povečano izražanje treh ABC transporterjev, *CDR1*, *PDH1/CDR2* in *MDR1* ali večje izražanje in modifikacije tarčnega encima (Henry in sod., 2000). V eni od raziskav so ugotovili, da ima gen *CgAUS1*, ki je ortolog sterolnih transporterjev pri *S. cerevisiae*, vlogo pri zmanjšani dovzetnosti na azole (Nakayama in sod., 2007). V *C. glabrata* so odkrili tudi ortolog proteina Pdr1p, CgPdr1p, ki regulira iztočne črpalke za zdravila in tako regulira ter zmanjša odpornost proti mnogim antimikotikom (Vermitsky in sod., 2006). Skn7p je pri mnogih patogenih glivah in *S. cerevisiae* znan transkripcijski faktor, ki omogoča preživetje v oksidativnem stresu, delecija ortologa pa zmanjša patogenezo *C. glabrata* v mišjih modelih (Saijo in sod., 2010).

*C. albicans* tvori pseudohife, ki povečajo pritrjevanje na podlago in omogočajo vdor v tkiva. *C. glabrata* pseudohif ne tvori, kar je lahko eden izmed razlogov, da je patogena v manjši meri kot *C. albicans* (Silva in sod., 2012). Virulenta kvasovka *C. glabrata* je povezana tudi s tem, da se je kvasovka sposobna razmnoževati znotraj makrofagov, kjer ustavi aktivacijo reaktivnih kisikovih spojin in citokinov, pri tem pa makrofagov ne uniči oz. niti ne poškoduje. Da lahko *C. albicans* vdre v tkiva, sta poglavitni lastnosti tvorba hif in sekrecija mnogih hidrolitičnih encimov, teh atributov pa *C. glabrata* v veliki meri nima oz. hif sploh ne tvori, tako je izzik imunskemu odzivu verjetno poglavitna lastnost, ki kvasovki omogoča povzročanje okužb. Po vstopu v makrofage se *C. glabrata* prilagodi okolju in v njih preživi, hkrati pa makrofagi ostanejo nepoškodovani dolgo časa. Strategija *C. albicans* pa je nasprotna, saj iz makrofagov hitro pobegne. V primerjavi s *C. glabrata* in *C. albicans* makrofagi uspešno odstranijo celice *S. cerevisiae*, ki je nepatogena kvasovka. *C. glabrata* znotraj makrofagov preživi verjetno zaradi spremembe izražanja mnogih genov in razgradnje ter recikliranja endogenih celičnih komponent (Seider in sod., 2011).

Celična stena je pomembna pri interakcijah patogenih mikroorganizmov z gostitelji in pri *Candida* spp., v njej poleg ostalih polisaharidov najdemo tudi velik delež β-mananov, ki pomagajo pri adheziji in sprožijo imunski odziv. Pri *C. albicans* so odkrili devet genov, ki kodirajo β-manozil transferaze, ki so vključene v glikolizacijo proteinov in lipidov z

manani, imenovanimi *BMT*, pri *C. glabrata* pa sedem genov. V raziskavi so ustvarili seve *C. glabrata* z delecijo petih *BMT* genov (*bmt2-6*) in na testih v miših ugotovili, da so te mutante postale mnogo manj patogene v primerjavi z divjim tipom, kar kaže, da imajo ti geni pomembno vlogo pri povzročanju okužb. Razlika med mutantami in divjim tipom je bila predvsem v zmanjšani kolonizaciji prve (Jawahara in sod., 2012).

Preglednica 1 prikazuje nekaj do sedaj poznanih genov, ki so povezani z virulenco pri *C. glabrata*.

Preglednica 1: Geni, ki so povezani z virulenco pri *C. glabrata*.

Geni, povezani z virulenco	Vloga	Vir
<i>EPA</i>	adhezini	Silva in sod., 2012
<i>MSN2, MSN4</i>	transkripcijski faktor pri odzivu na stresne pogoje v okolju	Roetzer in sod., 2008
<i>SAP</i>	hidrolitične proteinaze	Silva in sod., 2012
<i>CDR1, PDH1/CDR2</i> in <i>MDR1</i>	ABC transporterji	Henry in sod., 2000
<i>AUS1</i>	transporter sterolov	Nakayama in sod., 2007
<i>PDR1</i>	iztočne črpalki za različna zdravila	Vermitsky in sod., 2006
<i>SKN7</i>	transkripcijski faktor pri odzivu na oksidativni stres	Saijo in sod., 2010
<i>BMT</i>	β-manozil transferaze, vloga pri adheziji	Jawahara in sod., 2012

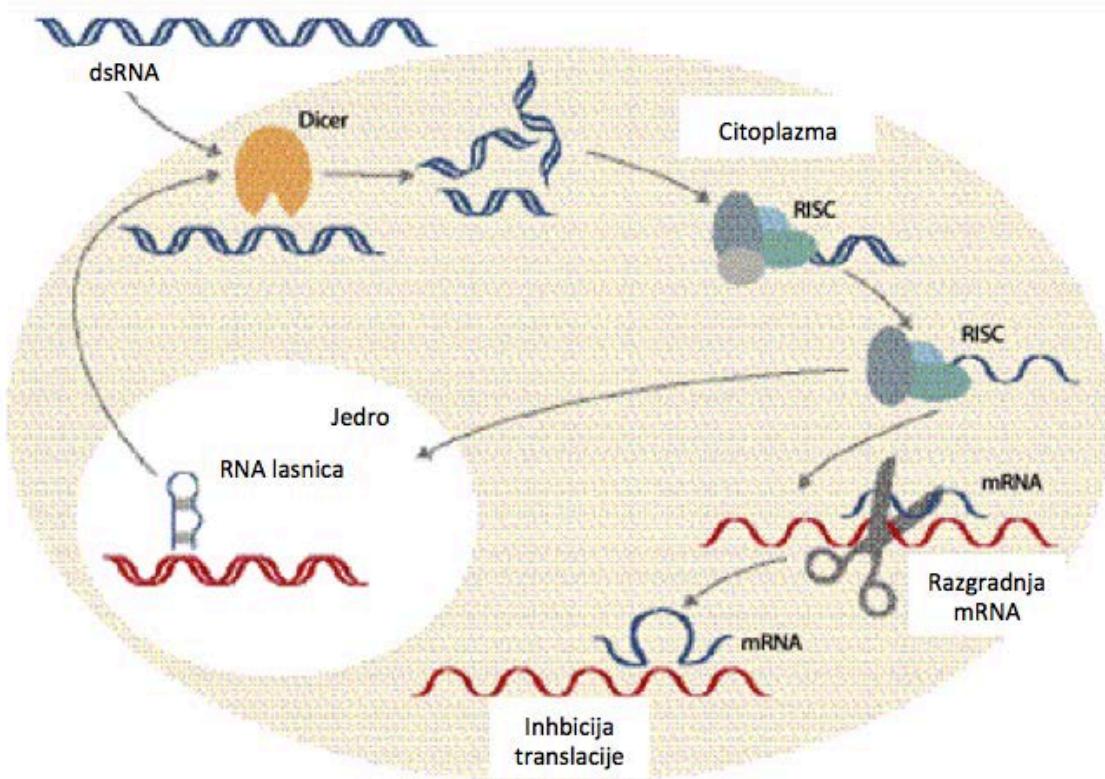
*C. glabrata* izkazuje velike raznolikosti v kariotipih in med okužbo se njen genom hitro spreminja (Polakova in sod., 2009). V raziskavi, ki je vključevala 192 sevov patogenih *C. glabrata* danskih bolnikov s sistemsko okužbo, so ugotovili, da so si sevi med sabo sorodni, ampak imajo zelo raznolike kariotipe. Od tega je devet sevov vsebovalo dodaten majhen kromosom, ki je bil manjši od 0.5 Mb, in izgleda, da ti povečajo patogenost sevov (Ahmad in sod., 2013).

Kljub temu, da je *C. glabrata* pomemben človeški patogen, so mehanizmi, povezani z virulenco in obrambo gostitelja, slabo raziskani. Do sedaj je bilo odkritih že nekaj genov,

povezanih z virulenco, ter genov, ki so domnevno povezani z njo, vendar obstaja potreba po odkritju novih in raziskovanju domnevnih (Seider in sod., 2011).

### 2.3 RNA INTERFERENCA (RNAi)

Interferenčna RNA ali RNAi (angl. RNA interference) je evolucijsko ohranjen mehanizem utišanja genov, ki ga najdemo pri različnih evkariotskih organizmih, kot so rastline, *Neurospora*, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* in sesalci. Fenomen je bil najprej opažen pri rastlinah, molekularni mehanizem pa je bil prvič opisan pri glisti *C. elegans*. Mehanizem utišanja je posttranskripcijski in deluje na podlagi utišanja sekvenčno specifičnega gena (Leung in Whittaker, 2005). Je biološki odgovor na prisotnost dolge dvoverižne RNA (dsRNA), ki se pojavi v celici z integriranimi transpozoni, ob aktivnem podvajjanju virusov, ob transkripciji celičnih genov kot dsRNA (>30 baznih parov) ali v obliki lasnice (angl. hairpin), lahko pa jo tudi sintetiziramo in vstavimo v celice. RNAi mehanizem začne delovati v citoplazmi, ko encim Dicer dolgo dsRNA ali RNA lasnico razreže na 21-23 baznih parov (bp) dolge majhne interferenčne RNA molekule (siRNA) z dvema štrlečima nukleotidoma na 3'-koncu in fosfatno skupino na 5'-koncu. Dicer je endoribonukleaza, ki spada v družino encimov RNaze III in je evolucijsko ohranjen med različnimi evkarionti. Dicer ima dve katalitski domeni in vsebuje PAZ motiv. siRNA nato aktivira kompleks RISC (angl. RNA-induced silencing complex), ki inducira utišanje gena. Ta kompleks je sestavljen iz mnogih komponent, med katerimi sta pomembna helikaza, ki odvije dvovijačno RNA, ter encim Argonaut. Ta razreže in se znebi smiselnega dela siRNA, protismiseln del pa vodi kompleks do homologne mRNA, ki jo prepozna na podlagi parjenja baznih parov. Argonaut je endonukleaza, ki tarčno mRNA nato razreže in uniči ter tako ustavi translacijo gena in ga utiša (slika 1). Je prav tako evolucijsko zelo ohranjena skupina encimov, katerih gene najdemo v skoraj vseh evkariotskih genomih (Hannon, 2002; Leung in Whittaker, 2005).



Slika 1: Mehanizem delovanja RNAi: dsRNA in RNA lasnice so s pomočjo encima Dicer razrezane v male siRNA, ki nato aktivirajo kompleks RISC. Tu pride do razgraditve smiselnega dela siRNA, protismiseln del pa vodi kompleks do homologne mRNA. Sledi razgradnja mRNA in inhibicija translacije (Bio-it World, 2003).

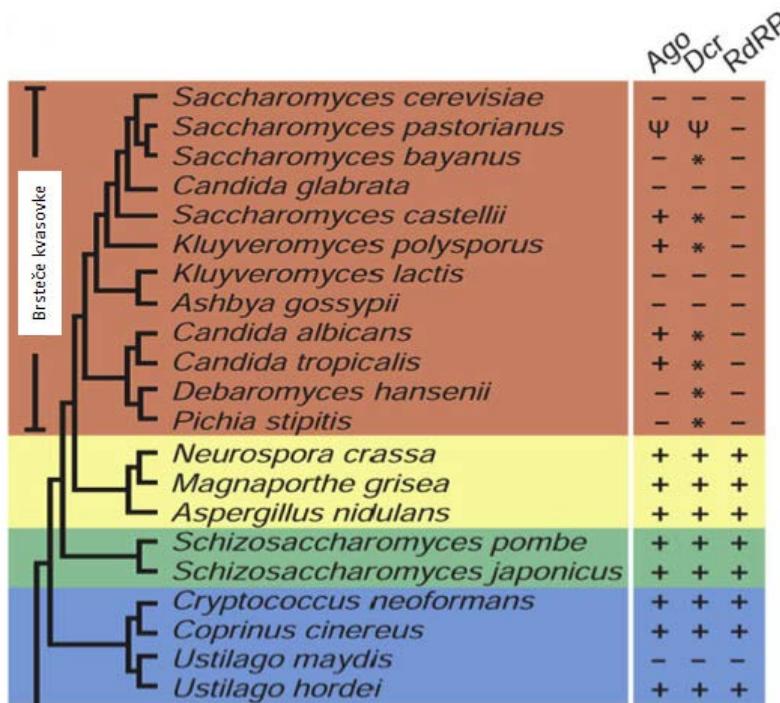
RNAi mehanizem ima pomembno vlogo pri utišanju transpozonov, obrambi celic pred virusi, regulaciji heterokromatina in posttranskripcijskem utišanju genov. Človek ima en gen za Dicer encim in RNAi mehanizem je zelo pomemben za razvoj in delovanje normalnih celic (Hannon, 2002). Ocenjujejo, da vpliva na izražanje tretjine človeških genov (Moazed, 2009).

RNAi mehanizem je v zadnjih letih postalo široko uporabljeno orodje za raziskovanje in analiziranje funkcije posameznih genov, vse od praživalskih do človeških. To orodje je odlično predvsem za raziskovanje funkcij esencialnih genov, ki jih iz genoma ne moremo izbrisati, ter tako omogoča raziskovanje genov pri človeku in drugih organizmih, ki so povezani z različnimi boleznimi. Poleg raziskovalnega pa ima tudi velik farmacevtski potencial za zdravila, ki bi utišala gene, ki so povezani z razvojem bolezni, npr. utišanje

onkogenov; genov, ki so pomembni za replikacijo virusov in parazitov, za zdravljenje različnih obolenj dihal, ipd. (Leung in Whittaker, 2005).

#### 2.4 RNAi V BRSTEČIH SE KVASOVKAH

Čeprav je RNAi mehanizem utišanja genov zelo ohranjen pri mnogih evkariontih in tudi v kraljestvu gliv, pa le-tega ni mogoče zaznati pri nekaterih brstečih se kvasovkah, kot sta *S. cerevisiae* in *C. glabrata*, pri katerih ni homolognih zaporedij za encima Argonaut in Dicer (Chang in sod., 2012). Delajoč RNAi mehanizem in encim Argonaut (*AGO1*) pa so našli v nekaterih vrstah kvasovk, kot so *Saccharomyces castellii* (znana tudi kot *Naumovozyma castellii*), *Kluyveromyces polysporus* (obe vrsti sta bližnja sorodnika *S. cerevisiae*) in *C. albicans*. Te kvasovke uporabljajo nekanonične proteine Dicer (*DCR1*), s katerimi tvorijo siRNA, ki zelo pogosto izvirajo iz RNA lasnic, ki imajo med 100-400 bp dolg palindromski del in 19-1600 bp dolgo zanko. Mnogo siRNA je homolognih protismiselnim zaporedjem ali delom izven odprtih bralnih okvirjev. Nekanonični encimi DCR1 imajo le eno katalitsko domeno in ne vsebujejo domene PAZ (Drinnenberg in sod., 2009). Mutante *S. cerevisiae* z encimi Dicer in Argonaut iz *S. castellii* so v celicah vzpostavile mehanizem RNAi in uspele utišati transpozicijo transpozonov, kar priča o tem, da je RNAi starodavni način celične obrambe ali imunski sistem genoma, ki pa je bil izgubljen v nekaterih glivnih vrstah (Chang in sod., 2012). V raziskavi so odkrili, da lahko le z RNA lasnico ter DCR1 in AGO1 utišajo tarčni gen pri *S. cerevisiae*, kar kaže na preprostejši mehanizem RNAi pri kvasovkah ali pa ima *S. cerevisiae* še vedno neke svoje komponente in je, ne zelo dolgo nazaj, izgubila le določene dele tega mehanizma, tako da ta ni več aktiven. Rezultati raziskav kažejo, da je RNAi dobro orodje za utišanje specifičnih genov v *S. cerevisiae* in *S. castellii*, verjetno pa tudi v ostalih brstečih se kvasovkah (Drinnenberg in sod., 2009).



Slika 2: Kladogram prikazuje posamezne vrste iz kraljestva gliv. Modro so obarvane basidiomicete, ostale pa so askomicete. Prisotnost kanoničnih elementov RNAi mehanizma je označena s (+), nekanoničnih Dicer encimov z (\*) in pseudogeni z (Ψ) (Drinnenberg in sod., 2009).

## 2.5 PRIMERJAVA METOD: DELECIJA GENA PROTI ZMANJŠANJU IZRAŽANJA GENA

Najpogostejša genetska metoda pri raziskovanju vloge določenega gena je uničenje njegove funkcije s pomočjo vnosa mutacije. Priprava delecijskih mutant je tehnično zahtevna in dolgotrajna, kar predstavlja problem pri raziskovanju vseh genov v genomu. Pogosto je postopek slabo učinkovit in delecija nekega gena lahko vpliva na mnoge druge gene v okolici ali kaskado več biokemičnih reakcij, česar pa pri tovrstnih raziskavah ne želimo. Na ta način prav tako ne moremo raziskovati genov, ki so nujno potrebni za normalno delovanje celic. Vse to so razlogi, da je RNAi orodje vedno bolj uporabno pri raziskovanju funkcije genov, saj zmanjša izražanje genov na posttranskripcijskem nivoju. Heneghan in sod. so v raziskavi primerjali protismiselne in lasnične konstrukte ter ugotovili, da je učinkovitost utišanja genov na ta način med 55 in 87,5 %. RNAi lasnice so konstrukti, ki vsebujejo palindromsko zaporedje tarčnega gena in po prepisu tvorijo

dsRNA molekulo, ki vmes vsebuje zanko. Protismiseln konstrukt vsebuje protismiselni del tarčnega gena in ob izražanju skupaj s tarčnim genom tvori dsRNA. Obe vrsti konstruktorov vsebuje tudi promotor, ki je lahko inducibilni ali konstitutivni, ter terminator (Heneghan in sod., 2007). Konstrukt s palindromskim zaporedjem, ki tvori lasnično RNA, je močan utiševalec genov, protismiseln konstrukt pa je šibkejši, saj je posledica vnosa nastanek manjšega števila siRNA molekul (Drinnenberg in sod., 2009). Pomembno pa je poudariti tudi to, da kljub temu, da siRNA nastanejo kot produkti, to še ne pomeni, da bo utišanje zelo krepko, večkrat lahko gre tudi le za zelo šibko delovanje. V raziskavi s *S. pombe* so ugotovili tudi, da za RNAi mehanizem le Dicer, Argonaut in od-RNA odvisna RNA polimeraza niso zadostni za delovanje, temveč da potrebuje še dodatne faktorje (Simmer in sod., 2010).

## 2.6 MOLEKULARNO KLONIRANJE

Kloniranje je postopek ustvaritve identične kopije iz originala in klon se pogosto razume kot namerno ustvarjena identična kopija. V biološkem smislu je to skupina genetsko homogenih celic ali organizmov, ki izhajajo iz ene same celice ali iz enega osebka z nespolnim razmnoževanjem. Molekularno kloniranje se navezuje na prenos celotne DNA ali le dela DNA (geni, promotorska zaporedja, kemično sintetizirani oligonukleotidi, poljubna in nekodirajoča zaporedja) iz izvornega organizma, v katerem je fragment naravno prisoten, in vgraditev v gostiteljsko celico. V izbranem gostitelju lahko nato preučujemo klonirano DNA ali nastajanje proteinov, ki so kodirani na prenesenem vključku. Poznamo več pristopov molekularnega kloniranja, ki temeljijo na različnem načinu vključevanja izbranega fragmenta DNA v tarčno zaporedje DNA. Fragment lahko vključimo s pomočjo rekombinacije ali s pomočjo restrikcijsko-ligacijske metode molekularnega kloniranja. Molekularno kloniranje pa predstavlja tudi verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo – PCR. Tako je molekularno kloniranje široko uporabna metoda v moderni biologiji in diagnostiki (Lodge in sod., 2007).

### 2.6.1 Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo

Odkritje pomnoževanja DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) leta 1985 je drastično spremenilo molekularne raziskave in odprlo neskončne možnosti. Je reakcija, pri kateri *in vitro* pomnožimo na milijone kopij določene DNA s pomočjo DNA polimeraze. Princip reakcije je pomnoževanje dela DNA med dvema oligonukleotidnima začetnikoma, ki se po denaturaciji prilegata vsak eni verigi tarčnega zaporedja v DNA (Erlich in sod., 1991). PCR je visoko selektivna metoda, ki omogoča specifično pomnoževanje dela zaporedja tudi, kadar v reakciji uporabljam celoten genom nekega organizma. Na ta način lahko specifično kloniramo fragmente DNA, vendar ta način lahko uporabimo le, ko pri preučevanem genu predhodno poznamo njegovo sekvenco, sekvenco podobnega gena iz drugega organizma ali sekvenco proteina, ki ga gen kodira (Lodge in sod., 2007). Možnosti pomnoževanja in hkrati modifikacije tarčne DNA sekvence so molekularni biologiji odprle mnoge možnosti za raziskave. PCR je široko uporabna metoda v kloniranju, sekvenciranju, molekularni diagnostiki, ipd. (Erlich in sod., 1991).

### 2.6.2 Restriktijsko-ligacijska metoda

Restriktijski encimi ali nukleaze so osnovno orodje v molekularni biologiji v zadnjih tridesetih letih. To so encimi, ki režejo dsDNA sekvenčno-specifično in jih najdemo v vseh prokariontskih organizmih kot del restriktijsko-modifikacijskega sistema. Katalizirajo razgradnjo fosfodiestrskih vezi v DNA na točno določenem mestu. Restriktijsko-modifikacijske encime delimo na tri skupine glede na prepoznavna mesta, mesta, kjer režejo DNA ter glede na njihovo strukturo. Pri molekularnem kloniranju je najbolj poznana druga skupina restriktijskih encimov, ki prepoznavajo specifična palindromska zaporedja (imenovana restriktijska mesta), dolga 4-8 bp, nato pa zaporedje razrežejo znotraj prepoznavnega mesta (Allison, 2006). Pomembna lastnost restriktijskih encimov je, da režejo specifično in tako nastanejo fragmenti točno določene dolžine, ki jih lahko ločimo z gelsko elektroforezo in dobimo specifičen vzorec. Rezultat restrikcije so fragmenti s štrlečimi konci, ki se lahko zlepijo skupaj s pomočjo DNA ligaze (Gana in Abalaka, 2012). To je encim, ki katalizira nastanek fosfodiestrskih vezi med 5'-fosfatom nukleotida na enem

fragmentu in 3'-hidroksilom nukleotida na drugem. Nastanek kovalentne vezi med dvema fragmentoma imenujemo ligacija. V laboratorijih po svetu najpogosteje uporabljamo ligazo T4, ki jo pridobivamo iz bakteriofaga T4. Na ta način lahko zlepimo skupaj različne fragmente DNA iz različnih virov in dobimo rekombinantno DNA.

