

Povezanost razine ekspresije egzoribonukleaze Rrp6 sa staničnim odgovorom na antitumorski lijek 5-fluorouracil

Oskomić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:119309>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Marina Oskomić

**POVEZANOST RAZINE
EKSPRESIJE
EGZORIBONUKLEASE Rrp6 SA
STANIČNIM ODGOVOROM NA
ANTITUMORSKI LIJEK 5-
FLUOROURACIL**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Igora Stuparevića, te uz pomoć Ane Novačić, mag. ing.

Rad je napravljen u sklopu projekta *In silico i in vivo analiza transkriptoma stanične stijenke kvasca Saccharomyces cerevisiae i primjena dobivenih rezultata u konstrukciji novih biotehnoloških sojeva*, UIP-2017-05-4411, Hrvatske zaklade za znanost, voditelja izv. prof. dr. sc. Igora Stuparevića

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Igoru Stupareviću koji mi je pod njegovim mentorstvom pružio priliku za izradu diplomskog rada u Laboratoriju za biokemiju.

Posebne zahvale Ani Novačić, mag. ing., što mi je dala izniman uvid u znanstveno-istraživački rad te pomogla u svladavanju svih koraka tijekom ovog istraživanja.

Hvala svim djelatnicima Laboratorija za biokemiju.

Hvala Luciji, Franu, Karli, Ani, Petri i mojoj obitelji na svojoj podršci tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

POVEZANOST RAZINE EKSPRESIJE EGZORIBONUKLEAZE Rrp6 SA STANIČNIM ODGOVOROM NA ANTITUMORSKI LIJEK 5-FLUOROURACIL

Marina Oskomić, univ. bacc.ing. biotechn.
0058211879

Sažetak: Egzoribonukleaza Rrp6 je katalitička podjedinica RNA egzosoma, kompleksa koji sudjeluje u kontroli kvalitete RNA molekula u svim eukariotskim stanicama. U ovom radu je praćen odgovor stanica dva evolucijski udaljena kvasca, *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, na tretman anti-tumorskim lijekom 5-fluorouracilom (5-FU), koji ometa stanične procese vezane uz RNA i DNA. Rezultati rada pokazuju kako tretman 5-FU utječe na razinu proteina Rrp6 pri fiziološkoj i povišenoj temperaturi te kako se promjena razine proteina Rrp6 u stanicama kvasca, postignuta delecijom ili prekomjernom ekspresijom odgovarajućeg gena, odražava na osjetljivost stanica na tretman s 5-FU. Osim Rrp6, u ovom radu pokazana je uključenost druge katalitičke podjedinice, Dis3 i kofaktora RNA egzosoma (Rrp47 i proteina TRAMP kompleksa) u otpornosti stanica na tretman s 5-FU. Zbog visoke evolucijske očuvanosti RNA egzosoma, dobiveni rezultati imaju implikacije za stanice viših eukariota te daju doprinos razjašnjavanju mehanizama otpornosti tumorskih stanica na tretman s 5-FU.

Ključne riječi: Rrp6, RNA egzosom, 5-FU, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*

Rad sadrži: 72 stranice, 21 slika, 9 tablica, 192 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević

Pomoć pri izradi: Ana Novačić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Bojan Žunar (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević (mentor)
3. dr. sc. Marta Popović, znan. sur., IRB (članica)
4. prof. dr. sc. Renata Teparić (zamjenska članica)

Datum obrane: 22. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

THE ASSOCIATION BETWEEN EXORIBONUCLEASE Rrp6 EXPRESSION LEVEL AND THE
CELLULAR RESPONSE TO THE ANTI-CANCER DRUG 5-FLUOROURACIL

Marina Oskomić, univ. bacc.ing. biotechn.
0058211879

Abstract: Rrp6 is the exoribonuclease catalytic subunit of the RNA exosome, a complex which participates in quality control of RNA molecules in all eukaryotic cells. This work monitored the cellular response of two evolutionarily distant yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, to treatment with the anti-cancer drug 5-fluorouracil (5-FU), which interferes with RNA- and DNA-related processes. The results show that 5-FU treatment affects the Rrp6 protein level at physiological and elevated temperatures. The change of Rrp6 level in yeast cells, achieved by gene deletion or overexpression of the corresponding gene, influences cellular sensitivity to 5-FU treatment. In addition to Rrp6, the involvement of the second RNA exosome catalytic subunit, Dis3 and its cofactors (Rrp47 and TRAMP complex) in resistance to 5-FU was also demonstrated. Due to the high evolutionary conservation of the RNA exosome complex, these results have implications for higher eukaryotes and contribute to clarifying the mechanisms of cancer cell resistance to 5-FU.