Tako so ključni koraki pri molekularnem kloniranju rezanje DNA z restriktijskimi endonukleazami, ligacija izbranega fragmenta DNA in vektorja, vstavljanje nastale rekombinantne DNA v gostiteljsko celico in podvajanje le-te v gostitelju. Tako nastaja ogromno identičnih kopij znanega klena. Ko se gostiteljska celica razmnožuje, se hkrati razmnožuje tudi rekombinantna DNA in tako nastaja populacija identičnih hčerinskih celic, ki vsebujejo klonirano sekvenco. Kloniran DNA segment lahko tudi izoliramo iz gostiteljskih celic, ga očistimo in analiziramo ali uporabimo na kakršen koli način naprej.

Če krožni plazmid razrežemo z restriktijskim encimom, ki ima v plazmidu le eno prepoznavno mesto, postane plazmid linearen. Želeni fragment DNA zato prav tako razrežemo ob koncih z istim encimom, da ga lahko nato z ligacijo združimo s plazmidom. Ligacija inserta in vektorja ni 100 % učinkovita, večkrat je to lahko kar zapleten korak. Pomembno je, da se vektor ne zlepi sam s sabo, zato ga izpostavimo encimu fosfatazi, ki odstrani fosfat na 5'-koncu in tako ligaza ne more ustvariti fosfodiestrskih vezi med koncema plazmida, ker fosfata ni. Združi pa lahko plazmid in želeni fragment DNA, saj ima fragment fosfat na 5'-koncu. Druga strategija pa je lahko tudi uporaba dveh različnih restriktijskih encimov, ki ustvarita nekomplimentarne štrleče konce, kar prav tako prepreči zlepljanje samega vektorja in ima dodatno prednost, saj se dodan fragment DNA vstavi v vektor v določeni orientaciji (Allison, 2006).

### 2.6.3 Vektor

Fragmenta DNA, ki ga želimo vstaviti v gostiteljske celice, ne moremo samega vstaviti v gostitelja, saj se ta v njem večinoma razgradi ali pa se ne podvoji in tako ni prisoten v hčerinskih celicah. Z uporabo vektorja se izognemo razgradnji in s tem zagotovimo uspešno podvajanje izbranega fragmenta DNA. Pomembne lastnosti vektorjev so, da (i) se

lahko pomnožujejo avtonomno skupaj z vstavljenim fragmentom, torej neodvisno od podvojevanja genoma gostiteljske celice, (ii) vsebujejo nekaj unikatnih mest za restriksijske endonukleaze, (iii) vsebujejo selektivni marker (običajno odpornost proti kakšnemu antibiotiku ali gen za kakšen encim, ki ga gostiteljska celica nima), da lahko ločimo celice, ki nosijo vektor od tistih, ki ga ne in (iv) da jih dokaj preprosto lahko izoliramo iz gostiteljskih celic. Tako obstaja veliko število različnih vektorjev, največ pa jih poznamo za uporabo v bakteriji *Escherichia coli*. Plazmidi se naravno pojavljamajo v bakterijskih celicah kot izvenkromosomske dvovijačne krožne DNA molekule, ki so zmožne lastnega podvajanja. V plazmidne vektorje lahko vstavimo do 10 kb (Allison, 2006).

pUC19 je derivat plazmida pBR322, ki je plazmid *E. coli* in v bakteriji obstaja v velikem številu. Ima bakterijsko mesto začetka podvojevanja in dva selekcijska markerja za antibiotika ampicilin in tetraciklin. Ta dva uporabljamo predvsem za selekcijo bakterijskih celic, ki so prejele plazmid. Ima tudi kar nekaj unikatnih restriksijskih mest, ki so zelo uporabna pri molekularnem kloniranju. Za selekcijo kvasnih celic, ki so prejele plazmid, uporabljamo selektivni marker *LYS2*, ki kodira encim  $\alpha$ -aminoacidpatno reduktazo, ki omogoči preživetje *lys2*<sup>-</sup> mutant na gojišču brez aminokisline lizina (Stearns in sod., 1991).

## 2.7 TRANSFORMACIJA

### 2.7.1 Transformacija pri bakterijah

Transformacija je proces, pri katerem bakterijska celica sprejme vase prosto DNA. Celice, ki so tega sposobne, imenujemo kompetentne celice. Kompetenca pri vseh bakterijah ni naraven pojav; naravno kompetentne bakterije so baterije rodu *Bacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus* in *Staphylococcus*. Celice *E. coli* je potrebno predhodno obdelati, da postanejo kompetentne. Ker je veliko bakterijskih vrst sposobnih transformacije ali pa pri njih kompetenco lahko vzbudimo, je to pogosto uporabljeni metoda vnosa DNA v celico. Kompetenco lahko umetno induciramo s kemično obdelavo ali izpostavljivo električnemu polju in s tem povečamo prepustnost celične membrane.

Transformacija je torej prenos rekombinantnega plazmida v gostiteljsko celico. Najpogosteje celice inkubiramo v koncentrirani raztopini kalcijevih ionov, ki povzroči prepuščajoče membrane, skozi katere lahko vstopi rekombinantna DNA. Ta postopek je običajno le deloma učinkovit, saj le nekatere celice sprejmejo DNA. Vstavljen plazmidni vektor se nato podvojuje v vseh transformiranih gostiteljskih celicah in tako je rekombinantna DNA po delitvi celic tudi v vseh hčerinskih celicah, ki so potomke transformirane celice. Od tod izhaja ime ‘kloniranje’. Poleg transformacije lahko rekombinantno DNA v gostiteljske celice prenesemo tudi z drugimi metodami. Pri bakterijah mednje spadata konjugacija (neposredni prenos DNA iz donorja v recipienta s pomočjo pila) in transdukacija (vnos DNA s pomočjo bakteriofaga) (Allison, 2006).

### **2.7.2 Elektroporacija**

Transformacijo lahko izvedemo tudi z elektroporacijo, ko celico izpostavimo električnemu polju in tako pride do večje prepustnosti membrane, kar omogoči vstop sicer neprepustnim molekulam v citoplazmo. Celice recipienti in molekule, ki bodo vanje vstavljene, so suspendirane v raztopini. Nato se suspenzijo vstavi v aparat in s pritiskom na stikalo se visoka napetost sprosti skozi tekočino s celično suspenzijo. Električni pulz povzroči spremembo v fosfolipidnem dvosloju v membrani in formaciji začasnih porinov in tako lahko nabite molekule (kot je na primer DNA) potujejo skozi v citoplazmo. Ko nabiti ioni in molekule potujejo skozi pore, se električni potencial membrane vrne na začetno vrednost, pore se hipoma zaprejo in fosfolipidni dvosloj se sestavi nazaj v prvotno stanje (Dean in sod., 2003).

### **2.7.3 Transformacija pri kvasovkah**

Transformacija je nepogrešljiva metoda tudi pri manipulaciji s kvasovkami, s katero tujo DNA vnesemo v gostiteljske celice in jih tako gensko spremenimo. V uporabi je nekaj različnih metod za transformacijo evkariotskih celic, ki jih uporabljamo tudi za transformacijo pri kvasovkah. Najpogostejše metode so kemične (uporaba litija),

elektroporacija, mikroinjiciranje (raztopina z DNA injicirana direktno v jedro celice) in bombardiranje celic (vnos DNA z gensko pištolo). Za uspešno transformacijo mora tuja DNA preiti celično steno in celično membrano, nato pa preko citosola vstopiti v jedro celice. Točen mehanizem, kako to poteka, zaenkrat še ni bil opisan, čeprav je bilo podanih že kar nekaj teorij. Eden izmed pomembnih odkritij je bil, da monovalentni kationi kot na primer  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , predvsem pa  $\text{Li}^+$ , povečajo uspešnost transformacije pri kvasovkah, kar je drugače kot pri *E. coli*, kjer imajo takšen vpliv dvovalentni kationi (kot je  $\text{Ca}^{2+}$ ). Za uspešnost transformacije je poleg litijevega acetata nujna uporaba polietilen glikola (PEG), če pa celice izpostavimo še temperaturnemu šoku s kratkotrajno inkubacijo na 42 °C, to poveča uspešnost prehoda DNA skozi celično steno. Transformacija je najbolj uspešna s celicami v srednji logaritemski fazi rasti ( $\text{OD}_{610} = 1.6$ ) (Kawai in sod., 2010).

Pri transformaciji uporabimo rekombinantno DNA (vektor z vključkom), ki jo prej izoliramo iz *E. coli*. To DNA nato razrežemo z restriktičnim encimom, da plazmid lineariziramo, da se prosta DNA lahko vključi v genom gostitelja s homologno rekombinacijo. To je proces, pri katerem pride do interakcije med dvema homolognima DNA sekvencama, in tako se želena DNA vključi v genom (Stearns in sod., 1991).

#### 2.7.4 Selekcija transformant

Uspešnost transformacije preverimo s pomočjo selektivnega gojišča, ki omogoča rast celic, ki so prejeli rekombinantno DNA, in onemogoča rast celicam, ki niso transformirane. Izbira gojišča je odvisna od izbire vektorja in gostiteljske celice, običajno pa je to prisotnost antibiotika ali odsotnost kakšne spojine, ki jo gostiteljska celica sama ne proizvaja, ampak jo nujno potrebuje za preživetje. Pri bakterijah najpogosteje uporabljamо selektični marker odpornosti na antibiotike, kot so ampicilin, tetraciklin in kanamicin (Allison, 2006).

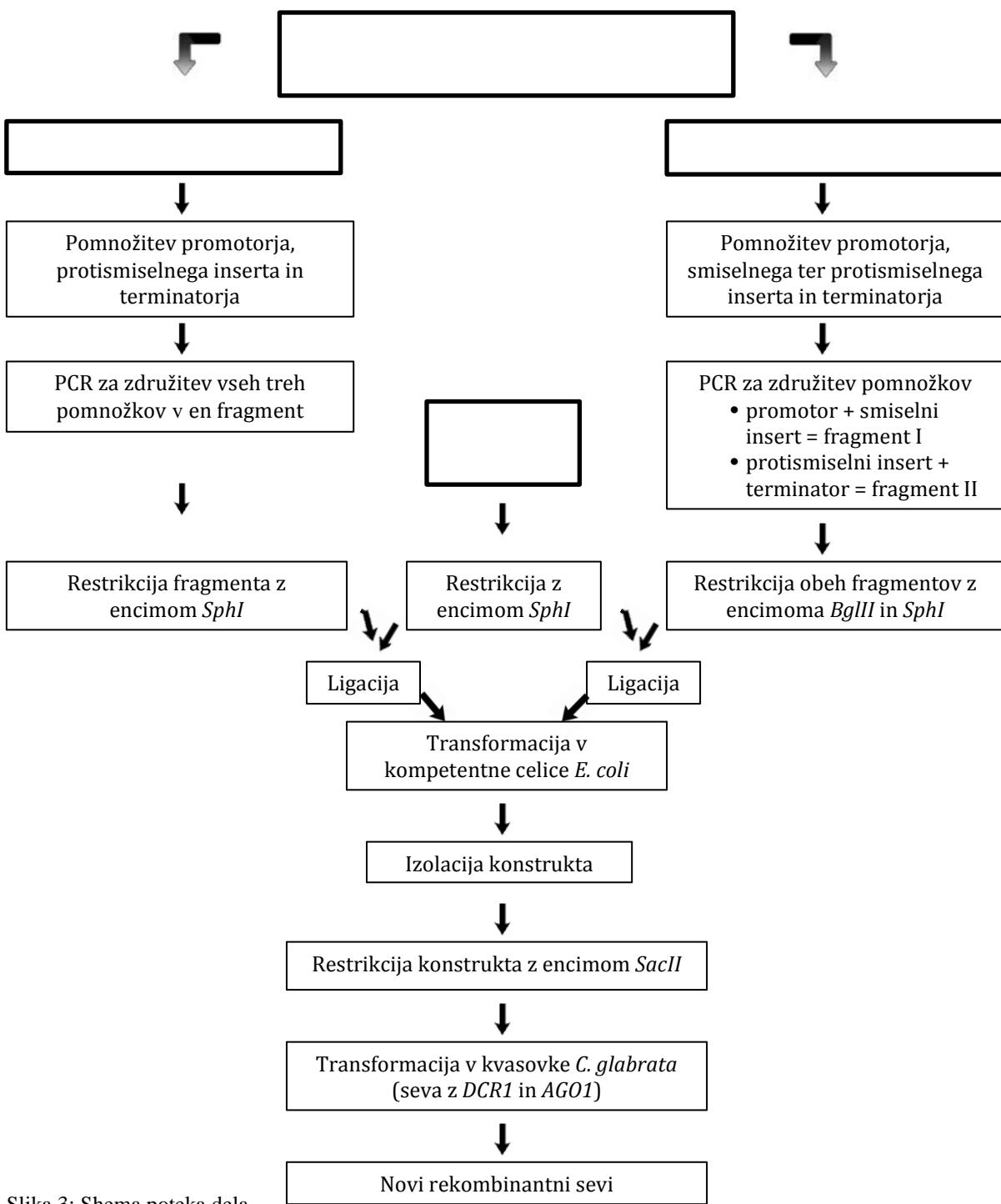
Pri kvasovkah kot klasične selekcijske markerje uporabljamо gene *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *LYS2* in *URA3* (Sikorski in Hieter, 1989). Ko v celicah povzročimo mutacijo določenega gena, so te lahko brez učinka ali pa celo usodne (Allison, 2006). Mutacije v selekcijskih

markerjih povzročijo spreobrnitev prototrofnih celic, ki so zmožne same sintetizirati vse aminokisline, nukleotide in aminokisline v avksotrofne. Te celice niso sposobne preživeti na minimalnem gojišču, saj za rast potrebujejo dodan avksotrofni marker (histidin, triptofan, levcin, lizin, uracil). *LYS2* je pogosto uporabljen selekcijski marker, saj omogoča tako pozitivno kot negativno selekcijo transformant. Pozitivno selekcijo omogoča dodatek avksotrofnega markerja, ki mutantam omogoči rast, negativno pa specifični inhibitor  $\alpha$ -aminoacidinska kislina, ki onemogoči rast prototrofov in omogoči rast avksotrofov (Romanos in sod., 1992).

Tako sicer ne moremo ločiti celic, ki so prejele le vektor brez vstavljenega vključka, če je selekcijski marker na vektorju, od takih, ki so prejele vektor z vstavljenim vključkom, zato so za to določitev potrebnii dodatni selekcijski markerji ali kakšne druge analize. Te so na primer analiza prisotnosti vključka s PCR, sekpcioniranje DNA ali restrikcijsko kartiranje. Restrikcijsko karto ustvarimo tako, da klonirano DNA razrežemo z določenim restrikcijskim encimom in naložimo v agarozni gel ter izvedemo elektroforezo. Ta povzroči potovanje DNA delcev glede na njihovo velikost in loči različne razrezane fragmente. Dolžino DNA fragmentov nato določimo glede na pozicijo fragmenta v gelu v primerjavi z znano lestvico DNA. Tako agarozna gelska elektroforeza omogoča določitev dolžine restrikcijskih fragmentov in nastanek specifičnega restrikcijskega vzorca, ki potrdi prisotnost in orientacijo vključka (Allison, 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA



Slika 3: Shema poteka dela.

### 3.2 SEVI, PLAZMIDI IN IZBRANI GENI ZA RAZISKAVO

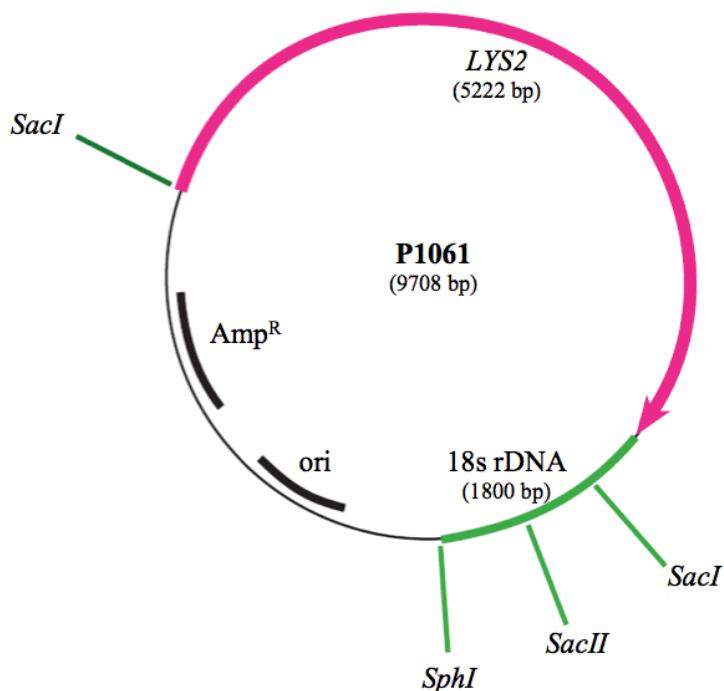
#### 3.2.1 Sevi in plazmid

Uporabljeni sevi kvasovke *Candida glabrata*, bakterije *Escherichia coli* in plazmid se nahajajo v zbirki mikroorganizmov v laboratoriju na Department of Biology, Faculty of Science, Lund University na Švedskem. Sev Y1092 je sekvencioniran sev CBS 138 in je divji tip *C. glabrata*, ki je bil izoliran iz blata zdravega moškega. Sev BG2 je divji tip kliničnega izolata bolnika s vaginozo in je bil pridobljen iz zbirke v laboratoriju prof. Brendana Cormacka iz Baltimorja, iz Združenih držav Amerike. Kvasovke so bile po revitalizaciji gojene na gojišču YPD na 25 °C. Seva Y1662 in Y1699 sta bila ustvarjena v laboratoriju prof. Jureta Piškurja in imata vstavljeni geni za Dicer ter Argonaut iz kvasovke *S. castellii*, ki sta pod konstitutivnimi promotorji, ki imajo visoko aktivnost na mediju z glukozo. Med transformacijo sta bila vgrajena v genom naključno.

*E. coli* XL1-blue je bila po revitalizaciji gojena na gojišču LB na 37 °C. Plazmid P1061 je bil ustvarjen v laboratoriju prof. Piškur Jureta in izhaja iz pUC19 ter vsebuje seleksijski marker *LYS2* *C. glabrata* in 18S rDNA *C. glabrata*, ki je bila pomembna za homologno rekombinacijo v *C. glabrata* po transformaciji. Ta vektor vsebuje ogromno restrikcijskih mest, med katerimi smo uporabili restrikcijska mesta za encime *SacI*, *SacII* in *SphI* (slika 4). Preglednica 2 prikazuje seznam uporabljenih mikroorganizmov in plazmid.

Preglednica 2: V raziskavi uporabljeni mikroorganizmi in plazmid.

Ime	Opis
<b>Y1092</b>	CBS 138 <i>Candida glabrata</i> w. t.
<b>Y1630</b>	BG2 <i>Candida glabrata</i> (klinični izolat)
<b>Y1662</b>	BG2 <i>lys2</i> + ScAGO1+ ScDCR1 pod promotorji CgGAPDH in CgTEF1
<b>Y1699</b>	CBS 138 <i>lys2</i> + ScAGO1 + ScDCR1 pod promotorji CgGAPDH in CgTEF1
<b>E. coli XL1-blue (Stratagene)</b>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> <sup>q</sup> ZΔ <i>M15</i> Tn10 (Tet <sup>r</sup> )].
<b>P1061</b>	pUC19 + CgLYS2 + Cg18S rDNA



Slika 4: Plazmid P1061.

### 3.2.2 Geni za raziskovanje

Kvasovka *C. glabrata* ima 5283 kodirajočih zaporedij in v laboratoriju prof. Karla Kuchlerja na Dunaju na Medical University Vienna so poskusili narediti delecije vseh, okoli 900 možnih, virulentnih genov. Med načrtovanimi delecijami so našli nekaj genov, ki so jim še posebej vzbudili zanimalje, saj so bili za *C. glabrata* morda esencialni za preživetje, torej brez njih kvasovka ni mogla preživeti, medtem ko pa ortologni geni pri *S. cerevisiae* niso nujni za preživetje. Z drugimi besedami, teh genov niso mogli izbrisati. Ker sta si ti kvasovki zelo sorodni, a je *S. cerevisiae* nepatogena, *C. glabrata* pa patogena, je utemeljeno sumiti, da so ti geni verjetno nekako povezani s patogenezo. Zato smo se v tej raziskavi osredotočili na teh pet genov (geni oštirljeni z 1-5 v preglednici 3) (še neobjavljeni rezultati; Kuhler, 2013).

V laboratoriju prof. Jureta Piškurja na Lund University na Švedskem so v okviru raziskave s haploidnimi in umetno ustvarjenimi diploidnimi sevi *C. glabrata* izvedli test kompeticije z različnimi koncentracijami flukonazola. Ob visokih koncentracijah so zmagovalne haploidne seve poslali na test izražanja genov in ugotovili, da je nekaj genov signifikantno povečalo nivo izražanja v teh razmerah. Ta sprememba nam kaže, da so ti geni verjetno vpleteni pri razvoju odpornosti proti visokim koncentracijam flukonazola in preživetju v stresnih pogojih in so zato zelo zanimivi za raziskovanje. Tako smo za raziskavo izbrali dva med njimi, ki sta imela najvišji nivo izražanja (oštirljena s 6 in 7 v preglednici 3). Gen CAGL0M12947g je bil izražen 36-krat višje kot v kontrolnem sevu, gen CAGL0L05434g pa 17,6-krat (še neobjavljeni rezultati; Ishchuk, 2013).

Preglednica 3: Geni, ki smo jih uporabili v raziskavi (*Candida Genome Database*, 2012).

Št.	Oznaka gena	Izvor za raziskavo	Ortologna funkcija (če je znana)	Organizmi z ortognim genom
1	CAGL0A00517g	Delecijski eksperiment (K. Kuchler)	Transmembranski transport kalcija, vloga pri odzivu na antimikotike	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. pombe</i> , <i>S. cerevisiae</i>
2	CAGL0F00495g	Delecijski eksperiment (K. Kuchler)	Proteinska kinaza, ki je pomembna pri odzivu pri pomanjkanju dušika	<i>S. pombe</i> , <i>S. cerevisiae</i>
3	CAGL0M05049g	Delecijski eksperiment (K. Kuchler)	Domnevna glikozil hidrolaza, ki ima vlogo pri odzivu na antimikotike	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i>
4	CAGL0M11748g	Delecijski eksperiment (K. Kuchler)	MAP kinaza, pomembna za prenos signalov v celici v stresnih pogojih	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. pombe</i> , <i>S. cerevisiae</i>
5	CAGL0C00363g	Delecijski eksperiment (K. Kuchler)	Protein, vpleten v sintezo celične stene	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i>
6	CAGL0M12947g	Test kompeticije (O. Ishchuk)	Protein v mitohondriju, povečano izražanje v sevih, odpornih proti azolom	<i>S. cerevisiae</i>
7	CAGL0L05434g	Test kompeticije (O. Ishchuk)	Beta-glikozidazna aktivnost, pomembna pri sintezi celične stene	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i>

### 3.3 MATERIALI

#### 3.3.1 Mikrobiološka gojišča

##### a) Tekoče gojišče YPD

Za pripravo 1 l tekočega gojišča YPD (angl. Yeast Peptone Dextrose) smo uporabili:

- 10 g kvasnega ekstrakta
- 20 g peptona
- 20 g glukoze
- do 1 l dH<sub>2</sub>O

Maso sestavin smo natehtali v enolitrsko steklenico z navojem, dodali destilirano vodo in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. Gojišče smo topotno sterilizirali v avtoklavu (20 min, 121 °C, 1.1 bar). Tekoče gojišče smo uporabili za nagojitev sevov Y1092, Y1662 in Y1699.