Keywords: Rrp6, RNA exosome, 5-FU, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*

Thesis contains: 72 pages, 21 figures, 9 tables, 192 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Igor Stuparević, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Ana, Novačić, mag. ing.

Reviewers:

1. Bojan Žunar, PhD, Assistant professor (president)
2. Igor Stuparević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Marta Popović, PhD, Research Associate, IRB (member)
4. Renata Teparić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 22nd, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MODELNI ORGANIZMI U MOLEKULARNO-BIOLOŠKIM ISTRAŽIVANJIMA	2
2.1.1. KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1.2. KVASAC <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4
2.2. EUKARIOTSKI RNA EGZOSOM.....	6
2.2.1. Katalitička podjedinica RNA egzosoma Rrp6.....	10
2.2.3. TRAMP kompleks	13
2.3. 5-FLUOROURACIL	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Kemikalije i enzimi	17
3.1.2. Otopine i puferi.....	17
3.1.3. Hranjive podloge	19
3.1.4. Sojevi kvasca	20
3.1.5. Primarna i sekundarna antitijela	22
3.2. METODE.....	22
3.2.1. Test rasta („plate assay“).....	22
3.2.2. Mjerenje rasta stanica kvasca	23
3.2.3. Izolacija ukupne RNA i sinteza cDNA za RT-qPCR	23
3.2.4. Određivanje koncentracije RNA	24
3.2.5. Agarozna RNA elektroforeza	25
3.2.6. <i>Reverse transcription quantitative PCR</i> (RT-qPCR)	25
3.2.7. Izolacija ukupnih proteina iz stanica kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
3.2.8. Kvantifikacija ukupnih proteina	27
3.2.9. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza	28
3.2.10. Western blot analiza	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. POVEZANOST DJELOVANJA ANTITUMORSKOG LIJEKA 5-FLUOROURACILA I RAZINE EKSPRESIJE EGZORIBONUKLEASE Rrp6 U KVASCU <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4.1.1. Stanice mutanata za katalitičke podjedinice i kofaktore RNA egzosoma pokazuju osjetljivost na tretman 5-fluorouracilom	31
4.1.2. Tretman 5-fluorouracilom utječe na razinu ekspresije proteina Rrp6	38
4.1.3. Prekomjerna ekspresija Rrp6 negativno utječe na rast stanica prilikom tretmana 5-FU pri povišenoj temperaturi.....	44
4.2. POVEZANOST DJELOVANJA ANTITUMORSKOG LIJEKA 5-FLUOROURACILA I RAZINE EKSPRESIJE EGZORIBONUKLEASE Rrp6 U KVASCU <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	47

4.2.1. Stanice mutanata katalitičkih podjedinica RNA egzosoma pokazuju osjetljivost na tretman 5-fluorouracilom.....	47
4.2.2. Tretman 5-fluorouracilom utječe na ekspresiju proteina Rrp6.....	50
5. ZAKLJUČCI.....	56
6. LITERATURA.....	57

1. UVOD

RNA egzom je proteinski kompleks ključan za razgradnju, kontrolu kvalitete i sazrijevanje RNA molekula u eukariota. Egzoribonukleaza Rrp6 jedna je od dvije katalitičke podjedinice RNA egzoma zaslužna za distributivno procesiranje i razgradnju različitih vrsta RNA supstrata (Wasmuth i Lima, 2017). Kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* jednostanični su organizmi iz carstva Fungi te se koriste kao modelni organizmi u laboratorijskim istraživanjima koja su usredotočena na RNA egzom. Izuzev proučavanja RNA egzoma, spomenuti kvasci izvrsni su modelni organizmi za određivanje ciljanih puteva i mehanizama djelovanja lijekova, poput antiproliferativnog spoja 5-fluorouracila (5-FU). Antimetabolit 5-FU dugo je u upotrebi kao kemoterapeutski lijek koji se koristi za liječenje različitih vrsta tumora (Longley i sur., 2003). Lijek je izvorno razvijen kako bi ometao metabolizam DNA, no poznato je da 5-FU remeti i metabolizam RNA (Parker i Chi Cheng, 1990). Međutim, tumorske stanice mogu postati rezistentne na 5-FU, što može biti glavna prepreka terapijama temeljenim na 5-FU, pogotovo jer molekularni mehanizmi koji leže u osnovi takve rezistencije ostaju nedovoljno poznati. Važno je napomenuti da je citotoksičnost 5-FU u *S. cerevisiae* uglavnom uzrokovana narušenim procesiranjem RNA (Hoskins i Butler, 2007). Predloženi učinci 5-FU na RNA uključuju inhibiciju *splicinga* i poliadenilacije mRNA, posttranskripcijskih modifikacija tRNA te procesiranja snRNA i rRNA (Fang i sur., 2004; Lenz i sur., 1994; Johnson i sur., 1980). Prethodna istraživanja pokazala su da smanjenje razine katalitičke podjedinice RNA egzoma Rrp6/EXOSC10 dovodi do izražene osjetljivosti na 5-FU u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* i ljudskim stanicama (Kammler i sur., 2008; Fang i sur., 2004). Dosadašnje analize učinka 5-FU na Rrp6 upućuju da djelovanje 5-FU narušava aktivnost egzoribonukleaze Rrp6 *in vitro* (Silverstein i sur., 2011). Usprkos dosadašnjim saznanjima, molekularni mehanizam kojim 5-FU utječe na funkciju Rrp6 *in vivo* ostaje nepoznanica.

Cilj ovog rada bio je steći bolji uvid u povezanost djelovanja antitumorskog lijeka 5-fluorouracila i razine ekspresije egzoribonukleaze Rrp6 u kvascima *S. cerevisiae* i *S. pombe*. U sklopu rada, ispitana je uključenost druge katalitičke podjedinice i kofaktora RNA egzoma u stanični odgovor na 5-FU te je dobiven uvid u razinu ekspresije Rrp6 prilikom tretmana 5-FU u stanicama divljih tipova kvasaca. Također, ispitan je utjecaj prekomjerne ekspresije proteina Rrp6 na rast stanica u prisutnosti 5-FU.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MODELNI ORGANIZMI U MOLEKULARNO-BIOLOŠKIM ISTRAŽIVANJIMA

Napredak u području eksperimentalnih bioloških znanosti omogućen je istraživanjima na različitim razinama, od kontroliranih *in vitro* sustava koji oponašaju karakteristike biološkog materijala izvan prirodnog okruženja, do *in vivo* sustava modelnih organizama (Matthews, 2020). Modelni organizmi su neljudske vrste koje istraživači koriste za proučavanje specifičnih bioloških procesa. Oni pružaju vrijedan uvid u biološke sustave na razini stanica, tkiva, organa i organskih sustava (Dietrich i sur., 2019). Modelni organizmi obično se biraju zbog njihovog jednostavnog i jeftinog uzgoja te razmnožavanja u laboratorijskom okruženju. Kratka generacijska vremena i mogućnost relativno jednostavne konstrukcije mutanata za proučavanje određenih fenotipskih karakteristika ili bolesti, također su neke od brojnih prednosti korištenja modelnih organizama. Samo nekoliko vrsta omogućilo je mnoga od glavnih bioloških otkrića 20. stoljeća: bakterija *Escherichia coli*, kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, nematoda *Caenorhabditis elegans*, mušica *Drosophila melanogaster*, riba *Danio rerio*, žaba *Xenopus laevis* te miš *Mus musculus*. Istraživanja s navedenim vrstama dala su doprinos razumijevanju ciklusa stanične diobe, embrionalnog razvoja, biološkog starenja i metabolizma na molekularnoj razini (Matthews i Vosshall, 2020; Nurse, 2017). Navedeni organizmi omogućuju modeliranje složenih bioloških procesa relevantnih za ljudsko zdravlje, čime se također produbljuje znanje o temeljnim biološkim principima. Vinska mušica i zebica (Fielden i sur., 2018; Vosshall, 2007; Friedman, 1998), zajedno s mišjim modelima uvelike se koriste u biomedicinskim istraživanjima za proučavanje patofiziologije bolesti u svrhu razvoja potencijalnih novih lijekova (Rydell-Törmänen i Johnson, 2019). Stoga, modelni organizmi nužni su za sveobuhvatno razumijevanje biologije na svim razinama.