##### b) Trdno gojišče YPD

Za pripravo 1 l trdnega gojišča YPD smo uporabili:

- 10 g kvasnega ekstrakta
- 20 g peptona
- 20 g glukoze
- 20 g agarja
- do 1 l dH<sub>2</sub>O

Maso sestavin smo natehtali v enolitrsko steklenico z navojem, dodali destilirano vodo in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. Gojišče smo topotno sterilizirali v avtoklavu in počakali, da se malo ohladi. Nato smo ga aseptično razlili v petrijevke. To gojišče smo uporabili za ohranjanje živosti sevov Y1092, Y1662 in Y1699. Plošče z gojiščem smo posušili v laminariju in jih shranili pri 4 °C.

##### c) Tekoče gojišče YNB

Za pripravo 1 l tekočega gojišča YNB (angl. Yeast Nitrogen Base) smo uporabili:

- 1,9 g YNB
- 20 g glukoze
- 5 g amonijevega sulfata
- do 1 l dH<sub>2</sub>O

Maso sestavin smo natehtali v enolitrsko steklenico z navojem, dodali destilirano vodo in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. pH gojišča smo umerili na 5,5. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu in ga uporabili za nagojitev novih transformiranih sevov *C. glabrata*.

d) Trdno gojišče YNB

Za pripravo 1 l tekočega gojišča YNB smo uporabili:

- 1,9 g YNB
- 20 g glukoze
- 5 g amonijevega sulfata
- 15 g agarja
- do 1 l dH<sub>2</sub>O

Maso sestavin smo natehtali v enolitrsko steklenico z navojem, dodali destilirano vodo in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. pH gojišča smo umerili na 5,5. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu in počakali, da se malo ohladi. Nato smo ga aseptično razlili v petrijevke. To gojišče smo uporabili za ohranjanje živosti novih transformiranih sevov *C. glabrata*. Plošče z gojiščem smo posušili v laminariju in jih shranili pri 4 °C.

e) Tekoče gojišče LB

Za pripravo 1 l tekočega gojišča LB (angl. Luria Bertani) smo uporabili:

- 15 g peptona
- 5 g kvasnega ekstrakta
- 5 g NaCl
- do 1 l dH<sub>2</sub>O

Maso sestavin smo natehtali v enolitrsko steklenico z navojem, dodali destilirano vodo in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. pH gojišča smo umerili na 7. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu. Po potrebi smo gojišču, ko se je ohladilo, dodali antibiotik ampicilin ( $c_{amp} = 0,1 \text{ g/ml}$ ). Gojišče LB smo uporabili za nagojitev bakterije *E. coli* XL1-blue, gojišče LB z ampicilinom pa za *E. coli* XL1-blue z rekombinantnimi plazmidi.

f) Trdno gojišče LB

Za pripravo 1 l trdnega gojišča LB smo uporabili:

- 15 g peptona
- 5 g kvasnega ekstrakta
- 5 g NaCl
- 15 g agarja
- do 1 l dH<sub>2</sub>O

Maso sestavin smo natehtali v enolitrsko steklenico z navojem, dodali destilirano vodo in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu. Po potrebi smo gojišču, ko se je malo ohladilo, dodali antibiotik ampicilin ( $c_{amp} = 0,1$  g/ml). Nato smo ga aseptično razlili v petrijevke. Gojišče LB smo uporabili za ohranjanje živosti *E. coli* XL1-blue, gojišče LB z ampicilinom pa za *E. coli* XL1-blue z rekombinantnimi plazmidi. Plošče z gojiščem smo posušili v laminariju in jih shranili pri 4 °C.

### 3.3.2 Pufri in raztopine

a) Raztopina za lizacijo jedra

Za 20 ml raztopine smo uporabili:

- 0,2 ml 20 % SDS
- do 20 ml 50 mM EDTA pH 8,0

Sestavine smo odmerili v steklenico z navojem in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile.

b) Pufer TE

Za 50 ml pufra smo uporabili:

- 5 ml 100 mM TRIS
- 1 ml 50 mM EDTA
- do 50 ml dH<sub>2</sub>O

Sestavine smo odmerili v steklenico z navojem in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso raztopile. pH pufra smo umerili na 7,5 in 8,0 in ga avtoklavirali.

c) Pufer TAE

Za 1 l 50 X pufra TAE smo uporabili:

- 242 g TRIS
- 57,1 ml ocetne kisline
- 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- do 1 l dH<sub>2</sub>O

Sestavine smo natehtali in odmerili v steklenico z navojem in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile.

d) 0,1 M Litijev acetat (LiAc) v pufru TE

Za 50 ml raztopine smo uporabili:

- 5,01 g litijevega acetata
- do 50 ml pufra TE pH 7,5

Maso sestavin smo natehtali v steklenico z navojem, dodali pufer TE in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. Raztopino smo nato aseptično prefiltrirali s filtrom s porami 0,2 µm.

e) 55 % polietilen glikol (PEG 3350)

Za 10 ml raztopine smo uporabili:

- 5,5 g PEG3350
- do 10 ml 0,1 M LiAc in TE pH 7,5

Maso sestavin smo natehtali v steklenico z navojem, dodali litijev acetat v pufru TE in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. Raztopino smo nato aseptično prefiltrirali s filtrom s porami 0,2 µm.

f) Raztopina I

Za 1 l raztopine smo uporabili:

- 9,91 g glukoze
- 250 ml TRIS pH 8,0
- 20 ml EDTA pH 8,0
- do 1 l dH<sub>2</sub>O

Sestavine smo natehtali in odmerili v steklenico z navojem in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. Raztopino smo nato avtoklavirali in jo uporabili pri izolaciji plazmida.

g) Raztopina II

Za 50 ml raztopine smo uporabili:

- 1 ml 10 N NaOH
- 2,5 ml 20 % SDS
- do 50 ml dH<sub>2</sub>O

Sestavine smo odmerili v steklenico z navojem in mešali na magnetnem mešalu, dokler se niso sestavine raztopile. Raztopino smo nato avtoklavirali in jo uporabili pri izolaciji plazmida.

### 3.3.3 Laboratorijska oprema

V laboratoriju smo med raziskavo uporabili laboratorijsko opremo, ki je našteta v preglednicah 4 in 5.

Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema.

NAZIV	OZNAKA MODELA	PROIZVAJALEC	DRŽAVA POREKLA
avtoklav	A4050	Certoclaw	Avstrija
centrifuge	Biofuge pico 1-15 K 5810 R	Heraeus Sigma Eppendorf	Nemčija ZDA Nemčija
hladilnik	K357/2AL	Gorenje	Slovenija
laminarij	HeraSafe KS18	Kendro	Nemčija
magnetno mešalo	MR 2002	VWR	ZDA
mikrovalovna pečica	A935Q	Moulinex	Francija
Nanodrop	2000 c	Thermo Scientific	ZDA
PCR mašina	RoboCycler Gradient 96	Stratagene	ZDA
pH meter	SevenMulti	Mettler	Španija
pipete	P1000, P200, P20, P2	Gilson	Francija
spektrofotometer	6705 UV Vis.	Jenway	ZDA
stresalnik	AG CH-4103	Bottimingen	Švica
tehtnica	PB3002-S	Mettler	Španija
toplotni blok	/	VWR	ZDA

Preglednica 5: Ostali uporabljeni pripomočki v laboratoriju.

<b>PRIPOMOČKI</b>	<b>PROIZVAJALEC</b>	<b>DRŽAVA POREKLA</b>
avtoklavirni papir	3M Health Care	Nemčija
čaše	Scholl	Nemčija
elektroforezna komora	WVR	ZDA
epruvete	Scholl	Nemčija
erlenmajerice	Pyrex	Anglija
falkonke (15 ml in 50 ml)	Sarstedt	Nemčija
filtri, velikost por 0,2 µm	VWR	ZDA
injekcijske brizge	Therumo	Belgija
skalpel	Swann Morton	Velika Britanija
kivete	Ratolab	Nemčija
merilni valji	Kartell	Italija
mikrocentrifugirke (1,5 ml in 2 ml)	Sarstedt	Nemčija
nastavki za pipete	Gilson	Francija
odtisnjevalnik plošč	/	/
parafilm	Bemis	ZDA
PCR mikrocentrifugirke	Axygen	Avstralija
petrijevke	Sarstedt	Nemčija
rokavice iz lateksa	Papyrus	Švedska
serološke pipete	Sarstedt	Nemčija
steklenice z navojem	Scholl	Nemčija
žametne krpice	/	/

### 3.3.4 Reagenti

V laboratoriju smo med raziskavo uporabili reagente, ki so našteti v preglednici 6.

Preglednica 6: Uporabljeni reagenti.

REAGENTI	PROIZVAJALEC	DRŽAVA POREKLA
96% etanol	VWR	ZDA
agarosa	Sigma	ZDA
amonijev sulfat	Merck	Nemčija
ampicilin	Sigma	ZDA
Bacto agar	Saveen Werner AB	Švedska
destilirana voda	Millipore	ZDA
DNA lososove sperme	Invitrogen	ZDA
dNTP	Thermo Scientific	ZDA
EDTA	Merck	Nemčija
etidijev bromid (EtBr)	AppliChem	Nemčija
fenol/kloroform/izoamialkohol	Sigma	ZDA
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific	ZDA
glicerol	Sigma	ZDA
glukoza	Merck	Nemčija
HCl	Merck	Nemčija
izopropanol	Sigma	ZDA
Kalijev acetat (KC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	Merck	Nemčija
kvasni ekstrakt	Merck	Nemčija
litijev acetat	Sigma	ZDA
nanašalni pufer	Thermo Scientific	ZDA
natrijev acetat (CH <sub>3</sub> COONa)	Sigma	ZDA
natrijev hidroksid (NaOH)	Merck	Nemčija
natrijev klorid (NaCl)	Merck	Nemčija
ocetna kislina	Sigma	ZDA
pepton	Merck	Nemčija
polietilen glikol (PEG3350)	Sigma	ZDA
SDS	VWR	ZDA
standardna 1 kb DNA lestvica	Thermo Scientific	ZDA
TRIS	Merck	Nemčija
YNB	Formedium	Velika Britanija

### 3.4 METODE

#### 3.4.1 Izolacija celotne kvasne DNA

Prekonočno kulturo kvasovk v 3 ml YPD ali YNB smo pet minut centrifugirali pri 4000 rpm na sobni temperaturi. Celice v peletu smo nato sprali z 1 ml 50 mM EDTA pH 8,0 in jih resuspendirali v 400 µl iste raztopine. Nato smo dodali 40 µl zimolaze (Qiagen, Nizozemska) (iz založne koncentracije 40 mg/ml v 50 mM EDTA pH 8,0) in mikrocentrifugirko eno uro inkubirali na 37 °C. Nato smo z 10-minutnim centrifugiranjem pri 7000 rpm zbrali celice in jih resuspendirali v 300 µl raztopine za lizo protoplastov ter petnajst minut inkubirali na 65 °C. Po inkubaciji smo mikrocentrifugirko vsaj eno minuto na ledu smo dodali 100 µl kalijevega acetata in petnajst minut centrifugirali pri 14 000 rpm na 4 °C. Supernatant smo nato prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 450 µl izopropanola. Po 15-minutnem centrifugiraju na 14 000 rpm na sobni temperaturi smo celice sprali z ledeno hladnim 70 % etanolom. Pelet smo nato posušili na zraku in ga raztopili v 100 µl TE pufra ter dodali 1,5 µl RNaze A (Thermo Scientific, ZDA) ter mikrocentrifugirko petnajst minut inkubirali na 37 °C. Nato smo dodali isti volumen mešanice fenol/kloroform/izoamil alkohola in petnajst minut centrifugirali pri 13 000 rpm na sobni temperaturi. Zgornjo fazo smo nato prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 10 µl natrijevega acetata in 250 µl 96 % etanola in vsaj petnajst minut inkubirali na -20 °C. Po 15-minutnem centrifugiraju pri 13 000 rpm na 4 °C smo pelet sprali z ledeno hladnim 70 % etanolom, ga posušili na zraku, nato pa raztopili v 40 µl TE pufra. Koncentracijo DNA smo nato preverili z opremo Nanodrop in z gelsko elektroforezo v 1 % (m/v) agaroznem gelu.

#### 3.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

##### 3.4.2.1 Pomnoževanje DNA z PCR

S pomočjo tehnike PCR smo iz predhodno izolirane celotne kvasne DNA *C. glabrata* w. t. pomnožili potrebne elemente za molekularno kloniranje: promotorje, smiselne in

protismiselne dele ter terminatorje ter v PCR pomnožke uvedli želena restriktijska mesta z uporabo vnaprej pripravljenih specifičnih oligonukleotidnih začetnikov.

Reakcijska mešanica za eno reakcijo:

- 0,4 µl matrične kvasne DNA (založna koncentracija 672 ng/µl)
- 0,5 µl levega začetnega oligonukleotida (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 0,5 µl desnega začetnega oligonukleotida (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 1 µl dNTP (založna koncentracija 10 mM; Thermo Scientific, ZDA)
- 0,5 µl Phusion-polimeraze (Thermo Scientific, ZDA)
- 10 µl 10X pufra za DNA-polimerazo
- do 50 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcija je potekala po sledečem programu:

- 98 °C 3 minute začetna denaturacija
  - 98 °C 10 sekund
  - 65 °C 15 sekund
  - 72 °C 1 minuta
  - 72 °C 7 minut končna elongacija
  - 4 °C končna inkubacija
- 

Pomnožene fragmente DNA smo analizirali z agarozno gelesko elektroforezo.

### 3.4.2.2 PCR za prekrivanje fragmentov

#### a) PCR za prekrivanje fragmentov za lasnični konstrukt

Za prekrivanje fragmentov smo za lasnični konstrukt izvedli dve reakciji za vsak gen. V prvi smo prekrili promotor in smiseln del (fragment I), v drugi pa protismiselni del in terminator (fragment II).

Reakcijska mešanica za fragment I:

- 0,6 µl DNA promotorja (založna koncentracija 250 ng/µl)
- 0,22 µl DNA smiselnega dela (založna koncentracija 300 ng/µl)

- 0,5 µl levega začetnega oligonukleotida za promotor (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 0,5 µl desnega začetnega oligonukleotida za smiselni del (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 1 µl dNTP (založna koncentracija 10 mM; Thermo Scientific, ZDA)
- 0,5 µl Phusion-polimeraze (Thermo Scientific, ZDA)
- 10 µl 10X pufra za DNA-polimerazo
- do 50 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcijska mešanica za fragment II:

- 0,75 µl DNA protismiselnega dela (založna koncentracija 200 ng/µl)
- 0,75 µl DNA terminatorja (založna koncentracija 200 ng/µl)
- 0,5 µl levega začetnega oligonukleotida za protismiselni del (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 0,5 µl desnega začetnega oligonukleotida za terminator (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 1 µl dNTP (založna koncentracija 10 mM; Thermo Scientific, ZDA)
- 0,5 µl Phusion-polimeraze (Thermo Scientific, ZDA)
- 10 µl 10X pufra za DNA-polimerazo
- do 50 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcija je potekala po sledečem programu:

- 98 °C 3 minute začetna denaturacija
  - 98 °C 10 sekund
  - 65 °C 15 sekund
  - 72 °C 2 minuti
  - 72 °C 7 minut končna elongacija
  - 4 °C končna inkubacija
- 

Po petem ciklu smo v reakcijsko mešanico dodali oba začetna oligonukleotida in reakcijo nadaljevali. Pomnožene fragmente DNA smo analizirali z agarozno gelesko elektroforezo.

b) PCR za prekrivanje fragmentov za protismiselni konstrukt

Za prekrivanje fragmentov za protismiselni konstrukt smo izvedli PCR reakcijo z vsemi tremi elementi in tako dobili protismiselni vključek.

Reakcijska mešanica :

- 0,75 µl DNA promotorja (založna koncentracija 200 ng/µl)
- 0,2 µl DNA protismiselnega dela (založna koncentracija 300 ng/µl)
- 0,25 µl DNA terminatorja (založna koncentracija 200 ng/µl)
- 0,5 µl levega začetnega oligonukleotida za promotor (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 0,5 µl desnega začetnega oligonukleotida za terminator (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 1 µl dNTP (založna koncentracija 10 mM; Thermo Scientific, ZDA)
- 0,5 µl Phusion-polimeraze (Thermo Scientific, ZDA)
- 10 µl 10X pufra za DNA-polimerazo
- do 50 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcija je potekala po sledečem programu:

- 98 °C 3 minute začetna denaturacija
  - 98 °C 10 sekund
  - 65 °C 15 sekund
  - 72 °C 2 minuti
  - 72 °C 7 minut končna elongacija
  - 4 °C končna inkubacija
- 

Po petem ciklu smo v reakcijsko mešanico dodali oba začetna oligonukleotida in reakcijo nadaljevali. Pomnožene fragmente DNA smo analizirali z agarozno gelesko elektroforezo.

### 3.4.2.3 Kontrolni PCR na osnovi kolonije

Transformirane kolonije *E. coli* XL-1 blue smo raztopili v 10 µl dH<sub>2</sub>O.

Reakcijska mešanica:

- 4 µl raztopljene kolonije
- 0,2 µl levega začetnega oligonukleotida za promotor (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 0,2 µl desnega začetnega oligonukleotida za terminator (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 0,4 µl dNTP (založna koncentracija 10 mM; Thermo Scientific, ZDA)
- 0,3 µl DreamTaq-polimeraze (Thermo Scientific, ZDA)
- 2 µl 10X pufra za DNA-polimerazo
- do 20 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcija je potekala po sledečem programu:

- 94 °C 3 minute začetna denaturacija
  - 94 °C 45 sekund
  - 57 °C 30 sekund
  - 72 °C 2 minuti
  - 72 °C 7 minut končna elongacija
  - 4 °C končna inkubacija
- } 30 ciklov

Pomnožene fragmente DNA smo analizirali z agarozno gelesko elektroforezo.

### 3.4.2.4 Kontrolni PCR novonastalih rekombinantnih kvasnih sevov

Ko smo pridobili nove rekombinantne seve, smo izolirali celotno DNA kvasovke ter izvedli kontrolni PCR za prisotnost želenih protismiselnih in lasničnih vključkov.

Reakcijska mešanica:

- 1 µl matrične kvasne DNA (založna koncentracija 400 ng/ µl)

- 0,2 µl levega začetnega oligonukleotida za promotor (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 0,2 µl desnega začetnega oligonukleotida za terminator (založna koncentracija 100 pmol/µl)
- 0,4 µl dNTP (založna koncentracija 10 mM; Thermo Scientific, ZDA)
- 0,3 µl DreamTaq-polimeraze (Thermo Scientific, ZDA)
- 2 µl 10X pufra za DNA-polimerazo
- do 20 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcija je potekala po sledečem programu:

- 94 °C 3 minute začetna denaturacija
  - 94 °C 45 sekund
  - 57 °C 30 sekund
  - 72 °C 2 minuti
  - 72 °C 7 minut končna elongacija
  - 4 °C končna inkubacija
- 

### 3.4.3 Agarozna gelska elektroforeza

Fragmente DNA smo po končani PCR reakciji ločevali z agarozno gelsko elektroforezo. Za ločevanje PCR fragmentov smo pripravili 1 % (m/v), za ločevanje plazmidov pa 0,8 % (m/v) agarozni gel. Za pripravo 100 ml 1 % (0,8 %) agaroznega gela smo v erlenmajerico natehtali 1 g (0,8 g) agaroze ter dolili do 100 ml 1X pufra TAE. Suspenzijo smo segreli do vretja tako, da se je vsa agaroza raztopila. Ko se je raztopina ohladila na 60 °C, smo dodali 7 µl etidijevega bromida (založna koncentracija 1 %) in jo vlili v elektroforezno komoro ter namestili glavniček. Ko se je gel strdil, smo v luknjice nanesli velikostni standard (1 kb lestvica; Thermo Scientific, ZDA) ter vzorce, katerim smo dodali ustrezeno količino 6X nanašalnega pufra. Elektroforeza je potekala 40 minut v pufru TAE pri napetosti 120 V, nato pa smo fragmente DNA opazovali pod UV lučjo.

Za postopek očiščenja fragmentov PCR smo ponovili isti postopek, le da je elektroforeza potekala 100 minut pri napetosti 80 V.

#### **3.4.4 Ekstrakcija fragmentov DNA iz agaroznega gela**

Gel, kjer je bil željen fragment, smo s skalpelom izrezali ter shranili v predhodno stehtano mikrocentrifugirko. Nato smo sledili protokolu kompleta za izolacijo DNA iz gela »GeneJET Gel Extraction Kit« (Thermo Scientific, ZDA). Izolirani fragment DNA smo shranili v zamrzovalniku na -20 °C.

#### **3.4.5 Restrikcija**

##### a) Restrikcija z encimoma *BglII* in *SphI*

Fragmenta I in II za lasnični konstrukt smo izpostavili encimoma *BglII* in *SphI*, protismiseln fragment pa je encimu *SphI*. *BglII* ustvari štrleče konce na smiselnem koncu fragmenta I in protismiselnem koncu fragmenta II, ki so tako komplementarni in se lahko zlepijo v procesu ligacije. Encim *SphI* je ustvaril lepljive štrleče konce na promotorskih in terminatorskih koncih fragmentov ter vektorju, kar smo uporabili za združitev elementov v procesu ligacije za nastanek novih rekombinantnih plazmidov.

Reakcijska mešanica za fragmente:

- 35 µl očiščenih fragmentov po reakciji za prekrivanje
- 2 µl *SphI* (Thermo Scientific, ZDA)
- 2 µl *BglII* (le pri fragmentih za lasnične konstrukte) (Thermo Scientific, ZDA)
- 6 µl 10X pufra za restrikcijске encime
- do 60 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcijska mešanica je bila eno uro inkubirana na 37 °C, nato pa smo dodali 40 µl dH<sub>2</sub>O. Po dodatku 100 µl mešanice fenol/kloroform/izoamil alkohola smo mikrocentrifugirko 15 minut centrifugirali pri 13 000 rpm na sobni temperaturi. Zgornjo fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 10 µl natrijevega acetata in 250 µl 96 % etanola in preko noči

inkubirali na -20 °C. Naslednji dan smo po 15-minutnem centrifugiranju pri 13 000 rpm na 4 °C pelet sprali z ledeno hladnim 70 % etanolom, ga posušili na zraku, nato pa raztopili v 12 µl dH<sub>2</sub>O.