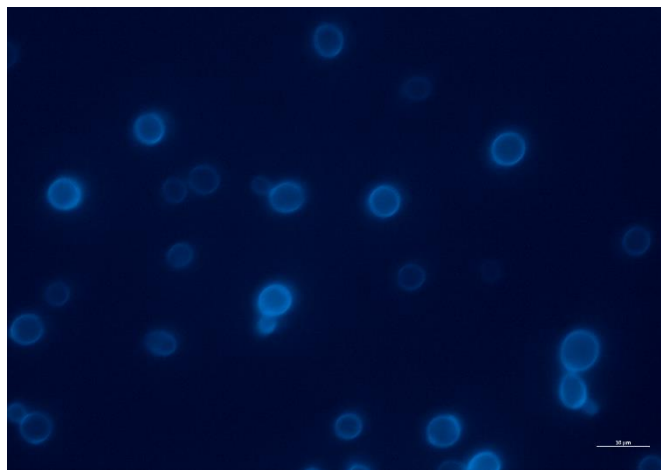
2.1.1. KVASAC *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae eukariotski je organizam te pripada skupini jednostaničnih gljiva iz razreda *Ascomycetes*. Sadrži membranom-obavijene organele, kao što su jezgra, endoplazmatski retikulum i mitohondriji. *S. cerevisiae* raste u obliku pojedinačnih ovalnih stanica (slika 1), čija veličina ovisi o ploiditetu. Optimalni uvjeti za rast kvasca su temperatura od 28 do 30 °C te pH u rasponu od 3,5 do 5. *S. cerevisiae* je fakultativni anaerob koji može jednako dobro rasti aerobno i anaerobno u prisutnosti glukoze, pri čemu tijekom anaerobne respiracije razgrađuje glukozu do etanola i ugljikovog dioksida (Flores i sur., 2000). Projekt sekvenciranja genoma *S. cerevisiae* završen je 1996. godine. To je ujedno i prvi potpunosti sekvenciran genom nekog eukariotskog organizma

(Goffeau i sur., 1996). U tipičnoj haploidnoj stanici kvasca, oko 12 Mb genomske DNA postoji u obliku 16 kromosoma, za koje se smatra da im je struktura formirana procesom duplikacije cijelog genoma (engl. *Whole Genome Duplication*, *WGD*). Prije otprilike 100 milijuna godina, endoreduplikacijom genoma diploida ili fuzijom dviju stanica kvasca nastao je tetraploidni kvasac. Ovaj predak izgubio je oko 85 % dupliciranih kopija, ostavivši sadašnju vrstu s oko 6000 gena (Kellis i sur., 2004). Osim genomske DNA, stanice *S. cerevisiae* sadrže 2 μ plazmidnu DNA te mitohondrijsku DNA (Sherman, 2002). Gustoća genoma kvasca prilično je visoka (prosječno jedan gen na 2 kb), čak 50 puta veća od gustoće gena u ljudskom genomu. Visoka gustoća genoma djelomično se objašnjava relativno malim brojem gena koji sadrže introne (oko 4 %) (Spingola i sur., 1999; Goffeau i sur., 1996). Također, u kvascu postoji vrlo efikasan mehanizam homologne integracije transformirajuće DNA (Orr-Weaver i sur., 1981; Hinnen i sur., 1978), za razliku od većine ostalih eukariota kod kojih je prvenstveno aktivna ilegitalna rekombinacija. Zbog toga je eksperimente na razini genoma puno jednostavnije izvesti s kvascem, nego s višim eukariotima. U laboratorijskim uvjetima stabilno se aseksualno razmnožava pupanjem kao haploid ili diploid, pri čemu iz stanice majke nastaju dvije stanice kćeri. Stanice *S. cerevisiae* u prirodi podložne su parenju: haploidne a stanice se pare s haploidnim α stanicama i tvore diploide – a/α stanice. Tip parenja određen je sekvencom u lokusu *MAT*, koji se nalazi na 3. kromosomu. U određenim uvjetima, diploidi se mogu usmjeriti za mejotičku diobu, tvoreći četiri haploidne spore, po dvije od svakog tipa parenja (Herskowitz, 1988).