Reakcijska mešanica za plazmid P1061:

- 12 µl izoliranega plazmida P1061
- 4 µl *SphI* (Thermo Scientific, ZDA)
- 15 µl 10X pufra za restriktijski encim
- do 150 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcijska mešanica je bila eno uro inkubirana na 37 °C, nato pa smo vektor očistili s postopkom ekstrakcije fragmentov iz agaroznega gela.

b) Restriktijska mešanica z encimom *SacII*

Encim *SacII* smo uporabili za linearizacijo rekombinantnih plazmidov, ki smo jih nato transformirali v kvasovke *C. glabrata*. Restriktijsko mesto za encim *SacII* je znotraj 18S rDNA plazmida.

Reakcijska mešanica:

- 100 ng/µl plazmidne DNA
- 4 µl encima *SacII*
- 10 µl 10X pufra za restriktijski encim
- do 100 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcijska mešanica je bila dve uri inkubirana na 37 °C, nato pa smo dodali 10 µl natrijevega acetata in 250 µl 96 % etanola in dvajset minut inkubirali na -20 °C. Po 15-minutnem centrifugiranju pri 13 000 rpm na 4 °C smo pelet sprali z ledeno hladnim 70 % etanolom, ga posušili na zraku in raztopili v 15 µl dH<sub>2</sub>O.

c) Restriktionsko kartiranje rekombinantnih plazmidov z encimom *SacI*

Nove rekombinantne plazmide smo izpostavili encimu *SacI*, da smo preverili orientacijo protismiselnih in lasničnih vključkov v vektorju. Ker se je vključek lahko zlepil z vektorjem v dveh možnih orientacijah, smo po restrikciji na agaroznem gelu pričakovali enega od dveh restriktionskih vzorcev. Pri protismiselnih plazmidih smo tako pričakovali fragmente pri 5776, 4054 in 1547 bp ali 5776, 2985 in 2615 bp glede na standardno lestvico DNA. Pri lasničnih plazmidih pa smo pričakovali fragmente pri 5776, 4386 in 1547 bp ali 5776, 3085 in 2947 bp glede na standardno lestvico.

Reakcijska mešanica:

- 15 ng/ $\mu$ l plazmidne DNA
- 0,3  $\mu$ l encima *SacI* (Thermo Scientific, ZDA)
- 1  $\mu$ l 10X pufra za restriktionski encim
- do 10  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

Reakcijska mešanica je bila eno uro inkubirana na 37 °C, nato pa analizirana na 0,8 % agaroznem gelu z elektroforezo.

### 3.4.6 Defosforilacija

Vektor P1061 smo po linearizaciji z encimom *SphI* izpostavili alkalni fosfatazi, ki je odstranila fosfate, tako da se vektor ni zlepil nazaj v krožno obliko. To smo nato uporabili pri ligaciji.

Reakcijska mešanica:

- 48  $\mu$ l plazmidne DNA
- 2  $\mu$ l AP-fosfataze (Thermo Scientific, ZDA)
- 6  $\mu$ l 10X pufra za fosfatazo
- do 60  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

Reakcijska mešanica je bila inkubirana na 37 °C eno uro, nato pa smo dodali 40 µl dH<sub>2</sub>O. Po dodatku 100 µl mešanice fenol/kloroform/izoamil alkohola smo mikrocentrifugirko petnajst minut centrifugirali pri 13 000 rpm na sobni temperaturi. Zgornjo fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 10 µl natrijevega acetata in 250 µl 96 % etanola in inkubirali dvajset minut na -20 °C. Po 15-minutnem centrifugiranju pri 13 000 rpm na 4 °C smo pelet sprali z ledeno hladnim 70 % etanolom, ga posušili na zraku, nato pa raztopili v 12 µl dH<sub>2</sub>O.

### 3.4.7 Ligacija

Za protismiseln konstrukt smo v ligacijski mešanici združili lineariziran vektor P1061 in protismiseln vključek (združen promotor, protismiseln del ter terminator). Za lasnični konstrukt smo v ligacijski mešanici združili lineariziran vektor P1061 in fragment I (promotor in smiselni del) ter fragment II (protismiseln del in terminator). Vsi ti elementi so bili pred tem primerno razrezani z restriktionskimi encimi, da so nastali štrleči konci, ki jih je ligaza T4 nato zlepila. Ligacijske mešanice smo inkubirali na sobni temperaturi od štirih ur do preko noči. Volumne insertov, ki smo jih uporabili za ligacijo, smo izračunali po spodnji formuli:

$$\text{Masa inserta (ng)} = 3 \times \text{velikost inserta (bp)} \times \text{masa vektorja (ng)} / \text{velikost vektorja (bp)} \quad \dots(1)$$

Ker ligacija za lasnične konstrukte večkrat ni bila uspešna, smo spremajali razmere med reagenti.

Reakcijska mešanica za protismiseln konstrukt:

- Vektor P1061 (končna koncentracija 150 ng/µl)
- Protismiseln vključek (volumen preračunan po zgornji formuli)
- 0,7 µl ligaze T4
- 0,7 µl pufra za ligazo
- do 7 µl dH<sub>2</sub>O

Reakcijska mešanica za lasnični konstrukt:

- Vektor P1061 (končna koncentracija 150 ng/µl)
- Fragment I (volumen preračunan po zgornji formuli)
- Fragment II (volumen preračunan po zgornji formuli)
- 0,7 µl ligaze T4
- 0,7 µl pufra za ligazo
- do 7 µl dH<sub>2</sub>O

#### **3.4.8 Priprava kompetentnih *E. coli***

Kulturo *E. coli* XL-1 blue smo nagojili v 500 ml LB na 37 °C na stresalniku (200 obratov na minuto) do OD<sub>600</sub>=1. Bakterije smo inkubirali na ledu petnajst minut in jih nato dvanaest minut centrifugirali pri 4000 rpm na 4 °C ter celice sprali z ledeno hladno dH<sub>2</sub>O. Zelo pomembno je bilo, da smo imeli celice ves čas na hladnem (na ledu). Peletu smo nato dodali 10 % celičnega volumna 100 % sterilnega glicerola in celice razdelili v mikrocentrifugirke po 40 µl ter jih do uporabe shranili na -80 °C.

#### **3.4.9 Transformacija v *E. coli***

Ligacijsko mešanico smo deset minut inkubirali na 65 °C, da smo inaktivirali ligazo T4, nato pa jo nekaj časa pustili na ledu. Mešanici smo dodali 14 µl dH<sub>2</sub>O in od tega vzeli 5 µl ter jih dodali 40 µl kompetentnih *E. coli* XL-1 blue v elektroporacijski kivet. Nato smo izvedli elektroporacijo (2,45 kV, 100 Ω), dodali 1 ml tekočega LB in kulturo eno uro inkubirali na 37 °C. Kulturo smo nato sedem minut centrifugirali pri 7000 rpm na 4 °C in celice nagojili na ploščah LB z ampicilinom ter preko noči inkubirali na 37 °C, da so zrasle transformante.

### **3.4.10 Izolacija plazmida iz *E. coli***

Prekonočno kulturo transformiranih bakterij v 50 ml LB z ampicilinom smo deset minut centrifugirali pri 4000 rpm na 4 °C. Pelet smo sprali s 30 ml raztopine I in ga nato resuspendirali v isti raztopini. Dodali smo 2 ml raztopine II in 1,5 ml kalijevega acetata ter petnajst minut centrifugirali pri 4500 rpm na 4 °C. Supernatant smo prefiltrirali s pomočjo servietkov, dodali isti volumen izopropanola in pustili stati deset minut. Nato smo suspenzijo petnajst minut centrifugirali pri 4500 rpm na sobni temperaturi. Pelet smo posušili in raztopili v 300 µl dH<sub>2</sub>O, dodali 700 µl amonijevega acetata ter deset minut centrifugirali pri 13 000 rpm na 4 °C. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali isti volumen izopropanola. Po 15-minutnem centrifugiranju pri 13 000 rpm na sobni temperaturi smo pelet sprali z ledeno hladnim 70 % etanolom, posušili na zraku in raztopili v 100 µl dH<sub>2</sub>O. Dodali smo 100 µl mešanice fenol/kloroform/izoamil alkohola in petnajst minut centrifugirali pri 13 000 rpm na sobni temperaturi. Zgornjo fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 10 µl natrijevega acetata in 250 µl 96 % etanola ter deset minut inkubirali na -20 °C. Po 15-minutnem centrifugiranju pri 13 000 rpm na 4 °C smo pelet sprali z ledeno hladnim 70 % etanolom, ga posušili na zraku, nato pa raztopili v 100 µl dH<sub>2</sub>O.

### **3.4.11 Transformacija kvasovke *C. glabrata***

Prekonočno kulturo sevov Y1662 in Y1699 *C. glabrata* smo inokulirali v 75 ml YPD tekočega gojišča in nagojili celice do OD<sub>600</sub>=0,6. Kulturo smo deset minut centrifugirali pri 4000 rpm na sobni temperaturi, nato pa pelet sprali s 40 ml dH<sub>2</sub>O. Pelet smo resuspendirali v 20 ml litijevega acetata in ga eno uro inkubirali na 25 °C. Kulturo smo deset minut centrifugirali pri 4000 rpm na sobni temperaturi, ostranili supernatant, celice pa razdelili po 100 µl v mikrocentrifugirke. Dodali smo 5-10 µl lineariziranega rekombinantnega plazmida z encimom *SacII* ter 10 µl denaturirane enovijačne DNA lososove sperme (denaturirali smo jo na 100 °C pet minut). Po dodatku 500 µl PEG3350 smo mešanico inkubirali na 25 °C trideset minut. Celice smo nato za 15 minut izpostavili toplotnemu šoku na 42 °C in jih ohladili na ledu. Po 2-minutnem centrifugiranju pri 3000 rpm na sobni

temperaturi smo pelet resuspendirali v 1 ml YPD in mikrocentrifugirko eno uro inkubirali na 25 °C. Po 2-minutnem centrifugiranju na 3000 rpm na sobni temperaturi smo celice sprali z 1 ml dH<sub>2</sub>O in resuspendirali v 500 µl dH<sub>2</sub>O. Na minimalni medij YND smo nato nanesli 30-50 µl kulture v dveh ponovitvah in plošče inkubirali na 25 °C tri do pet dni.

### **3.4.12 Seleksijski test presajanja**

Po nekaj dnevni inkubaciji transformiranih kvasovk na minimalnem gojišču smo približno dvajset posameznih kolonij prenesli na bogato gojišče YPD in plošče dva dni inkubirali na 25 °C. Kolonije, ki so zrasle, smo znova presadili na YPD in dva dni inkubirali. Od kolonij, ki so preživele, smo izbrali osem najboljših in jih ponovno presadili na YPD ter po dveh dneh inkubacije plošče odtisnili na minimalno gojišče YNB ter inkubirali nekaj dni na 25 °C.

## 4 REZULTATI

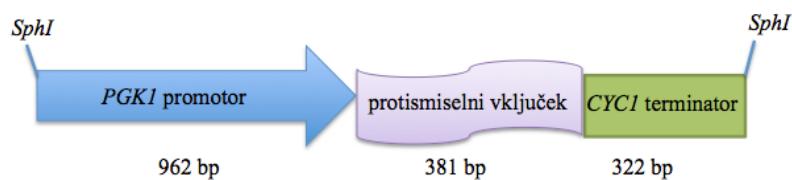
Najprej smo izolirali celotno genomsko DNA kvasovke *C. glabrata* seva CBS 138, ki je služila kot matrica za pomnoževanje fragmentov (promotorji, smiselni in protismiseln fragmenti ter terminatorji). Slike gelske elektroforeze je razvidno, da je bila izolacija uspešna (slika 5).



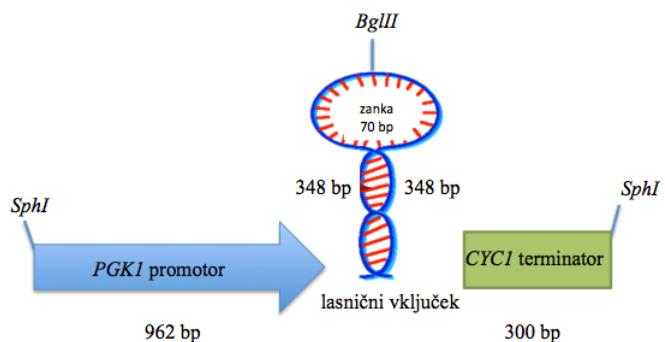
Slika 5: Celotna genomska DNA kvasovke *C. glabrata* CBS 138.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (2) Genomska DNA kvasovke *C. glabrata* CBS 138.

Izolirana kvasna DNA nam je služila kot matrica za pomnožitev posameznih genskih fragmentov s PCR. Za sintezo konstruktov smo pomnožili promotor *PGK1*, smiselne ter protismiselne dele tarčnega gena (350-450 bp) in terminator *CYC1*. *PGK1* je konstitutivno aktiven promotor, ki ima visok nivo izražanja na mediju z glukozo. *CYC1* terminator je pomemben za pravilno zaključevanje transkripcije med izražanjem. Na slikah 6 in 7 sta prikazani shemi želenih konstruktov za vstavitev v vektor P1061. V prilogi B so prikazane sekvene vseh konstruktov, ki smo jih želeli ustvariti.

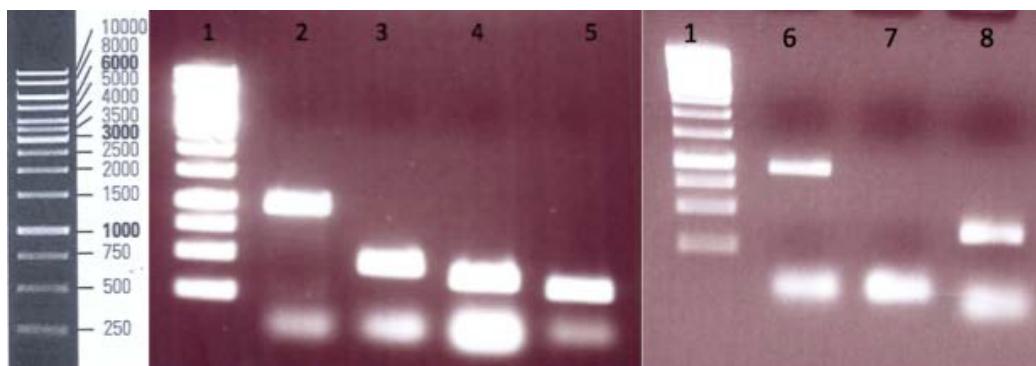


Slika 6: Protismiseln konstrukt s promotorskim in terminatorskim zaporedjem.



Slika 7: Lasnični konstrukt s promotorskim in terminatorskim zaporedjem.

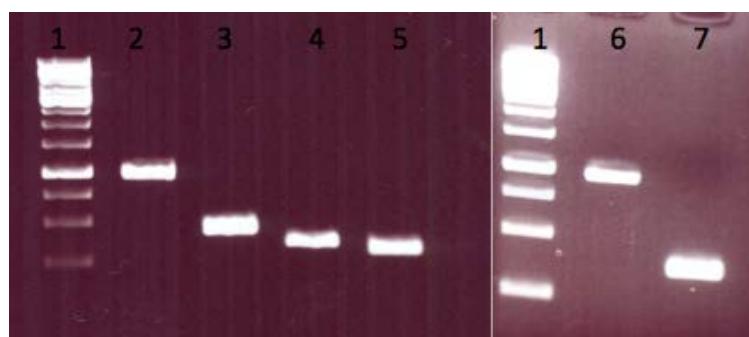
Za pomnoževanje smo uporabili specifično sintetizirane oligonukleotidne začetnike (prikazani v prilogi A) in po pomnožitvi pomnožke analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (slika 8). Za vsak gen smo za lasnične konstrukte pomnožili promotor, smiselni in protismiselni fragment ter terminator. Za protismiselne konstrukte smo pomnožili promotor in protismiselni fragment, terminator pa je bil za isti gen isti. Na sliki so kot primer prikazani posamezni pomnožki za gen CAGL0A00517g.



Slika 8: Standardna 1 kb DNA lestvica in PCR pomnožki za lasnični in protismiselni konstrukt gena CAGL0A00517g.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (2) Promotor za lasnični konstrukt – 943 bp (3) Smiselni fragment – 418 bp (4) Protismiselni fragment za lasnični konstrukt – 348 bp (5) Terminator za lasnični konstrukt – 300 bp (6) Promotor za protismiselni konstrukt – 961 bp (7) Negativna kontrola PCR reakcije (8) Protismiselni fragment za protismiselni konstrukt

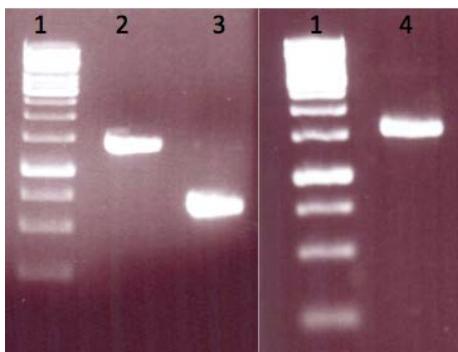
Po pomnožitvi s PCR smo celotno vsebino pomnožkov naložili v agarozni gel in jih po elektroforezi očistili vseh reaktantov iz PCR reakcije s pomočjo kompleta »GeneJET Gel Extraction Kit«. Na gelu smo nato preverili koncentracijo in čistost pomnožkov. Vidno je, da so pomnožki brez nečistoč (slika 9).



Slika 9: Očiščeni PCR pomnožki za lasnični in protismiselni konstrukt gena CAGL0A00517g.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (2) Promotor za lasnični konstrukt – 943 bp (3) Smiselni fragment – 418 bp (4) Protismiselni fragment za lasnični konstrukt – 348 bp (5) Terminator za lasnični konstrukt – 300 bp (6) Promotor za protismiselni konstrukt – 961 bp (7) Protismiselni fragment za protismiselni konstrukt

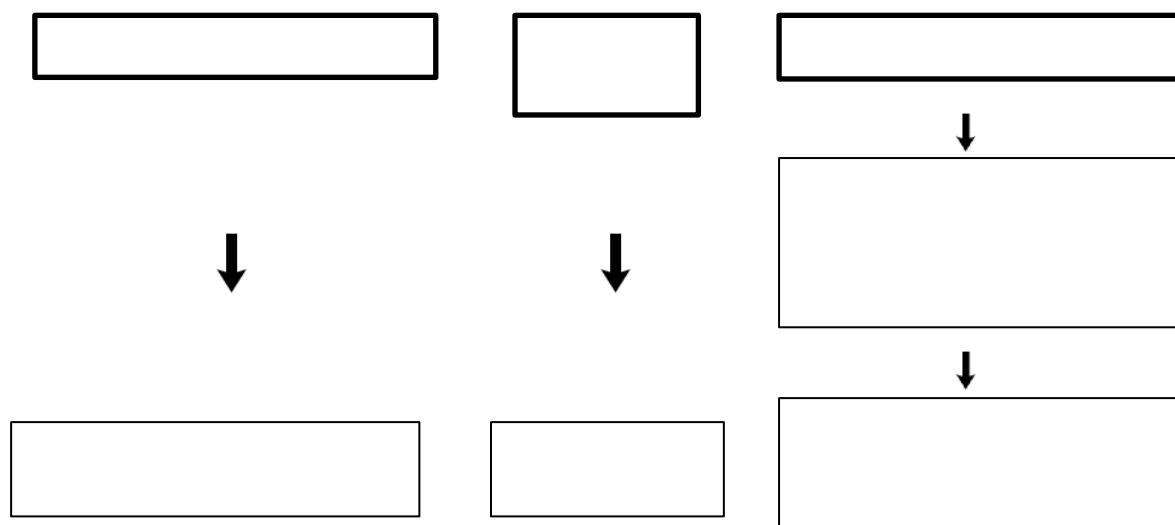
Z očiščenimi pomnožki smo nato izvedli PCR reakcijo za združitev pomnožkov, kjer smo za lasnični konstrukt s pomočjo PCR reakcije združili promotor in smiselni del v fragment I ter protismiselni del in terminator v fragment II. Za protismiselni konstrukt smo s pomočjo PCR reakcije združili vse tri dele, torej promotor, protismiselni del in terminator, v fragment III. Enako smo storili pri vseh preučevanih genih, na sliki 10 pa je prikazan primer za gen CAGL0A00517g. Nastale fragmente smo naložili v agarozni gel in jih po elektroforezi očistili vseh reaktantov iz PCR reakcije s pomočjo kompleta »GeneJET Gel Extraction Kit«. Na gelu smo nato preverili koncentracijo in čistost pomnožkov.



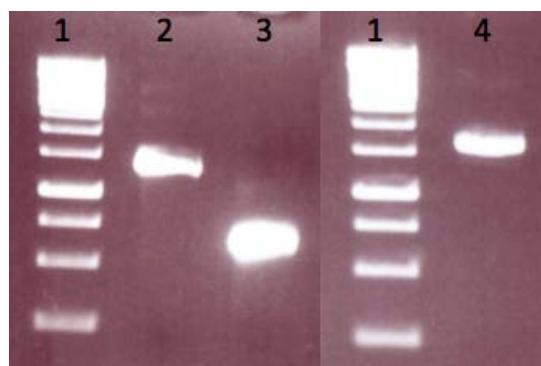
Slika 10: Nastali združeni fragmenti po PCR reakciji za gen CAGL0A00517g.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (2) Fragment I - 1381 bp (promotor in smiselni del za lasnični konstrukt) (3) Fragment II – 648 bp (protismiselni del in terminator za lasnični konstrukt) (4) Fragment III – 1642 bp (promotor, protismiselni del in terminator za protismiselni konstrukt)

Nastale združene fragmente smo nato obdelali z restriktionskimi encimi (shema na sliki 11), da so nastali primerni štrleči konci, ki so bili potrebni za ligacijo. Fragmenta I in II za lasnični konstrukt smo izpostavili encimoma *BglIII* in *SphI*. Restriktionski encim *BglIII* ima prepoznavno mesto na koncih smiselnega in nesmiselnega dela fragmenta, ki sta se med ligacijo nato zlepila in tako združila fragment I (promotor in smiselni del) ter fragment II (protismiselni del in terminator). *SphI* ima prepoznavna zaporedja na začetku promotorja in terminatorja, z istim encimom smo obdelali tudi vektor P1061, tako da so se fragmenti lahko zlepili z vektorjem. Fragment III za protismiselni konstrukt smo obdelali le z encimom *SphI*, ki ima prepoznavna mesta na začetku promotorja in na koncu terminatorja fragmenta III. Ta restriktionska mesta smo namerno vstavili v začetne pomnožke s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki. Po restrikciji smo fragmente preverili z agarozno gelsko elektroforezo (slika 12).



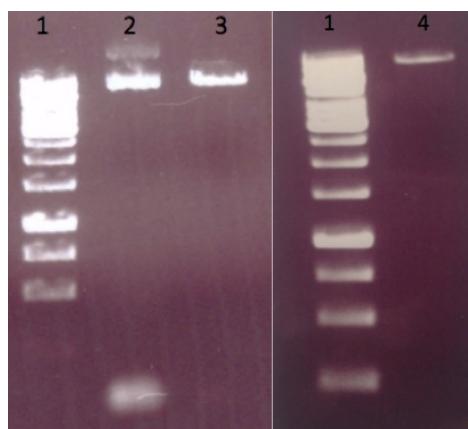
Slika 11: Shema restrikcije protismiselnih in lasničnih insertov.



Slika 12: Fragmenti po restrikciji z BglII in SphI za gen CAGL0A00517g.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (2) Fragment I - 1381 bp (promotor in smiselni del za lasnični konstrukt) (3) Fragment II – 648 bp (protismiselni del in terminator za lasnični konstrukt) (4) Fragment III – 1642 bp (promotor, protismiselni del in terminator za protismiselni konstrukt)

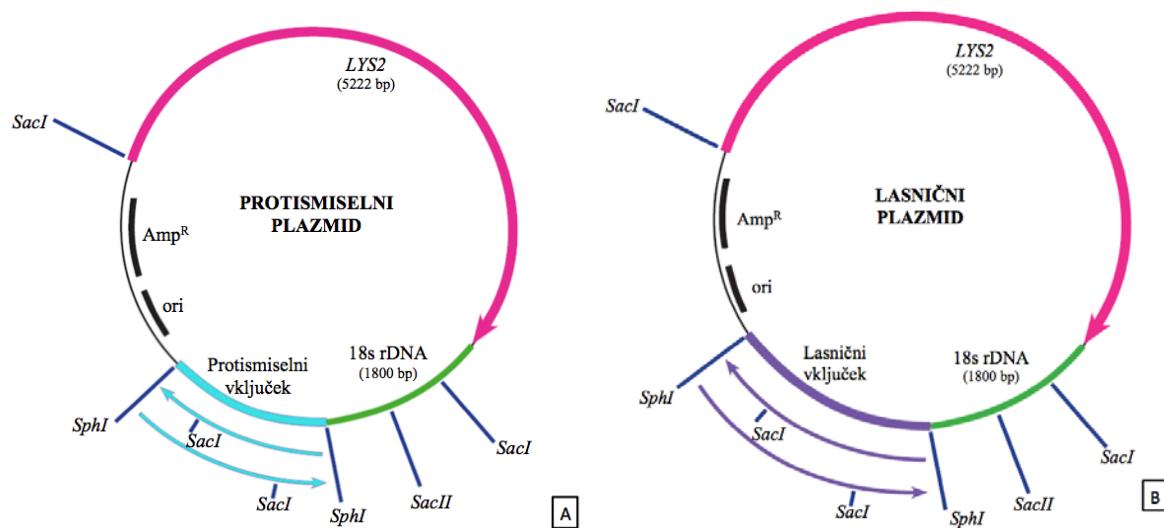
Vektor P1061 smo izolirali po postopku izolacije plazmida, nato pa ga s pomočjo restrikcijskega encima *SphI* linearizirali. Tako smo ustvarili štrleče konce, ki so bili komplementarni s štrlečimi konci promotorjev in terminatorjev fragmentov, ki smo jih želeli zlepiti z vektorjem v rekombinanten plazmid. Na sliki 13 vidimo, da je nativni (nerazrezan) plazmid P1061 na agaroznem gelu viden kot različne frakcije, saj različne konformacije (nadzvita, sproščeni krožni plazmidi, morebitni poškodovani linearizirani plazmidi) plazmidne DNA v gelu potujejo različno hitro. Plazmid, ki pa je bil lineariziran z encimom *SphI*, pa je potoval enotno, zato je viden le en fragment. Po restrikciji smo vektor očistili s kompletom »GeneJET Gel Extraction Kit«, nato pa iz štrlečih koncev odstranili fosfate, da se vektor ni zleplil nazaj v krožno obliko, in kvaliteto preverili na gelu.



Slika 13: Vektor P1061 pred in po restrikciji z encimom *SphI*.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (2) Nativni vektor P1061 (3) Vektor P1061, lineariziran s *SphI*  
(4) Lineariziran vektor P1061 po defosforilaciji

S pripravljenimi fragmenti in vektorjem smo nato izvedli ligacijo. Za lasnični konstrukt smo v mešanici za ligacijo združili linearni vektor ter fragmenta I in II, za protismiseln konstrukt pa linearni vektor in fragment III. Ligacija protismiselnega konstrukta je bila večkrat neuspešna, zato smo za postopek uporabili različna razmerja med fragmenti in vektorjem ter različno dolge inkubacijske čase (od 4 ur do prekonočne inkubacije).

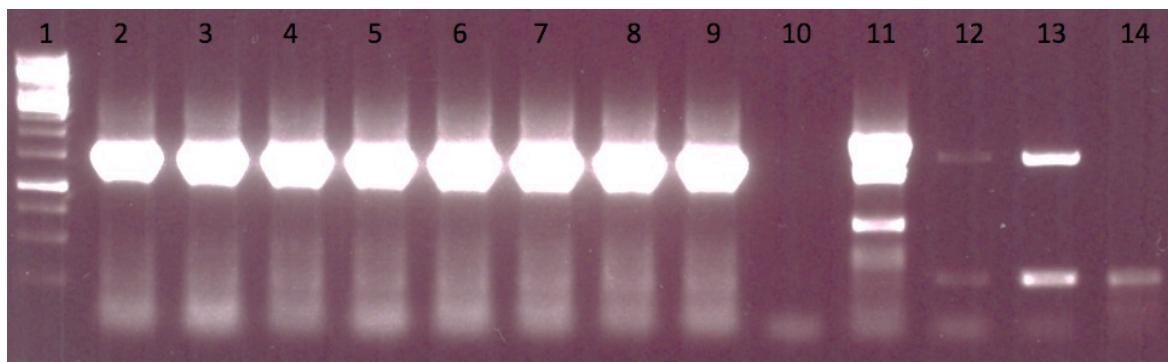


Slika 14: Rekombinantni plazmidi.

Legenda: (A) Protismiseln rekombinantni plazmid (B) Lasnični rekombinantni plazmid

Po ligaciji smo dobjene rekombinantne plazmide (slika 14) s pomočjo elektroporacije transformirali v kompetentne bakterije *E. coli* XL1-blue, nato pa celice preko noči namnožili na gojišču LB z ampicilinom na 37 °C. Ker so *E. coli* XL1-blue občutljive na ampicilin, s pridobitvijo plazmida pa pridobijo tudi odpornost proti ampicilinu, lahko na tem gojišču zrastejo. Ker na ta način seleкционiramo le celice, ki so prejele plazmid od celic, ki ga niso, ne pa celic, ki so prejele plazmid z vključkom ali brez njega, je potrebna nadaljnja analiza zraslih kolonij. Tako smo izvedli kontrolni PCR na osnovi kolonij za prisotnost želenega fragmenta. Na sliki 15 je prikazan primer za protismiseln konstrukt gena CAGL0M05049g, kjer vidimo, da imajo vse analizirane kolonije želene vključke (fragment III). Pri lasničnem konstraktu istega gena pa vidimo, da je le ena kolonija (številka 11) vsebovala želen konstrukt (združena fragmenta I in II). Opazimo lahko tudi tipično razlikovanje PCR pomnožkov za oba različna konstrukta. Protismiseln konstrukt je po PCR reakciji, kjer uporabimo oligonukleotidne začetnike za celoten vključek (torej od promotorja do terminatorja), na agaroznem gelu kot debela packa, medtem ko ima lasnični vključek značilno fragmentiran pomnožek. Pomembno je omeniti tudi, da je po

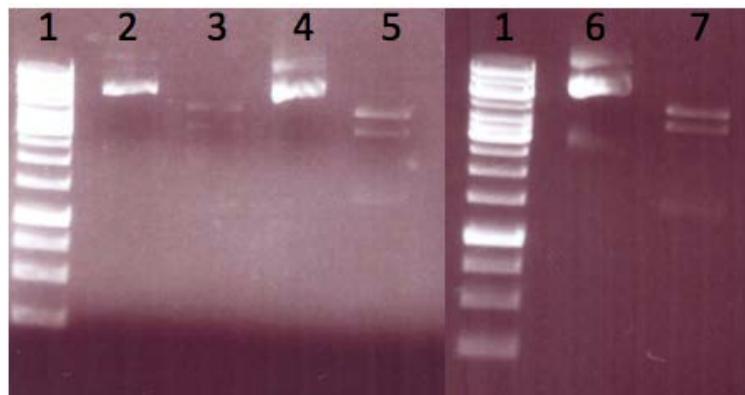
transformaciji s protismiselnimi konstrukti na LB+Amp zraslo veliko število kolonij (med 200 in 300), z lasničnimi konstrukti pa mnogo manj (med 4 in 11).



Slika 15: Kontrolni PCR na osnovi kolonij za gen CAGL0M05049g.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (2-9) Kolonije analizirane za protismiselni konstrukt gena CAGL0M05049g – 1669 bp, vidno je, da so imele vse analizirane kolonije želen pomnožek (10) Negativna kontrola PCR reakcije (11-14) Kolonije analizirane za lasnični konstrukt gena CAGL0M05049g –2100 bp, vidno je, da ima le št. 11 želen pomnožek s tipično sliko na agaroznem gelu

Rekombinantne plazmide smo preko noči pomnožili v *E. coli* XL1-blue v 50 ml LB z ampicilinom na 37 °C in jih izolirali. Nato smo izvedli restrikcijo rekombinantnih plazmidov z encimom *SacI* za potrditev ligacije želenega vključka v vektor. Plazmid P1061 ima dve restrikcijski mesti za *SacI*, nov rekombinantni plazmid pa tri, saj je dodatno restrikcijsko mesto znotraj vključkov. Vključek se je v vektor lahko zlepil v dveh možnih orientacijah (slika 14), zato sta pri obeh konstruktih možna dva restrikcijska vzorca. Tako smo z dolžinami restrikcijskih fragmentov preverili, ali smo uspeli klonirati želen konstrukt, *E. coli* XL1-blue z rekombinantnimi plazmidi pa smo po potrditvi shranili na -80 °C v zbirki plazmidov. Na sliki 16 je primer restrikcijskega kartiranja lasničnega in protismiselnega konstrukta gena CAGL0A00517g.



Slika 16: Restriktionsko kartiranje plazmidov z encimom *SacI*.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (2) Nativni plazmid P1061 (3) Plazmid P1061 rezan z encimom *SacI* – produkt sta dva fragmenta velikosti 5776 bp in 3933 bp (4) Nativni protismiselnih rekombinatnih plazmid gena CAGL0A00517g (5) Protismiselnih rekombinatnih plazmid gena CAGL0A00517g rezan z encimom *SacI* – produkt so trije fragmenti velikosti 5776 bp, 4054 bp in 1547 bp (6) Nativni lasnični rekombinantni plazmid gena CAGL0A00517g (7) Lasnični rekombinantni plazmid gena CAGL0A00517g rezan z encimom *SacI* - produkt so trije fragmenti velikosti 5776 bp, 4386 bp in 1547 bp

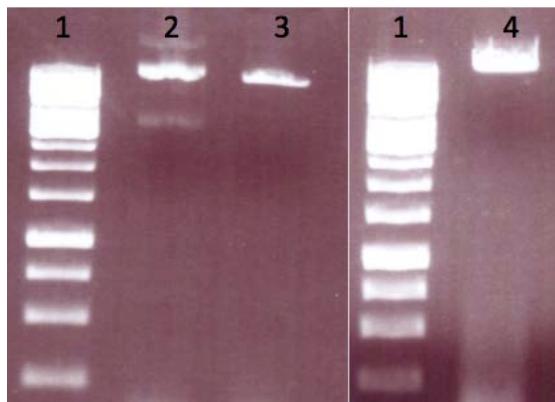
Preglednica 7 prikazuje uspešno klonirane nove rekombinantne plazmide, ki smo jih shranili v laboratorijsko zbirk. Uspešno smo ustvarili sedem protismiselnih konstruktor ter dva lasnična.

Preglednica 7: Novi rekombinantni plazmidi s protismeselnim in zankastim konstruktom.

Št.	Ime	Izvor	Vsebuje konstrukt za gen	Vrsta konstrukta	Velikost rekombinantnega plazmida
1	P1112	P1061	CAGL0A00517g	Protismiselnii	11 350 bp
2	P1114	P1061	CAGL0A00517g	Lasnični	11 737 bp
3	P1116	P1061	CAGL0F00495g	Protismiselnii	11 372 bp
4	P1122	P1061	CAGL0M05049g	Protismiselnii	11 377 bp
5	P1123	P1061	CAGL0M05049g	Lasnični	11 808 bp
6	P1124	P1061	CAGL0M11748g	Protismiselnii	11 372 bp
7	P1125	P1061	CAGL0M12947g	Protismiselnii	11 372 bp
8	P1126	P1061	CAGL0L05434g	Protismiselnii	11 369 bp
9	P1127	P1061	CAGL0C00363g	Protismiselnii	11 370 bp

Rekombinantne plazmide smo nato linearizirali z restriktionskim encimom *SacII*, ki ima le eno prepoznavno mesto, in sicer znotraj 18S rDNA. Razrezan plazmid smo preverili na

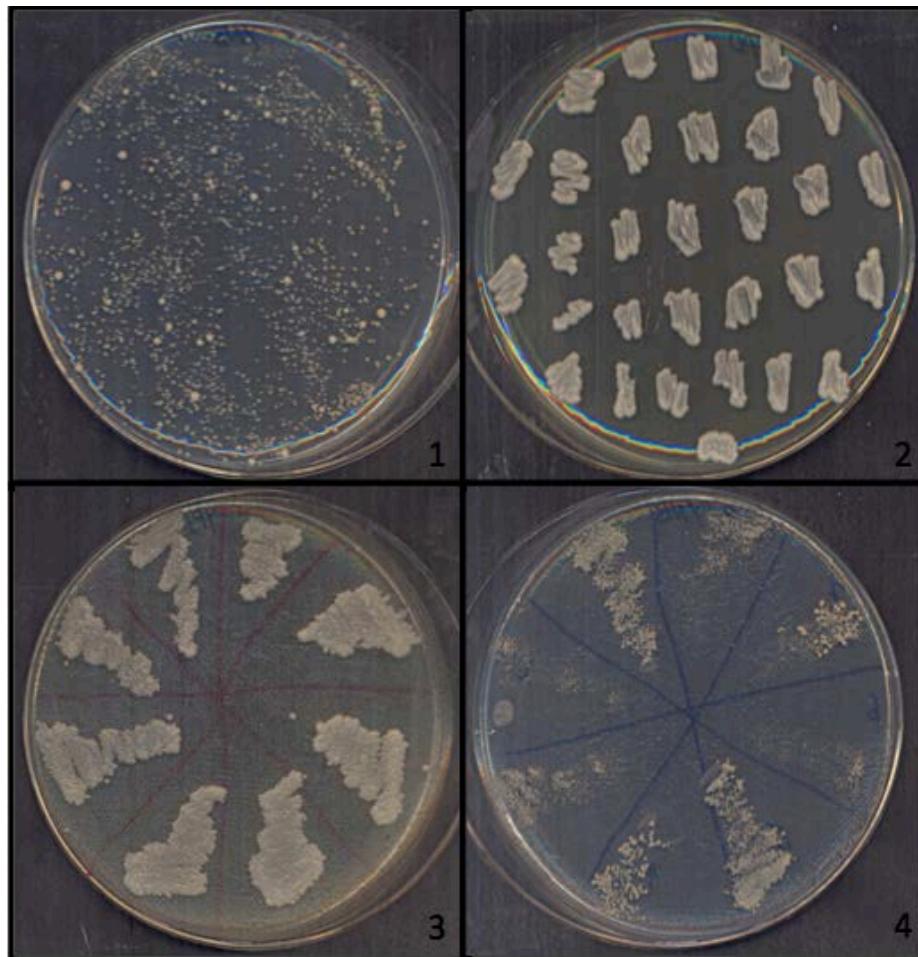
agaroznem gelu, kjer je potoval kot en fragment. Tako je bil plazmid pripravljen za homologno rekombinacijo na odseku 18S rDNA v *C. glabrata* po transformaciji. Na sliki 17 je prikazan primer restrikcije lasničnega in protismiselnega konstrukta gena CAGL0A00517g.



Slika 17: Rezanje rekombinantnih plazmidov z encimom *SacII*.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (2) Nativni lasnični rekombinantni plazmid gena CAGL0A00517g (3) Lasnični rekombinatni plazmid gena CAGL0A00517g rezan z encimom *SacII* – produkt je en fragment (4) Protismiselni rekombinantni plazmid gena CAGL0A00517g rezan z encimom *SacII* – produkt je en fragment

Rekombinantne plazmide smo transformirali v seva Y1662 (klinični izolat z *DCR1* in *AGO1*) in Y1699 (divji tip z *DCR1* in *AGO1*), nato pa celice nagojili na trdnem selektivnem gojišču YNB, ki je omogočilo rast kvasovkam, ki so prejele rekombinantni plazmid, saj so tako pridobile selektivni marker *LYS2*. Transformirane kvasovke so za rast na minimalnem gojišču potrebovale 3-5 dni. Opazili smo, da je bilo število kolonij s protismiselimi konstruktmi vedno večje od števila kolonij z lasničnimi konstruktmi. Iz selektivnega gojišča smo prenesli okoli dvajset posameznih kolonij na bogato gojišče YPD in plošče inkubirali dva dni, nato pa spet prenesli posamezne kolonije na nov YPD. Ta postopek je omogočil selekcijo stabilnih integriranih plazmidov, saj celice z nestabilno integriranimi plazmidi niso rasle. Med kolonijami, ki so zrasle, smo osem najboljših prenesli na novo gojišče YPD in ga inkubirali dva dni. Nato smo to gojišče s pomočjo žameta odtisnili na selektivno gojišče YNB (slika 18).



Slika 18: Preverjanje stabilnosti transformiranih kvasovk na minimalnem in bogatem gojišču.

Legenda: (1) Zrasle transformante s protismiselnim konstruktom gena CAGL0A00517g na minimalnem gojišču YNB (2) Posamezne kolonije, prenesene na bogato gojišče YPD (dvakrat ponovljeno) (3) Osem stabilnih posameznih kolonij, prenesenih na bogato gojišče YPD (4) Odtis bogatega gojišča YPD na minimalno gojišče YND z žametom

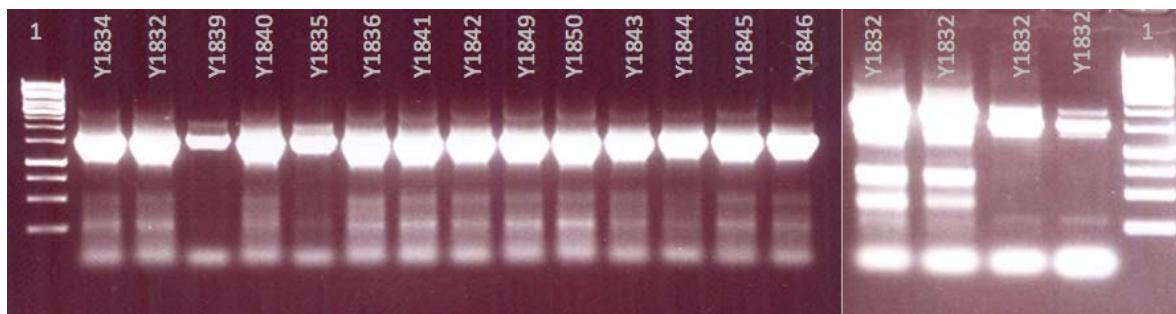
Iz kolonij, ki so po selekciji na minimalnem in več generacijah na bogatem gojišču zrasle, smo izolirali celotno kvasno DNA in izvedli kontrolni PCR za prisotnost želenih konstruktov. Kolonije, ki so preživele selekcijo na bogatih in selektivnih gojiščih ter so imele protismiselni ali lasnični konstrukt, smo smatrali za stabilne ter jih shranili na -80 °C v laboratorijski zbirki.

Preglednica 8 prikazuje nove seve *C. glabrata* z RNAi mehanizmom in protismiselnimi ter lasničnimi konstrukti, ki smo jih shranili v laboratorijsko zbirko.

Preglednica 8: Novi sevi kvasovk *C. glabrata* z RNAi mehanizmom in protismiselnimi ter lasničnimi konstrukti.

Število	Nov sev	Osnovni sev za transformacijo	Tarčni gen	Vrsta konstrukta
1	<b>Y1834</b>	Y1662	CAGL0A00517g	Protismeslni
2	<b>Y1832</b>	Y1699	CAGL0A00517g	Protismeslni
3	<b>Y1831</b>	Y1662	CAGL0A00517g	Lasnični
4	<b>Y1830</b>	Y1699	CAGL0A00517g	Lasnični
5	<b>Y1839</b>	Y1662	CAGL0F00495g	Protismeslni
6	<b>Y1840</b>	Y1699	CAGL0F00495g	Protismeslni
7	<b>Y1835</b>	Y1662	CAGL0M05049g	Protismeslni
8	<b>Y1836</b>	Y1699	CAGL0M05049g	Protismeslni
9	<b>Y1837</b>	Y1662	CAGL0M05049g	Lasnični
10	<b>Y1838</b>	Y1699	CAGL0M05049g	Lasnični
11	<b>Y1841</b>	Y1662	CAGL0M11748g	Protismeslni
12	<b>Y1842</b>	Y1699	CAGL0M11748g	Protismeslni
13	<b>Y1849</b>	Y1662	CAGL0C00363g	Protismeslni
14	<b>Y1850</b>	Y1699	CAGL0C00363g	Protismeslni
15	<b>Y1843</b>	Y1662	CAGL0M12947g	Protismeslni
16	<b>Y1844</b>	Y1699	CAGL0M12947g	Protismeslni
17	<b>Y1845</b>	Y1662	CAGL0L05434g	Protismeslni
18	<b>Y1846</b>	Y1699	CAGL0L05434g	Protismeslni

Slika 19 prikazuje kontrolni PCR za prisotnost lasničnih in protismeslnih vključkov v genomu kvasovk *C. glabrata*. S tem smo potrdili stabilno integracijo rekombinantnih plazmidov.



Slika 19: Kontrolni PCR za prisotnost lasničnih in protismiselnih vključkov v genomu kvasovk *C. glabrata*.

Legenda: (1) Standardna 1 kb DNA lestvica (Y1832-Y1850) Novi rekombinantni sevi

Na koncu smo s pomočjo kontrolnega PCR rekombinantne seve preverili za prisotnost genov za Dicer in Argonaut, da smo se prepričali, da kvasovke teh genov med transformacijo in selekcijo niso izgubile. Vsi sevi so imeli prisotne gene za Dicer in Argonaut integrirane v svojem genomu.

## 5 RAZPRAVA

V raziskavi smo s pomočjo molekularnih metod poskušali ustvariti RNAi orodje za raziskovanje funkcij posameznih genov kvasovke *C. glabrata*. V ta namen smo izbrali sedem genov, za katere menimo, da so udeleženi pri virulenci te kvasovke. Za vzpostavitev delajočega RNAi orodja v kvasovki *S. cerevisiae* je Drinnenberg s sod. (2009) uporabil zgolj gena *DCR1* in *AGO1* iz *S. castellii* ter protismiselne in lasnične konstrukte tarčnih genov. Na podoben način smo se lotili tudi vzpostavitve RNAi orodja *C. glabrata*. V našem laboratoriju sta bila predhodno razvita seva Y1662 in Y1699, ki imata vstavljenia gena za encima Dicer ter Argonaut iz kvasovke *S. castellii* in sta pod konstitutivnimi promotorji, ki imajo visoko aktivnost na mediju z glukozo. Delovanje RNAi mehanizma z vstavljenima genoma so v našem laboratoriju dokazali z vstavitvijo protismiselnih in lasničnih konstruktov, ki so zmanjšali izražanje dveh poročevalskih genov *ADE2* in *URA3*, kar se je pokazalo v zelo jasno spremenjenem fenotipu (Ishchuk, 2013; še neobjavljeni rezultati). *ADE2* kodira AIR-karbokilazo, ki je pomembna pri biosintezi purinov. Če je izražanje gena *ADE2* na minimalnem gojišču brez adenina nizko, se v celicah nakopiči roza pigment. *URA3* kodira orotidin-5-fosfatno dekarboksilazo (ODCaza), ki je vpletena v biosintezo pirimidinov. Mutante *ura3*<sup>-</sup> so sposobne rasti na minimalnem gojišču z dodatkom analoga 5-FOA (Stearns in sod., 1991). Transformante *C. glabrata* s protismiselnimi konstrukti genov *ADE2* in *URA3* so na minimalnem gojišču rasle slabše zaradi zmanjšanega izražanja tarčnih genov. V primeru lasničnih konstruktov pa so transformante *C. glabrata* postale avksotrofne zaradi močne inhibicije izražanja tarčnih genov. Pri lasničnih konstruktih za *ADE2* so opazili pojav roza kolonij, pri *URA3* pa so transformante bile sposobne rasti na 5-FOA (Ishchuk, 2013; še neobjavljeni rezultati). V tej raziskavi smo poskušali ustvariti protismiselne in lasnične konstrukte določenih tarčnih genov, za katere sumimo, da so povezani z virulenco kvasovke *C. glabrata*, in jih vnesti v seva Y1662 in Y1699.

V raziskavi smo preverili, ali vstavljen RNAi mehanizem deluje tudi v primeru izbranih tarčnih genov, s čimer bi lahko v prihodnje raziskovali njihovo funkcijo, ki je do sedaj še neznana. V ta namen smo ustvarili specifične oligonukleotidne začetnike (prikazani v

prilogi A), s katerimi smo pomnožili vse potrebne elemente: promotorje *PGK1*, terminatorje *CYC1* ter smiselne in protismiselne dele vseh genov v interesu. Oligonukleotidni začetniki so bili premišljeno sintetizirani z vstavljenimi restrikcijskimi mesti za encime, ki smo jih uporabili v procesu kloniranja. Tako je bilo na začetku promotorskih sekvenc in na koncu terminatorskih na ta način vstavljeni restrikcijsko mesto za encim *SphI*, na koncih smiselnega in protismiselnega dela za lasnični konstrukt pa restrikcijsko mesto za encim *BglII*. Ta restrikcijska mesta smo uporabili za nastanek štrlečih koncev, ki so se zlepili med ligacijo.

Na ta način smo uspešno pomnožili vse potrebne elemente z uporabo matrične DNA, ki smo jo izolirali iz divjega tipa *C. glabrata* (slika 5). S pomočjo agarozne gelske elektroforeze smo preverili PCR pomnožke, ki so bili pravilnih velikosti in zadostnih koncentracij za nadaljnje delo in tako potrdili specifičnost oligonukleotidnih začetnikov (slika 8). Koncentracije PCR pomnožkov smo preverili tudi po uporabi kompleta za očiščenje pomnožkov, kjer smo ugotovili, da se je tekom procesa koncentracija zmanjšala, kar smo tudi pričakovali (slika 9). Kljub temu sta bili kvaliteta in koncentracija zadovoljivi za nadaljevanje. PCR za prekrivanje fragmentov je bil prav tako zelo uspešen, produkti so bili pravilnih velikosti in dobrih koncentracij tudi po očiščenju reaktantov PCR reakcije (slika 10). Pojavili so se manjši problemi pri določevanju koncentracij z opremo Nanodrop, saj se rezultati niso ujemali z ocenjenimi koncentracijami na agaroznem gelu, zato smo za izračune večinoma uporabljali ocnjene koncentracije na gelu.

Pri pripravi vektorja P1061 po izolaciji je bilo pomembno, da smo pri rezanju z restrikcijskim encimom *SphI* začeli z visoko koncentracijo plazmida, saj smo tekom očiščevanja s kompletom in tretiranja s fenol/kloroform/izoamil alkoholom vedno izgubili nekaj DNA tekom postopkov. Isto je bilo pomembno tudi pri ostalih delih kloniranja, kjer smo uporabili te postopke.

Postopek ligacije protismiselnih fragmentov z vektorjem je bil uspešen za vseh sedem genov, prav tako je bila transformacija v *E. coli* XL-1 blue z elektroporacijo visoko učinkovita, saj je vedno zraslo veliko število transformant. Kontrolni PCR za prisotnost

želenih fragmentov smo izvedli na nekaterih zraslih kolonijah (8-12 kolonij) ter ugotovili, da so v večini vse kolonije vsebovale želen fragment. Ugotovili smo, da so bila restriksionska mesta v PCR reakciji z oligonukleotidnimi začetniki vstavljeni pravilno in uspešno, saj so se protismiselnii vključki v procesu ligacije uspešno zlepili z vektorjem.

Drugače pa je bilo z lasničnimi konstrukti. V procesu ligacije smo želeli združiti dva fragmenta z vektorjem, kar je zmanjšalo učinkovitost, saj smo uspeli na ta način pridobiti le dva rekombinantna plazmida. Za ligacijo je pomembno, da se srečajo pravi štrleči konci in v tej reakciji sta bila dva različna (nastala z encimoma *BglII* in *SphI*), zato je bila ligacija manj uspešna. Za reševanje te težave smo uporabili različna razmerja med fragmenti in vektorjem ter ligacijsko mešanico inkubirali na sobni temperaturi od štirih ur do preko noči. Za uspešnejšo ligacijo lasničnih konstruktov bi lahko poleg različnih razmerij med fragmenti in vektorjem ter različno dolgo inkubacijo preizkusili tudi ligacijo na različnih temperaturah. V literaturi večkrat zasledimo priporočanje ligacije na 16 °C ali celo na 4 °C (Aslanidis in Jong, 1990). Na ta način se delci gibajo počasneje, kar bi lahko povečalo učinkovitost reakcije ter preprečilo nastajanje sekundarnih struktur med fragmenti. Pri pridobljenih dveh rekombinantnih plazmidih z lasnično strukturo smo po transformaciji v *E. coli* XL-1 blue z elektroporacijo opazili tudi mnogo manjše število transformiranih kolonij, za en konstrukt enajst, za drugega pa le štiri. Tako je očitno, da je ligacija treh elementov zahtevnejša in manj učinkovita, prav tako pa so bakterijske celice težje sprejele večje plazmide, ki so se tudi manj učinkovito podvajali v njih. Včasih smo zavrgli zrasle kolonije po transformaciji, saj je bil kontrolni PCR na osnovi kolonij negativen za prisotnost želenega vključka. Takšne kolonije so verjetno sprejele le plazmid brez želenih vključkov, ki jim je omogočil preživetje na gojišču z ampicilinom. Morda se je pojavil problem tudi pri rezanju z encimom *BglII*, saj je ta korak ločil fragmente protismiselnih in lasničnih konstruktov. V literaturi zasledimo tudi problematičnost odstranitve fosfata iz linearnih koncev vektorja, saj je to lahko le deloma uspešno in se vektor lahko zlepi nazaj brez vstavljenega vključka (Aslanidis in Jong, 1990).

Transformacija rekombinantnih plazmidov v kvasovke *C. glabrata* je bila zelo uspešna, saj je na minimalnem gojišču zraslo ogromno kolonij, ki so za rast potrebovale povprečno pet

dni. V literaturi obstaja mnogo različnih protokolov in nasvetov za transformacijo kvasovk in tako smo v naši raziskavi uporabili monovalentne katione Li<sup>+</sup> (litijev acetat), ki povečajo uspešnost transformacije. Prav tako smo tekom procesa celice izpostavili PEG3350 in 15-minutnemu temperaturnemu šoku na 42 °C (Kawai in sod., 2010). Ugotovili smo, da je izbran protokol optimalen za transformacijo kvasovk *C. glabrata*.

Med prenosom na bogato gojišče in prenosi med bogatimi gojišči smo preverjali stabilnost integracije rekombinantnega plazmida v genom kvasovke. Homologna rekombinacija je bila ciljana, in sicer v 18S rDNA. Zapis za 18S rDNA je v genomu pomnožen mnogokrat (Magee in sod., 1987), tako da disruptija kakšnega zapisa celici ne škodi. Željen rekombinantni plazmid se je v genom lahko vgradil ne le v eni, ampak v več kopijah, kar lahko poveča možnost delovanja RNAi orodja. V procesu preverjanja stabilnosti integracije je kakšna kolonija izgubila plazmid, ampak večina ga je ohranila stabilnega tekom mnogih generacij. Po prenosu nazaj na selektivno gojišče YNB je prav tako kakšna kolonija propadla zaradi nestabilnosti plazmida. Kolonije, ki so preživele selekcijo med bogatimi in selektivnimi gojišči ter vsebovale željen fragment po kontrolnem PCR, smo smatrali za stabilne transformante in jih shranili v laboratorijski zbirki.

Po ustvarjanju transformiranih sevov z vsem, kar predvidevamo, da je potrebno za delovanje RNAi orodja v *C. glabrata*, pa je potrebno preveriti, ali smo dosegli željen učinek, torej zmanjšanje izražanja tarčnih genov. Ker funkcije izbranih genov v raziskavi še niso karakterizirane, je preverjanje spremenjenega fenotipa v tem primeru oteženo. Naslednji korak je zato za raziskavo reverzna transkripcija s sledečo verižno reakcijo s polimerazo (angl. reverse transcription polymerase chain reaction ali RT-PCR). To je metoda, s katero pomnožimo tarčni odsek, zaznavanje produkta pa temelji na zaznavanju fluorescence, ki narašča z nastankom novih dvovijačnih molekul DNA. Na ta način lahko preverimo nivo izražanja posameznih genov preko prisotne mRNA tarčnega gena, zato je potrebno najprej izolirati skupno RNA in iz nje sintetizirati cDNA, ki jo uporabimo za reakcijo (Erlich in sod., 1991). Kot rezultat RT-PCR pričakujemo signifikantno zmanjšanje koncentracije mRNA tarčnih genov pri vsaj kakšnem od rekombinantnih sevov. Pričakujemo tudi večje utišanje tarčnih genov pri rekombinantnih sevih z lasničnim

konstruktom v primerjavi s protismiselnim, saj je to opazil že Drinnenberg s sod. (2009) pri *S. cerevisiae*, prav tako pa je bilo isto opaženo pri predhodnih testih RNAi orodja v *C. glabrata* v našem laboratoriju s poročevalskima genoma *ADE2* in *URA3* (Ishchuk, 2013; še neobjavljeni rezultati).

Ko bomo odkrili rekombinantne seve, kjer bo RNAi orodje z vstavljenim konstruktom signifikantno zmanjšalo izražanje tarčnega gena, je v načrtu, da se z njimi izvedejo testi preživetja človeških makrofagov in interakcij z ostalimi celicami imunskega sistema v laboratoriju prof. Bernhard-a Hube-a na Hans Knoell Institute v Jeni v Nemčiji. Kasneje pa se seve, ki bodo pokazali zmanjšano virulenco, lahko testira tudi na živalskih modelih v miših ali se z njimi izvede različne fenotipske teste, s katerimi bomo lahko ugotovili virulenčni potencial izbranih genov *C. glabrata* ter funkcije le-teh.

## 6 SKLEPI

Iz rezultatov te raziskave lahko sklepamo naslednje:

- Iz izolirane genomske DNA kvasovke *C. glabrata* smo uspešno pomnožili vse potrebne elemente (promotorji, smiseln in protismiseln deli ter terminatorji) genov, ki smo jih potrebovali za ustvarjanje rekombinantnih plazmidov.
- Ligacija protismiselnih rekombinantnih plazmidov je uspešnejša od ligacije lasničnih rekombinantnih plazmidov, saj sta v prvem primeru v reakciji vključena le en fragment in vektor, v drugem pa vektor ter dva fragmenta.
- Povprečna dolžina novonastalih rekombinantnih plazmidov je 11 459 bp.
- Novonastali rekombinantni sevi vsebujejo *DCR1* in *AGO1* iz *S. castellii* ter stabilno integrirane protismiselne ter lasnične konstrukte, ki so potrebni za delovanje RNAi orodja.
- Novi rekombinantni sevi morajo biti nadaljnjo testirani z qPCR, da ugotovimo, ali RNAi orodje deluje v primeru izbranih genov.

## 7      POVZETEK

*Candida glabrata* je kvasovka, ki je vse do nedavnega bila znana kot relativno nepatogen saprofit normalne človeške mikrobne flore, v zadnjih tridesetih letih pa pogostost kandidoz, povzročenih z *C. glabrata*, narašča. *C. glabrata* je bližnji sorodnik pekovske kvasovke *S. cerevisiae* in oddaljeni sorodnik patogene kvasovke *C. albicans*, prav tako se od njiju razlikuje v tem, da je *C. glabrata* haploidna, tako da znanih dejstev raziskav na omenjenih kvasovkah ne moremo preprosto prenesti na *C. glabrata*. Kljub naraščanju incidence in visoki smrtnosti pa je znanih precej malo genov in mehanizmov, ki so povezani z virulenco te kvasovke. V ta namen je v laboratoriju prof. Piškur Jureta v procesu razvoj RNAi orodje, s katerim bomo lahko dobili vpogled v virulenčni potencial *C. glabrata*. V tej raziskavi smo izbrali sedem genov, katerih funkcije še niso znane, a obstaja velika verjetnost, da so povezni z virulenco. Od njih smo izbrali dva gena, ki sta imela signifikantno povečano izražanje pri sevih, ki so bili odporni na visoke koncentracije flukonazola, ter pet genov iz delecijskih eksperimentov, ki jih v *C. glabrata* niso mogli izbrisati, v *S. cerevisiae* pa ti geni niso esencialni.

Za delajoče RNAi orodje v *S. cerevisiae* sta dovolj encima Dicer (gen *DCR1*) in Argonaut (gen *AGO1*) ter vnos protismiselnih ali lasničnih konstruktov tarčnih genov, kar povzroči post-transkripcijsko utišanje genov. V *C. glabrata* smo v seve z *DCR1* in *AGO1* želeli vnesti protismiselne in lasnične konstrukte izbranih genov in v ta namen smo pomnožili potrebne elemente (promotorji, smiseln in protismiseln deli ter terminatorji) genov, ki smo jih potrebovali za ustvarjanje rekombinantnih plazmidov. Uspešno smo ustvarili vseh sedem protismiselnih konstruktov ter dva lasnična. Kot težje premostljiv korak se je izkazala predvsem ligacija protismiselnih konstruktov. Vseh devet nastalih rekombinantnih plazmidov smo uspešno transformirali v klinični izolat in divji tip *C. glabrata* ter tako ustvarili osemnajst novih rekombinantnih sevov. Ti sevi so pripravljeni za nadaljnje raziskave z RT-PCR, kjer bomo preverili, če je utišanje tarčnih genov z RNAi uspešno.

## 8 VIRI

- Ahmad K. M., Ishchuk O. P., Hellborg L., Jørgensen G., Skvarc M., Stenderup J., Jørck-Ramberg D., Polakova S., Piškur J. 2013. Small chromosomes among Danish *Candida glabrata* isolates originated through different mechanisms. Antonie Van Leeuwenhoek, 104, 1: 111-122
- Allison L. A. 2006. Fundamental molecular biology. New Jersey, Blackwell Publishing: 180-220
- Aslanidis C., Jong P. J. 1990. Ligation-independent cloning of PCR products. Nucleic Acids Research, 18, 20: 6069-6074
- Bio-it World. 2003. RNA interference. Cambridge, Cambridge Healthech Institute: 1 str.  
[http://www.bio-itworld.com/archive/071503/horizons\\_golden.html](http://www.bio-itworld.com/archive/071503/horizons_golden.html) (27. maj 2013)
- Candida* Genome Database. 2012. Bethesda, US National Institutes of Health: database  
<http://www.candidagenome.org> (9. jun. 2013)
- Chang S. S., Zhang Z., Liu Y. 2012. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. Annual Review of Microbiology, 66: 305-323
- Dean D. A., Machado-Aranda D., Blair-Parks K., Yeldandi A. V., Young J. L. 2003. Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. Gene Therapy, 10: 1608–1615
- Drinnenberg I. A., Weinberg D. E., Xie K. T., Mower J. P., Wolfe K. H., Fink G. R., Bartel D. P. 2009. RNAi in budding yeast. Science, 326, 5952: 544-550
- Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., Montigny J., Marck C., Neuveglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J. M., Beyne E., Bleykasten C., Boisrame A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., Daruvar A., Desponts L., Fabre E., Fairhead F., Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J. M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potier S., Richard G. F., Straub M. L., Suleau A., Swennen D., Tekaia F., Wesolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P.,

- Souciet J. L. 2004. Genome evolution in yeast. *Nature*, 430, 6995: 35-44
- Erlich H. A., Gelfand D., Sninsky J. J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252, 5013: 1643-1651
- Fidel P. L., JR., Vazquez J. A., Sobel J. D. 1999. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 1: 80-96
- Gana P. N., Abalaka M. E. 2012. The principle and application of restriction enzyme in genetic engineering. *Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences*, 2, 2: 339-341
- Hannon G. J. 2002. RNA interference. *Nature*, 418, 6894: 244-251
- Heneghan M. N., Costa A. M. S. B., Challen M. P., Mills P. R., Bailey A., Foster G. D. 2007. A comparison of methods for successful triggering of gene silencing in *Coprinus cinereus*. *Molecular Biotechnology*, 35: 283-296
- Henry K. W., Nickels J. T., Edlind T. D. 2000. Upregulation of ERG Genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 10: 2693-2700
- Ishchuk O. 2013. "Competition tests between haploid and diploid *Candida glabrata*." Lund, Lund University (neobjavljeni rezultati)
- Jawhara S., Mogensen E., Maggiotto F., Fradin C., Sarazin A., Dubuquoy L., Maes E., Guérardel Y., Janbon G., Poulain D. 2012. A murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis reveals *Candida glabrata* virulence and contribution of β-mannosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 14: 11313-11324
- Kawai S., Hashimoto W., Murata K. 2010. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Bioengineered Bugs*, 1, 6: 395-403
- Kuchler K. 2013. "Deletion experiment of *Candida glabrata*." Dunaj, Medical University Vienna (neobjavljeni rezultati)
- Lass-Flörl C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, 52: 197-205
- Leung R. K. M., Whittaker P. A. 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 107, 2: 222-239
- Lodge J., Lund P., Minchin S. 2007. Gene cloning. Birmingham, Taylor & Francis Group:

473 str.

- Magee B. B., D'souza T. M., Magee P. T. 1987. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal dna repeat of *Candida* species. *Journal of Bacteriology*, 169, 4: 1639-1643
- Mardh P. A., Rodrigues A. G., Genc M., Novikova N., Martinez-de-Oliveira J., Guaschino S. 2002. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *International Journal of STD & AIDS*, 13: 522-539
- Moazed D. 2009. Rejoice – RNAi for yeast. *Science*, 326, 5952: 533-534
- Nakayama H., Tanabe K., Bard M., Hodgson W., Wu S., Takemori D., Aoyama T., Kumaraswami N. S., Metzler L., Takano Y., Chibana H., Niimi M. 2007. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 1264–1272
- Pfaller M. A., Diekema D. J. 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 10: 4419–4431
- Polakova S., Blume C., Zarate J. A., Mentel M., Jørck-Ramberg D., Stenderup J., Piškur J. 2009. Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 2688–2693
- Roetzer A., Gregori C., Jennings A. M., Quintin J., Ferrandon D., Butler G., Kuchler K., Ammerer G., Schu

- Annual Review of Biochemistry, 66: 751-783
- Seider K., Brunke S., Schild L., Jablonowski N., Wilson D., Majer O., Barz D., Haas A., Kuchler K., Schaller M., Hube B. 2011. The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. Journal of Immunology, 187: 3072-3086
- Sikorski R. S. in Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 122: 19-27
- Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D. W. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiology Reviews, 36: 288-305
- Simmer F., Buscanio A., Kos-Braun I. C., Kagansky A., Boukaba A., Urano T., Kerr A. R. W., Allshire R. C. 2010. Hairpin RNA induces secondary small interfering RNA synthesis and silencing in *trans* in fission yeast. EMBO Journal, 29, 2: 112-118
- Stearns T., Ma H., Botstein D. 1991. Manipulating yeast genome using plasmid vectors. Methods in Enzymology, 185: 280-297
- Vermitsky J. P., Earhart D. K., Smith L. W., Homayouni R., Edlind T. D., Rogers P. D. 2006. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. Molecular Microbiology, 61, 3: 704–722

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Tadeji Matos, dr. med. za sprejetje mentorstva, vso podporo, pomoč ter odlično sodelovanje. Iz srca hvala prof. dr. Juretu Piškurju za vso pomoč, odgovore, nasvete, prijaznost in spodbudo tekom raziskave in življenja v Lundu. Hvala tudi asist. Mihu Skvarču, dr. med. za navdušitev za opravljanje magistrske naloge pri prof. Piškurju v Lundu na Švedskem.

Zahvaljujem se prof. dr. Ines Mandić-Mulec za strokoven pregled magistrskega dela. Hvala tudi prof. dr. Vladimirju Kotniku, dr. med. za hiter odziv in sodelovanje.

Iskreno se zahvaljujem Khadiji M. Ahmad, dr. med. za vse naučeno znanje v laboratoriju, potrežljivost, odgovore na moja neskončna vprašanja ter vsakodnevni optimizem. Hvala tudi dr. Oleni Ishchuk za vso pomoč, trud in naučeno znanje. Hvala odlični ekipi v laboratoriju prof. Piškurja na Lund University za odgovore na moja vprašanja, nova prijateljstva ter odlično preživet čas v in izven laboratorija, še posebaj Citli in Valy. Hvala vsem, ki sem jih spoznala tekom Erazmus izmenjave na Švedskem in so mojo izkušnjo v tujini naredili edinstveno in čudovito, še posebaj hvala Dariyi za vso podporo.

Neskončno sem hvaležna svojim staršem za spodbudo in finančno podporo tekom študija, predvsem pa med izmenjavo na Švedskem, ter vsem ostalim članom družine, ki me podpirajo. Za vse spodbudne besede, klepete, bedarije, smeh in dobro voljo se zahvaljujem svojim prijateljicam, še posebaj Ani Ž., Maruši in Ani H. Še posebaj hvala vsem, ki so me obiskali na Švedskem ali bili z mano v kontaktu in mi pokazali, da razdalja pri prijateljstvu ni pomembna. Neja in Eva hvala za vse nasmejane in vedno zanimive ure preživete na fakulteti in izven njenih sten.

## PRILOGE

Priloga A prikazuje uporabljeni oligonukleotidne začetnike za pomnožitev elementov (promotorji, smiselni in protismiselni deli ter terminatorji) tarčnih genov z reakcijo PCR. Za vsak gen smo za lasnične konstrukte pomnožili vse štiri elemente, za protismiselne pa dva, saj imata oba konstrukta istega gena uporabljen isti terminator.

Priloga A: V raziskavi uporabljeni oligonukleotidni začetniki za pomnožitev promotorjev, smiselnih in protismiselnih delov tarčnih genov ter terminatorjev

Legenda: (For) Levi oligonukleotidni začetnik (Rev) Desni oligonukleotidni začetnik ( $T_m$ ) Temperatura taljenja oligonukleotidnih začetnikov (L) Lasnični konstrukt gena (P) Protismiselni konstrukt gena

Tarčni gen	Oznaka oligonukleotidnega začetnika	Sekvenca oligonukleotidnega začetnika (5'-3')	$T_m$ (°C)	Restriktijsko mesto za encim	Funkcija in velikost PCR produkta
<b>CAGL0A0 0517g</b> (L)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor
	KL2 Rev	GTAGATCACTGTTCTGACATT ATCGAATAGATGTATG	61		943 bp
	KL3 For	CATACATCTATTGATAATGT CAGAACAGTGATCTAC	61		Smiselni del z zanko 418 bp
	KL4 Rev	TGGAGATCTCGGAACCTCTTA CCTTCATTTCC	62	<i>BglII</i>	
	KL5 For	CCCAGATCTGGATAATCTGGA CAATTGTTCAAC	62	<i>BglII</i>	Protismiselni del 348 bp
	KL6 Rev	CTTTGTTTTCATAGGAGCTCA TCAGAACAGTGATCTAC	63		
	KL7 For	GTAGATCACTGTTCTGATGAG CTCCTATGAAAACAAAAG	63		Terminator 300 bp
	KL8 Rev	CCCGCATGCCTAGGAGTTT GTAGTATATG	62	<i>SphI</i>	
<b>CAGL0A0 0517g</b> (P)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor
	KL9 Rev	CAATTGTCAGATTATCCCATT ATCGAATAGATGTATG	61		961 bp
	KL10 For	CATACATCTATTGATAATGG GATAATCTGGACAATTG	61		Smiselni del z zanko 381 bp
	KL6 Rev	CTTTGTTTTCATAGGAGCTCA TCAGAACAGTGATCTAC	63		

(Se nadaljuje...)

Nadaljevanje priloge A: V raziskavi uporabljeni oligonukleotidni začetniki

Tarčni gen	Oznaka oligonukleo-tidnega začetnika	Sekvenca oligonukleotidnega začetnika (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Restriktijsko mesto za encim	Funkcija in velikost PCR produkta
<b>CAGL0F00 495g</b> (L)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor 962 bp
	KL11 Rev	CAACATAAGGCCGTATATGCA TTATCGAATAGATGTATG	62		
	KL12 For	CATACATCTATTGATAATGC ATATACGGCCTTATGTTG	61		Smiselni del z zanko 418 bp
	KL3 Rev	GGGAGATCTCATCATTAAACAT ACAATACCCTTGC	62	<i>BglII</i>	
	KL14 For	TCTAGATCTTTACCAACCGT TATGATGGCAGC	62	<i>BglII</i>	Protismiselni del 348 bp
	KL15 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTC ACATATACGGCCTTATGTTG	64		
	KL16 For	CAACATAAGGCCGTATATGTG AGCTCCTATGAAAACAAAAG	64		Terminator 300 bp
	KL8 Rev	CCCGCATGCCTTAGGAGTTT GTAGTATATG	62	<i>SphI</i>	
<b>CAGL0F00 495g</b> (P)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor 961 bp
	KL17 Rev	CATCATAACGGTTGGTAAACA TTATCGAATAGATGTATG	61		
	KL18 For	CATACATCTATTGATAATGT TTACCAAACCGTTATGATG	61		Smiselni del z zanko 381 bp
	KL5 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTC ATCAGAACAGTGATCTAC	63		
<b>CAGL0M0 5049g</b> (L)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor 962 bp
	KL27 Rev	GAATTGTAAGACCCCAAACCA TTATCGAATAGATGTATG	62		
	KL28 For	CATACATCTATTGATAATGG TTTGGGGTCTTACAATTG	62		Smiselni del z zanko 447 bp
	KL29 Rev	TATAGATCTACCCACCCAAAA CAACACCGTG	61	<i>BglII</i>	
	KL30 For	CGGGAGATCTATCATAAACAT TACCTTCTCAGAC	62	<i>BglII</i>	Protismiselni del 369 bp
	KL31 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTC AGTTGGGGTCTTACAATTG	64		
	KL32 For	GAATTGTAAGACCCCAAACG AGCTCCTATGAAAACAAAAG	64		Terminator 322 bp
	KL8 Rev	CCCGCATGCCTTAGGAGTTT GTAGTATATG	62	<i>SphI</i>	

(Se nadaljuje...)

Nadaljevanje priloge A: V raziskavi uporabljeni oligonukleotidni začetniki

Tarčni gen	Oznaka oligonukleotidnega začetnika	Sekvenca oligonukleotidnega začetnika (5'-3')	$T_m$ (°C)	Restriktionsko mesto za encim	Funkcija in velikost PCR produkta
<b>CAGL0M0 5049g</b> (P)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor
	KL33 Rev	GAAAGGTAATGTTATGATCA TTATCGAATAGATGTATGTAT G	61		962 bp
	KL34 For	CATACATACATCTATTGATA ATGATCATAAACATTACCTTC C	61		Smiselni del z zanko
	KL31 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTC ATCAGAACAGTGATCTAC	63		385 bp
<b>CAGL0M1 1748g</b> (L)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor
	KL35 Rev	GCAAGTCCGAAATCACACATT ATCGAATAGATGTATG	62		960 bp
	KL36 For	CATACATCTATTGATAATGT GTGATTTCGGACTTGC	62		Smiselni del z zanko
	KL37 Rev	TTTAGATCTGATGAGCCAATG CATCTGCTGCG	63	<i>BglII</i>	468 bp
	KL38 For	CATAGATCTCGGCTCGACAGT CTTGAATCTTTC	63	<i>BglII</i>	Protismiselni del
	KL39 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTC ATGTGATTTCGGACTTGC	64		390 bp
	KL40 For	GCAAGTCCGAAATCACATGA GCTCCTATGAAAACAAAAG	64		Terminator
	KL8 Rev	CCCGCATGCCCTAGGAGTTT GTAGTATATG	62	<i>SphI</i>	320 bp
<b>CAGL0M1 1748g</b> (P)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor
	KL41 Rev	GATTCAAGACTGTCGAGCCGC ATTATCGAATAGATGTATG	65		963 bp
	KL42 For	CATACATCTATTGATAATGC GGCTCGACAGTCTGAATC	65		Smiselni del z zanko
	KL39 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTC ATCAGAACAGTGATCTAC	63		381 bp
<b>CAGL0C0 0363g</b> (L)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor
	KL43 Rev	CACAGACTGAACAGGTACATT ATCGAATAGATGTATG	62		960 bp
	KL44 For	CATACATCTATTGATAATGT ACCTGTTCAGTCTGTG	62		Smiselni del z zanko
	KL45 Rev	TGTAGATCTGCCTGGCTGTT GTGGATTGG	63	<i>BglII</i>	466 bp
	KL46 For	CCTAGATCTGTCGAAGCTCTG TGTGTTGTG	63	<i>BglII</i>	Protismiselni del

(Se nadaljuje...)

Nadaljevanje priloge A: V raziskavi uporabljeni oligonukleotidni začetniki

Tarčni gen	Oznaka oligonukleotidnega začetnika	Sekvenca oligonukleotidnega začetnika (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Restriktionsko mesto za encim	Funkcija in velikost PCR produkta
<b>CAGL0C0 0363g</b> (L)	KL47 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTCA TACCTGTTCAAGTCTGTG	64		389 bp
	KL48 For	CACAGACTAACAGGTATGAG CTCCTATGAAAACAAAAG	64		Terminator 320 bp
	KL8 Rev	CCCGCATGCCTTAGGAGTTT GTAGTATATG	62	<i>SphI</i>	
<b>CAGL0C0 0363g</b> (P)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor 963 bp
	KL49 Rev	CAAACACACAGAGCTCGACC ATTATCGAATAGATGTATG	64		
	KL50 For	CATACATCTATTGATAATGG TCGAAGCTCTGTGTGTTT	64		Smiselni del z zanko 381 bp
	KL47 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTCA TACCTGTTCAAGTCTGTG	64		
<b>CAGL0M1 2947g</b> (L)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor 960 bp
	KL51 Rev	GTACCTGTATGCGTAGGCATT ATCGAATAGATGTATG	63		
	KL52 For	CATACATCTATTGATAATGC CTACGCATACAGGTAC	63		Smiselni del z zanko 467 bp
	KL53 Rev	GGGAGATCTATTGGTGCCAA AATTATCAGCC	62	<i>BglII</i>	
	KL54 For	CTCAGATCTGGTCTGGTTTG GAAACTTCTG	63	<i>BglII</i>	Protismiselni del 391 bp
	KL55 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTCA CCTACGCATACAGGTAC	65		
	KL56 For	GTACCTGTATGCGTAGGTGAG CTCCTATGAAAACAAAAG	65		Terminator 320 bp
	KL8 Rev	CCCGCATGCCTTAGGAGTTT GTAGTATATG	62	<i>SphI</i>	
<b>CAGL0M1 2947g</b> (P)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor 960 bp
	KL57 Rev	GTTCACAAACCCAGACCCATT ATCGAATAGATGTATG	63		
	KL58 For	CATACATCTATTGATAATGG GTCTGGTTGGAAAC	63		Smiselni del z zanko 381 bp
	KL55 Rev	CTTTGTTTCATAGGAGCTCA CCTACGCATACAGGTAC	65		
<b>CAGL0L05 434g</b> (L)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	<i>SphI</i>	Promotor 960 bp
	KL59 Rev	GGTACCGTCTTGAAAGCATT ATCGAATAGATGTATG	62		
	KL60 For	CATACATCTATTGATAATGCT TTCAAAGACGGTACC	62		Smiselni del z zanko

(Se nadaljuje...)

Nadaljevanje priloge A: V raziskavi uporabljeni oligonukleotidni začetniki

Tarčni gen	Oznaka oligonukleoti dnega začetnika	Sekvenca oligonukleotidnega začetnika (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Restriktionsko mesto za encim	Funkcija in velikost PCR produkta
<b>CAGL0L0 5434g</b> (L)	KL61 Rev	TTTAGATCTACTGACATAGGC TGGCTAGAGC	62	BglII	466 bp
	KL62 For	TCTAGATCTATAGCGCGACAG ACTTACCTAG	62	BglII	Protismelni del 389 bp
	KL63 Rev	CTTTGTTCATAGGAGCTCA CTTCAAAGACGGTACC	64		
	KL65 For	GGTACCGTCTTGAAAGTGAG CTCCTATGAAAACAAAAG	64		Terminator
	KL8 Rev	CCCGCATGCCTAGGAGTTT GTAGTATATG	62	SphI	320 bp
<b>CAGL0L0 5434g</b> (P)	KL1 For	CACGCATGCCACGATCATGTT TGAAATTGTAG	62	SphI	Promotor
	KL66 Rev	GTAAGTCTGTCGCGCTATCATT ATCGAATAGATGTATG	64		961 bp
	KL67 For	CATACATCTATTCGATAATGA TAGCGCGACAGACTTAC	64		Smiselni del z zanko 381 bp
	KL63 Rev	CTTTGTTCATAGGAGCTCA CCTACGCATACAGGTAC	65		

V prilogi B so prikazane sekvene protismiselnih in lasničnih vključkov, ki smo jih želeli ustvarili v tej raziskavi. Protismiseln vključki vsebujejo promotor *PGK1*, protismiselni del tarčnega gena ter terminator *CYC1*. Lasnični vključki vsebujejo promotor *PGK1*, smiselni del tarčnega gena, zanko, protismiselni del tarčnega gena ter terminator *CYC1*. Vključki, ki smo jih uspeli ustvariti, so bili vstavljeni v vektor z ligacijo.

#### Priloga B: Sekvene protismiselnih in lasničnih vključkov tarčnih genov

##### 1. Sekvena za lasnični vključek gena CAGL0A00517g

CACGATCATGTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTTGTATCGTTGAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGGTCGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTGTATAATAACAAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAGCTTCTGCTTTCTTCTTCCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGTGAGTGGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAAAGCTCTAGGAGAAAGCTCTAGGAGAAAGCCCTAGG  
AGAACGAAAGGGAAAGCCCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCCCAAAGATCGCACCTCCAGTCCATGCCCTCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTGCAATACTTCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAAGCAGAGGGCAATTGGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATACATACATCTATTGATAATGTCAGAAC  
GTGATCTACGACAACATCGTACTGAACCTCCAGCCTCGAGAACAAAGACTA  
CAAGGACCCCAACAACACTACAACCTCCATCGATGACTCACAGCCAAGACGCCTGA  
TCAGAAGAATTACCCAAACTTGCAGAAGAAGAAAACCAGACGACGAGGAAAA  
CCTGCTAGCCCATGCAGCTGAGGGCAGACAGGAACCTACATCGGCTCAAAGA  
CTGAAACAGCACTGCTATCCTGGCCAGAAAGTCCTCGGCTGAAATTGGC  
GCTTGCAATCCTCAGAGGACACCCCTGAAAAACTACCGACCCTGAAACAAT  
TGTCCAGATTATCCCATTGAAAGCTCCAGAAAATGGTCCGCTATTGTGGTAA  
AACTAAATAGCAACAAGGAAAATGAAGGTAAGAAGTTCCGAGATCTGGATAA  
TCTGGACAATTGTTCAACGGTCGGTAGTTTCAGGGTGTCCCTCTGAAGGATT  
GCAAAGGCCAAATTCAAGCCGAAGGACTTCTGGCCAAGGATAGCAGTGCT  
GTTCACTGTTGAGCCGATGTAAGGTTCTGTCTGCCCTCAGCTGCATGGCT  
AGCAGGTTTCTCGTCTGGTTCTCTGCAAAGTTGGGTAATTCTTC  
TGATCAGGCGTCTGGCTGTGAGTCATCGATGGAGTTGAGTTGTTGGGTCCT  
TGTAGTCTTGTCTCGAAGGCTGTGGAGTTCACTGAGTGTGCTAGATCA  
CTGTTCTGATGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAAATCACGCATTAGTC

ATAACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTTTCTCTTCTAAAGGAATAAGAG  
ACTATAACCTCTTATCACAAAATTATCTCAATATTCCATCGGACTACTAAAAA  
CTATCCCCCACCCATATTATTTTGTACTTCATTCTCATGATGATTAGAA  
ATTTCATCTGTTATATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCCTAGGTG  
TGAATACAAAACATGTACATATACTACACACCCCTAGGTG

2. Sekvenca za protismiselni vključek gena CAGL0A00517g

CACGATCATGTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGTATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTGTATCGTTGAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAGCTTCTGCTTCTTCTTCTCCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCCCTAGG  
AGAAGCAAAGGGGAAGCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCAAAAGATCGCACCTCCAGTCCATGCCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTGCAATACTTCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAAGCAGAGGCAATTGGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATACATACATCTATTGATAATGGGATAATC  
TGGACAATTGTTCAACGGTCGGTAGTTTCAGGGTGTCTCTGAAGGATTGC  
AAAGGCCAAATTCAAGCCGAAGGACTTCTGGCCAAGGATAGCAGTGTGT  
TTCAGTCTTGAGCCGATGTAAGGTTCTGTCTGCCCTCAGCTGCATGGCTAG  
CAGGTTTCTCGTCGTCTGGTTCTCTGCAAAGTTGGTAATTCTTCTG  
ATCAGGCGTCTGGCTGTGAGTCATCGATGGAGTTGAGTTGTTGGGGCTTG  
TAGTCTTGTTCTCGAAGGCTGTGGAGTTCACTGATGTTGTCGTAGACT  
GTTCTGATGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAATACCGCATTTCAGTCAT  
AACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTTTCTCTTCTAAAGGAATAAGAGAC  
TATAACCTCTTATCACAAAATTATCTCAATATTCCATCGGACTACTAAAAC  
ATCCCCCACCCATATTATTTTGTACTTCATTCTCATGATGATTAGAAAT  
TTTCAATCTGTTATATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCCTAGGTG  
AATACAAAACATGTACATATACTACACACCCCTAGGTG

3. Sekvenca za lasnični vključek gena CAGL0F00495g

CACGATCATGTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGTATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTGTATCGTTGAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC

ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAAGCTTCTGCTTTCTTCTTCCT  
CGATTTAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAACGCTCTAGGAGAACGCTCTAGGAGAACGCCCTAGG  
AGAAGCAAAGGGGAAGCCCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCCCAAAGATCGCACCTCCAGTCCATCGCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTGCAATACTCCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAACAGAGGCAATTGGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATACATACATCTATTGATAATGCATATACG  
GCCTTATGTTGACGAAATATATGATGCAATTATTGAGTTTTCGATTGAGAA  
CTTACAGGTACAATATTCTGTTATAAATTCTCTATGTTATGCACTAAAAGG  
TGAGTTAAAAGATTATCCCTTAACCTTAAATTATTGTTAGGAGTTCTAGA  
AAAAGATCGTCAGCTGGAAAGAGAAAAACTCAATTAGAGTTCTCAGTCTTG  
TGATATTGACACAAATCTAGAGTTGATGCTCATACTATATTACCATCAATAT  
TAAAACCTACTGAATTTCACCGGCCATCTAGAAAGGCTGCCATCATAACG  
GTTGGTAAACTTCAAAATGTATTAATTATCAGAGATGGCGTCACGAATAGTT  
CACTCATTGGCAAGGGTATTGTATGTTAATGATGAGATCTTACCAACCGTTA  
TGATGGCAGCCTTCTAAGATGGCCGGTAGAAAATTCAAGTAAAGTTAATATT  
GATGGTAATATAGTATGAGCATAACTCTAGATTGTGTCAAATATCACAAA  
AGACTGAAGAACTCTAATTGAGTTCTTCCAGCTGAACGATCTTCTAG  
AACTCCTAACAAATAATTAAAGTTAAAGGGATAAATCTTAAACTCACCTT  
TAGTGCATAACATAGAGAATTATAACAGATAATTGTGACCTGTAAGTTCT  
CAAATCGAAAAAACTCAATAATTGACATCATATTTCGTCAACATAAGGCCGT  
ATATGTGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAAATCACGCTTAAAGGCTAA  
CATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTCTTCTCTAAAGGAATAAGAGACTA  
TAACCTCTTATCACAATATTCTCAATATTCCATCGGACTACTAAAAACTAT  
CCCCCACCCATTATTATTGACTCAATTCTCATGATGATTAGAAATT  
TCAATCTGTTATATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCTAGGTGTGAA  
TACAAAACATGTACATATACTACAAAACCTCTAACG

#### 4. Sekvenca za protismiselni vključek gena CAGL0F00495g

CACGATCATGTTGAAATTGAGTATTCTATTGTTGATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTGTATCGTTGAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGTGGCGTGTGACGACCA  
CAGCCGTGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAAGCTTCTGCTTTCTTCTTCCT  
CGATTTAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAACGCTCTAGGAGAACGCTCTAGGAGAACGCCCTAGG  
AGAAGCAAAGGGGAAGCCCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC

AAAGACAGGAAGCCAAAAGATCGCACCTCCAGTCCATCGCCTCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTCAATACTTCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAAGCAGAGGCAATTGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCATTGGCAAGACGGCATACATACATCTATTGATAATGTTACCAA  
CCGTTATGATGGCAGCCTTCTAAGATGGCCGGTAGAAAATTCAAGTAAAGTTT  
AATATTGATGTAATATAGTATGAGCATACAACACTCTAGATTGTGCAAATATC  
ACAAAAGACTGAAGAACTCTAATTGAGTTCTCTCCAGCTGAACGATCTTT  
TCTAGAACTCCTAACAAATAAATTAAAGTTAAAGGGATAAATCTTTAAACTC  
ACCTTTAGTGCATAACATAGAGAATTATAACAGATAATATTGTGACCTGTA  
AGTTCTCAAATCGAAAAAACTCAATAATTGCATCATATATTGTCACACATAA  
GGCCGTATATGTGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAATCACGCATTAG  
TCATAACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTCTCTCTAAAGGAATAAG  
AGACTATAACCTCTTATCACAAAATTATCTCAATATTCCATCGGACTACTAAA  
AACTATCCCCACCCATATTATTGACTTCAATTCTCATGATGATTAG  
AAATTTCATCTGTTATATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCCTAGG  
TGTGAATACAAAACATGTACATATACTACAAAACCTCAAG

##### 5. Sekvenca za lasnični vključek gena CAGL0M05049g

CACGATCATGTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGTATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTTGTATCGTTGTAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGTGGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAAGCTTCTGCTTTCTTCTTCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGTGGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCCCTAGG  
AGAAGCAAAGGGGAAGCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCAAAAGATCGCACCTCCAGTCCATCGCCTCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTCAATACTTCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAAGCAGAGGCAATTGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCATTGGCAAGACGGCATACATACATCTATTGATAATGGTTGGGG  
TCTTACAATTCTAGATGCAGTTGAGCGTAACCTCTCCGCTCCAATTGATGGTAA  
ACCAGGTTGGTTAGCCATGAGTCAAGGTATTTAATACTATGTACGCAAGAT  
GGGACATGCAAAGTTGTAATGGTGGCTAAGATGGCAAATTTCACCTGGAAAT  
AGTGGCTACAATTAAAAACACTATTCAAATGCATGTCTATTCCAGATCGCT  
GCTAGATTGGTAGGTACACCGTAACACCACTTATTAGATGTTGCAGAAAG  
AGTCTTGATTGGCTGTTGGTGTGGTACATTGTATTGTCTGAGAAAGGTAA  
TGTTATGATGGTCCAAGGTTGAGGATAACTGACTGACATACCGCTATTG

AATGGACTTATAACCACGGTGTGTTGGGTGGTAGATCTATCATAAACATT  
ACCTTCTCAGACAATACAATGTAACCAACACCAACAAGCCAATCAAAGACTC  
TTCTGCAACATCTAAATAAGTGGTGTACCGGTGTACCTACCCAAATCTAGCAG  
CGATCTGGAATAGACATGCATTGAAATAGTGTGTTATAATTGTAGCCACTAT  
TCCAAGTAAAAATTGCCATCTTAGACCACCATTAACACTTGATGTCCCAC  
TTGCGTACATAGTATTAAAGATACTTGACTCATGGCTAACCAACCTGGTTAC  
CATCAATTGGAGCGGAGAAGTTACGCTCAACTGCATCTAGAATTGTAAGACCC  
CAAACGTGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAAATCACGCATTTTAGTCATAA  
CATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTTCTCTAAAGGAATAAGAGACTA  
TAACCTCTTATCACAAAATTATCTCAATATTCCATCGGACTACTAAAAACTAT  
CCCCCACCCATATTATTTTGACTCAATTCTCATGATGATTAGAAATT  
TCAATCTGTTATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCCTAGGTGTGAA  
TACAAAACATGTACATATACTACACAAACTCCTAAG

#### 6. Sekvenca za protismiselni vključek gena CAGL0M05049g

CACGATCATGTTGAAATTGTTAGTATTCTATTGTTGTATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTGTATCGTTGTAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATAACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGTGGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAAGCTTCTGCTTTCTTCTTCTCCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCCCTAGG  
AGAACCAAAGGGGAAGCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCAAAAGATCGCACCTCCAGTCCATCGCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTGCAATACTCCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAGTTGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAGCAGAGGAATTGGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATACATACATCTATTGATAATGATCATAAA  
CATTACCTTCTCAGACAATACAATGTAACCAACACCAACAAGCCAATCAAAG  
ACTCTTCTGCAACATCTAAATAAGTGGTGTACCGGTGTACCTACCCAAATCTA  
GCAGCGATCTGGAATAGACATGCATTGAAATAGTGTGTTATAATTGTAGCC  
ACTATTCCAAGTAAAATTGCCATCTTAGACCACCATACAACTTGATGTC  
CCATCTTGCCTACATAGTATTAAAGATACTTGCAGTCATGGCTAACCAACCTGG  
TTTACCATCAATTGGAGCGGAGAAGTTACGCTCAACTGCATCTAGAATTGTAA  
GACCCCAAACGTGAGCTCTATGAAAACAAAAGGAAAAATCACGCATTTAGT  
CATAACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTTCTCTAAAGGAATAAGA  
GACTATAACCTCTTATCACAAAATTATCTCAATATTCCATCGGACTACTAAAA  
ACTATCCCCACCCATATTATTTTGACTCAATTCTCATGATGATTAGA  
AATTTCATCTGTTATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCCTAGGT  
GTGAATACAAAACATGTACATATACTACACAAACTCCTAAG

7. Sekvenca za lasnični vključek gena CAGL0M11748g

CACGATCATTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTTGTATCGTTGTAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATAACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGTGGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTGTATAATAACAAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAGCTTCTGCTTTCTTCTTCCT  
CGATTAACTGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCCCTAGG  
AGAACAAAGGGGAAGCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCAAAAGATCGCACCTCCAGTCCATCGCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTGCAATACTCCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAGCAGAGGCAATTGGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATAACATACATCTATTGATAATGTGTGATTTC  
GGACTTGCAAGAATCCAGGACCCACAGATGACAGGCTACGTCTCCACAAGATA  
CTACAGAGCCCCGAAATCATGTTAATTGGCAGAAATACGACGTCGAGGTCG  
ACATATGGTCCGCAGGGTGCATCTTGCCGAGATGATAGAAGGTAAACCTTTG  
TTCCAGGTAAAGACCACTGCAACATTCTCCATCATTACTGATCTGTTGGGT  
TCTCCTCCAAGTGATGTCATTGACACCCTGTTCTGAAAACACATTGAAGTTC  
GTCACCTCTTACACATAGAGACCCATTCCATTCTCTGAAAGATTCAAGACT  
GTCGAGCCGGACGCAGTTGACCTACTGGAAAAATGCTGGTATTGATCCAAA  
GAAGAGAATTACCGCAGCAGATGCATTGGCTCATCAGATCTGGCTCGACAGT  
CTTGAATCTTCAGAGAATGGAATAGGGTCTCTATGTGGTAAAGAAGTACGA  
ACTTCAATGTGTTTCAGAACAGATGGTGTCAATGACATCACTGGAGGAGAA  
CCCAACAGATCAGTAATGATGGAGAATTGGGGACGTGGCTTACCTGGAAA  
CAAAGGTTACCTCTATCATCTGGCAAAGATGCACCCCTGGGACCATATGTC  
GACCTCGACGTCGTATTCTGCCAAGTTAACATGATTCGGGGCTCTGTAGTA  
TCTTGAGACGTAGCCTGTCATCTGTGGGCTCTGGATTCTGCAAGTCCGAA  
ATCACATGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAATCACGCATTAGTCATA  
ACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTCTCTTCTAAAGGAATAAGAGACT  
ATAACCTCTTATCACAAAATTATCTCAATATTCCATCGGACTACTAAAAACTA  
TCCCCCACCCATATTATTGGACTTCAATTCTCATGATGATTAGAAATT  
TTCAATCTGTTATATCTATTAGTATATATCTAATACACACCCCTAGGTGTGA  
ATACAAAACATGTACATATACTACAAAACCTCTAAG

8. Sekvenca za protismiseln vključek gena CAGL0M11748g

CACGATCATTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTTGTATCGTTGTAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC

ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGGTCGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTATAATAACAAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACCGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAGCTTCTGCTTTCTTCTTCCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAACGCTTAGGAGAACGCTTAGGAGAACCCCTAGG  
AGAAGCAAAGGGAAAGCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCAAAGATCGCACCTCCAGTCCATGCCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTGCAATACTTCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAACGAGAGCAATTGGTGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATACATACATCTATTGATAATGCGGCTCGA  
CAGTCTGAATCTTCAGAGAACGGAATAGGGTCTCTATGTGGTAAAGAAGTG  
ACGAACCTCAATGTGTTTCAGAACAGATGGTGTCAATGACATCACTGGAGG  
AGAACCCAACAGATCAGTAATGATGGAGAATTGGTGGACGTGGCTTACCTG  
GAAACAAAGGTTACCTCTATCATCTCGGCAAAGATGCACCCCTGCGGACCAT  
ATGTCGACCTCGACGTCGTATTCTGCCAAGTTAACATGATTGCGGGCTCTG  
TAGTATCTTGTGGAGACGTAGCCTGTCATCTGTGGCCTGGATTCTGCAAGT  
CCGAAATCACATGAGCTCTATGAAAACAAAAGGAAAATCACGCATTTTAG  
TCATAACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTCTCTTCTAAAGGAATAAG  
AGACTATAACCTCTTATCACAAAATTCTCAATATTCCATCGGACTACTAAA  
AACTATCCCCACCCATATTATTGACTCAATTCTCATGATGATTAG  
AAATTTCATCTGTTATATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCCTAGG  
TGTGAATACAAAACATGTACATATACTACACAAACTCCTAAG

#### 9. Sekvenca za lasnični vključek gena CAGLC00363g

CACGATCATTTGAAATTGTTAGTATTCTATTGTTGATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTGTATCGTTGAAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGGTCGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTATAATAACAAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACCGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAGCTTCTGCTTTCTTCTTCCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAACGCTTAGGAGAACGCTTAGGAGAACCCCTAGG  
AGAAGCAAAGGGAAAGCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCAAAGATCGCACCTCCAGTCCATGCCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTGCAATACTTCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAGCAGAGGAATTGGTGTAGCGGCATGATT

AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATAACATACATCTATTGATAATGTACCTGTTCA  
AGTCTGTGTTACGGTCCAACACCAAGATCCAGTGTGTACAAGCCGACAC  
CAAGATCACCCCGGATGACCTGGACAAGGACGACGCCGGCACGTACTCTTACA  
AGTCGACATCCAGTCCTCGGTGGATCAGGACAGTCTACGTGCAAGTG  
TTCGCCTGGTCGACGCCAGGGTACACGCTGCACTACACCCAAAGAATCGA  
GCTGACCAACATGGCGGACCAACTACTTCAACTGCTGACCTACACCGACA  
CCATCCAGCCAGTGCCGAGACTTCATCAGAACAGGTACCGACACAAACACA  
CAGAGCTCGACGCAAGCAGTGTCTACAGCTTGCCTACACTGAGCAAACCTT  
GAAGACTAGAGTCGCTCCAATCCAACAAACAGCCAGGCAAGATCTGTCGAAGCT  
CTGTGTGTTGTGCGGTACCTGTTGATGGAAGTCTGCGGCACTGGCTGGAT  
GGTGTGGTGTAGGTAGCAGTCAGCAGTCAGGAAAGTAGTTGGTCCGCCATGTTGGTCA  
GCTCGATTCTGGGTGTAGTGCAGCGTGTAAACCCTGGCGTCGACCCAGGG  
AACACTTGCACGTAGAACTGTCCTGATCCGACCACCGAGGGACTGGATGTCGAA  
CTTGTAAAGAGTACGTGCCGGCGTCGTCCTGTCAGGTACCCGGGTGATCTT  
GGTGTGGGCTTGTACACACACTGGATCTTGGTGTGGGACCGTAACACAGAC  
TGAACAGGTATGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAAATCACGCATTTTAGT  
CATAACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTTCTCTAAAGGAATAAGA  
GACTATAACCTTTACACAAATTTATCTCAATATTCCATCGGACTACTAAAA  
ACTATCCCCACCCATATTATTTGACTTCAATTCTCATGATGATTAGA  
AATTTCATCTGTTATCTATTAAAGTATATATCTAATAACACACCCCTAGGT  
GTGAATACAAAACATGTACATACTACAAAACCTCTAAG

10. Sekvenca za protismiseln vključek gena CAGLC00363g

CACGATCATGTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTTGTATCGTTGTAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGTGGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAAGCTTCTGCTTCTTCTTCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCCCTAGG  
AGAACAAAGGGAGCCCAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCAAAAGATCGCACCTCCAGTCCATGCCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTCAATACTCCAAAGTGGATAATGTGATGCTGAAAAAGTTGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAGCAGAGGGCAATTGGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATAACATACATCTATTGATAATGGTCGAAGC  
TCTGTGTGTTGTGCGGTACCTGTTGATGGAAGTCTGCGGCACTGGCTGGA  
TGGTGTGGTGTAGGTAGCAGTCAGTCAGGAAAGTAGTTGGTCCGCCATGTTGGTCA  
AGCTCGATTCTGGGTGTAGTGCAGCGTGTAAACCCCTGGCGTCGACCCAGGC  
GAACACTTGCACGTAGAACTGTCCTGATCCGACCACCGAGGGACTGGATGTCGA

ACTTGTAAAGAGTACGTGCCGGCGTCGTCCTGTCCAGGTATCCGGGGTATCT  
TGGTGTGGGCTTGTACACACACTGGATCTGGTGTGGGACCGTAACACAGA  
CTGAACAGGTATGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAAATCACGCATTTCAG  
TCATAACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTCTCTCTAAAGGAATAAG  
AGACTATAACCTCTTACACAAAATTATCTCAATATTCCATCGGACTACTAAA  
AACTATCCCCCACCACATTATTCTTGACTCAATTCTCATGATGATTAG  
AAATTTCATCTGTTATATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCCTAGG  
TGTGAATACAAAACATGTACATATACTACAAAACCTCTAAG

11. Sekvenca za lasnični vključek gena CAGL0M12947g

CACGATCATGTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTTGTATCGTTGAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGTGGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAGCTTCTGCTTCTTCTTCTCCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTCGGTGGAGTAGAGAGGGGAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCCCTAGG  
AGAACCAAAGGGGAAGCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCAAAAGATCGCACCTCCAGTCCATGCCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTGCAATACTTCAAAGTGGATAATGTGATGCTGAAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAGCAGAGGCAATTGGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATAACATACATCTATTGATAATGCCTACGCA  
TACAGGTACTATACCACTGGCGCTGAAAGGTGTTAAACTGCCTAGGACAAT  
CTTACTGGGTGAGTCTCTATGGTATTATGAGAAATGTTGGCAAAGATAG  
CCTGGGACAAAGAGTTAAAGAAACTGGATCCTAGCGGTGAATTGAAGCAAAA  
CTACAAAAGTGTCTATAAGACAGTTGATGACGTCTCTTGTCAAGAACAGCA  
CTTCTGTTCAAAGAAATATGGTATGATGAAATTCTGAAATACAGGACGGCA  
CCAAGGTGGCTATGTATTTGAAGGTACTTATCAACACCCGACAGAAAGTT  
TCCAAACCCAGACAGATGGTCAGGATCTCAAAGGTAGCCGAGACATTTC  
CACCGTTTCTCAAAGGCTGATAAATTGGCACCAAATAGATCTGGTCTGGG  
TTTGGAAACTTCTGTCGGGTGTTGATAAGTACCTTCAAACACCCGACAGAAAGTT  
CTTGGTGCCGTCCTGTATTCAAGAATTCTACATACCATATTCTTGAACA  
GAAGTGCTGTTGTCAGCAAGGAGACGTCAACTGTCTTATGAGCACTTTG  
TAGTTTGCTTCAATTCAACCGCTAGGATCCAGTTCTTAACTCTTGTCCCAGG  
CTATCTTGCCTGCAACATTCTCATAATAACCATAGAGACTACACCCAGTAAG  
ATTGTCCTAGGCAGTTAACACCTTCAGCGCACCAGTGGTATAGTACCTGTAT  
GCGTAGGTGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAAATCACGCATTAGTCAT  
AACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTCTCTTCTAAAGGAATAAGAGAC  
TATAACCTTATCACAAAATTATCTCAATATTCCATCGGACTACTAAAAC

ATCCCCCACCCATATTATTTTGTACTCAATTCTCATGATGATTAGAAAT  
TTTCAATCTGTTATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCTAGGTGTG  
AATACAAAACATGTACATATACTACAAAACCTCTAAG

12. Sekvenca za protismiselni vključek gena CAGL0M12947g

CACGATCATGTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGTATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTTGTATCGTTGAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGTGGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCCG  
CCAAGATAACGTGCAAGACGAGAATACCAAGCTTCTGCTTTCTTCTTCTCCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCTCTAGGAGAAGCCCTAGG  
AGAACCAAAGGGGAAGCCCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCCCAAAGATCGCACCTCCAGTCCATGCCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCACTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTGCAATACTTCCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAAGTTGGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAACAGAGGCAATTGGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATACATACATCTATTGATAATGGGTCTGGG  
TTTGGAAACTTCTGTCGGGGTGTGATAAGTACCTTCAAAATACATAGCCAC  
CTTGGTGCCGTCCTGTATTCAAGAATTTCATCATACCATTTCCTTGAACA  
GAAGTGCTGTTGCTGACAAGGAGACGTCAACTGTCTATGAGCACTTTG  
TAGTTTGCTCAATTCAACCGCTAGGATCCAGTTCTTAACCTTGTCCCAGG  
CTATCTTGCCGCAACATTCTCATAATAACCCTAGAGACTACACCCAGTAAG  
ATTGTCCTAGGCAGTTAACACCTTCAGCGCACCAGTGGTATAGTACCTGTAT  
GCGTAGGTGAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAATCACGCATTAGTCAT  
AACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTCTCTAAAGGAATAAGAGAC  
TATAACCTTATCACAAAATTATCTCAATATTCCATGGACTACTAAAAC  
ATCCCCCACCCATATTATTTTGTACTCAATTCTCATGATGATTAGAAAT  
TTTCAATCTGTTATATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCTAGGTGTG  
AATACAAAACATGTACATATACTACAAAACCTCTAAG

13. Sekvenca za lasnični vključek gena CAGL0L05434g

CACGATCATGTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGTATCGTCTGTATCGTAG  
TATCGTCTTGTATCGTTGAATTGTTATATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGTGGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCCG

CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAGCTTCTGCTTTCTTCTTCCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAACGCTTAGGAGAACGCTCTAGGAGAACCCCTAGG  
AGAACGAAAGGGAAAGCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC  
AAAGACAGGAAGCCAAAAGATCGCACCTCCAGTCCATCGCCTCCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTATGGCAGTGTGGCAATGTGAAG  
CAGTGTCAATACTTCAAAGTGGATAATGTGATGCTGCAAAAAGTTGGAC  
CACCAATGCTGTAGAGACAATGGGATACCCTAGCGAACATGAAGAAAAAAAGGA  
AAACGAAAAAAATTGTATATAAACGAGAGCAATTGGTAGCGGCATGATT  
AGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATACATACATCTATTGATAATGCTTCAAA  
GACGGTACCATCCCAGTCTCCAGTCCAAACGTGGACAACGTTGCGCTGT  
CGACTGGTGGCCTGGGTGGCTGGCCTCCGTATGAACCTCGACGGCTCCT  
ACGGCCAGTCTGTTCCGACGGCTTAACTGCTCTATGCTTAAGCCCGGTT  
ACTCCAAGACCCAGTGGCCTCCGAACAACCTCCGACGGTAAAGCCATCGGT  
GGTCTGCTGTGAAGAACGTTACTTGTACCGTACCAACACCAACGCTGACTC  
CCTATGTCAGCAGGACATCCAATCCGCTAACGCCAACACCCCTAGGTAAGT  
CTGTCGCGCTATGTAGAACCGACTACCCGGCTCTGAGAACATGGTCGCTCCA  
ACTGTCGTGGACGCCGGCTCTAGCCAGCCTATGTCAGTAGATCTATAGCGCGA  
CAGACTTACCTAGGGTGTCTGGCGTTAGCGGATTGGATGCTGCTGACATA  
GGGAGTCAGCGTTGGTGTGGTACGGTACAAGTAACCGTTCTACACAGCAGA  
CCACCGATGGCTTACCGTCGGAAGGTTGTCGGAAGGCCACTGGTCTTGGG  
GTAACCGGGCTTACAAGCATAAGAGCAGTATAAGCCGTCGGAACAGGACTGG  
CCGTAGGAGCCGTCGAAGTTCATGACGGAGGCCAGCCACCCAGGCCACCC  
AGTCGACAGCGACAACGTTGCCACGTTGGGACTGGGAGCATGGGATGGTA  
CCGTCTTGAAAGTGAAGCTCCTATGAAAACAAAAGGAAAATCACGCATTTT  
AGTCATAACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATTCTCTTCTAAAGGAATA  
AGAGACTATAACCTCTTATCACAAAATTATCTCAATATTCCATCGGACTACTA  
AAAACATCCCCACCCATATTATTGACTTCATTCTCATGATGATT  
AGAAATTTCATCTGTTATCTATTAAAGTATATATCTAATACACACCCCTA  
GGTGTGAATACAAAACATGTACATATACTACAAAACCTCTAAG

14. Sekvenca za protismiseln vključek gena CAGL0L05434g

CACGATCATGTTGAAATTGTAGTATTCTATTGTTGTATCGTCTTGTATCGTAG  
TATCGTCTTGTATCGTTGAAATTGTTATCGTACTCTGACAGTTCAAACCCAC  
CAGCTAATAATATATTACAAGCGCCGATAAGGGTAGTAAAGAGGGACAGA  
GAGGGGAGGGTAGGGGGTGCAGAGAAAATTAGACGGTTAGCCATCATACGC  
ATATACGAATATTATAGTATTACTTACACGGCTGGTCGTCGTGACGACCA  
CAGCCGTGTATAATAACAAAAGCAGTTAACAAATAATAGCAAACGGTACAC  
ATGTGACTACCACGTATTGTATGCTTACGGGTGACAAGAAAAGGAAACCCCG  
CCAAGATACTGCAAGACGAGAATACCAGCTTCTGCTTTCTTCTTCCT  
CGATTAAATGGCTGGGGGGAACTGTGAGATTACCATGACACCCGTGCACCCC  
CGGACTCCACTAGGGGAAGCATCCAGGTGGGTGGAGTGAGAGGGGGAAATC  
GGGCAACTGCTCTAGGAGAACGCTTAGGAGAACGCTCTAGGAGAACCCCTAGG  
AGAACGAAAGGGAAAGCCAAAGAGGGACAAGCGCAGGCCACTACAGTAAC

AAAGACAGGAAGCCAAAAGATCGCACCTCCAGTCCATCGCCTCCCCATT  
GTCATATGGCAGTTATAGCAGTGTGGCAGTAT  
GGCAGTGTGGCAATGTGAAGCAGTGTCAATACTTCAAAGTGGATAATGTGA  
TGCTTGCAAAAAGTTGGGACCACCAATGCTAGAGACAAATGGATACCCCTAG  
CGAATGAAGAAAAAGGAAAACGAAAAAAATTGTATATAAGCAGAGGCA  
ATTTTGATAGCGGCATGATTAGTTGTCAATTGGCAAGACGGCATAACATACATCT  
ATTCGATAATGATAGCGCAGACTTACCTAGGGTGTCTGGCGTTAGCGG  
ATTGGATGTCTGCTGACATAGGGAGTCAGCGTTGGTGTGGTACGGTACAAG  
TAACCGTTCTTACACAGCAGACCACCGATGGCTTACCGTCGGAAGGTTGTC  
GGAAGGCCACTGGGTCTTGGAGTAACCGGGCTTACAAGCATAAGAGCAGTAT  
AAGCCGTCGGAACAGGACTGCCGTAGGAGCCGTCGAAGTCATGACGGAGG  
CCCAGCCACCCAGGCCACCCAGTCGACAGCGACAACGTTGTCCACGTTGGG  
AACTGGGAGCATGGGATGGTACCGTCTTGAAAGTGAGCTCCTATGAAAACAA  
AAGGAAAAATCACGCATTTAGTCATAACATCCCTCAGTAAGGGCTATTATT  
TTTTCTCTTCTAAAGGAATAAGAGACTATAACCTCTTATCACAAAATTATCT  
CAATATTCCATCGGACTACTAAAAACTATCCCCCACCATATTATTTTTGA  
CTTCAATTCTCATGATGATTAGAAATTTCAATCTGTATATCTATTAAAGTAT  
ATATATCTAACACACCCCTAGGTGTGAATACAAAACATGTACATATACT  
ACAAAACCTCTAAG