Kvasac ima jednostavne nutritivne zahtjeve, kratko generacijsko vrijeme i lako se uzgaja u laboratorijskim uvjetima. Kao modelni organizam omogućio donošenje zaključaka o ulogama te međusobnim interakcijama pojedinih gena i proteina eukariota. Zbog visokog stupnja evolucijske očuvanosti, stanični procesi koje je jednostavno analizirati u kvascu mogu dati saznanja o onima u ljudskim stanicama (Pâques i Haber, 1999). Istraživanja na kvascu prvenstveno su donijela nove spoznaje o apoptozi, replikacijskom stresu, autofagiji, starenju te o funkcijama mitohondrija. Gotovo 1000 gena kvasca pripadaju ortolozima gena povezanih s ljudskim bolestima (Heinicke i sur., 2007). Obzirom na važnost istraživanja sinteze i agregacije proteina u kontekstu ljudskih bolesti, kao što su Huntingtonova ili Alzheimerova bolest, očuvanost osnovnih staničnih procesa omogućuje korištenje kvasca i u biomedicinskim istraživanjima neurodegenerativnih poremećaja (Tuite, 2019). Proučavanjem kromosomskih rearanžmana koji se događaju uslijed selektivnih pritiska u kvascu, primijećeno je da su prerasporedi genetičkog materijala vrlo slični onima uočenim u ljudskim tumorskim stanicama (Aguilera i García-Muse, 2013). Stoga, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi adaptivne evolucije kvasca u laboratoriju djelomično nalikuju onima koji su prisutni tijekom progresije tumora (Ferea i sur., 1999). Osim u znanstvenim istraživanjima, *S. cerevisiae* ima važnu ulogu u biotehnološkoj proizvodnji. Koristi se za proizvodnju lijekova,

finih kemikalija i biogoriva (Baghban i sur., 2019). Kvasac ima niz prednosti u procesima koji zahtijevaju proizvodnju u velikim razmjerima, kao što su primjerice niska cijena medija za uzgoj kulture i povijest učinkovite tehnologije fermentacije.



Slika 1. Morfologija stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* vizualizirana fluorescentnim mikroskopom nakon bojanja bojom Calcofluor-white (vlastita fotografija).

2.1.2. KVASAC *Schizosaccharomyces pombe*

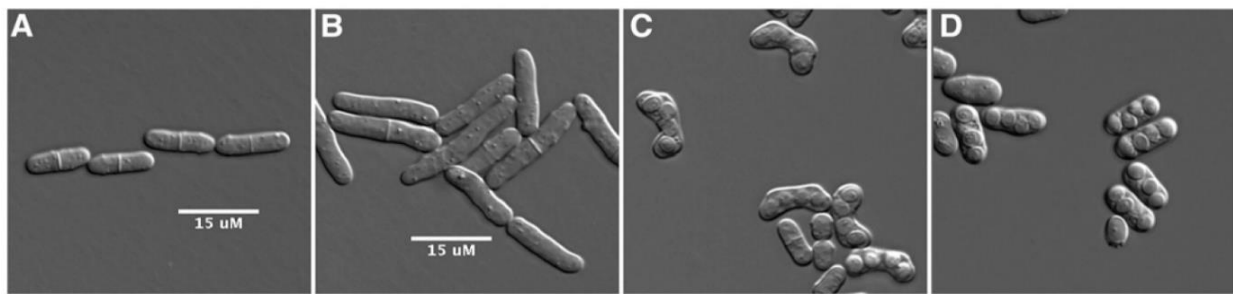
Schizosaccharomyces pombe, poznat kao „fisijski kvasac“, askomicetni je kvasac koji se koristi u tradicionalnom pivarstvu i kao modelni organizam u molekularnoj i staničnoj biologiji. Naziv *pombe* na svahili jeziku znači „pivo“ (ili barem fermentirano piće nalik pivu). To je jednostanični eukariot, čije su stanice cilindričnog oblika, promjera 3 do 4 μm i duljine 7 do 14 μm . Ovaj jednostanični eukariot je nepatogen, lako se uzgaja i jednostavno se laboratorijski manipulira (Wixon, 2002). Oba kvasca *Schizosaccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae* često su korišteni kao modelni organizmi, iako su se ove dvije vrste evolucijski razile prije otprilike 300 do 600 milijuna godina. To čini evolucijsku udaljenost između *S. pombe* i *S. cerevisiae* istog reda kao i udaljenost između ovih kvasaca i sisavaca (Heckman i sur., 2001; Sipiczki, 2000). Glavnina istraživačkog rada sa *S. pombe* uvelike je poboljšala razumijevanje eukariotskog staničnog ciklusa (Nurse, 2000) i njegove regulacije (Moser i Russell, 2000), što je pridonijelo shvaćanju mnogih povezanih procesa, kao što su formiranje mikrotubula (Johnson Sagolla i sur., 2003), mejotička diferencijacija (Mata i sur., 2007), stanična morfogeneza (Brunner i Nurse, 2000), mehanizmi odgovora na stres (Toone i sur., 1998) te odgovor na oštećenja DNA (Zhou i Elledge, 2000). Povijesno značajan rezultat u istraživanju staničnog ciklusa bilo je kloniranje *cdc2+* gena za ciklin-ovisnu kinazu (Beach i sur., 1982) i demonstracija da ljudski homolog može komplementirati nativnu funkciju u temperaturno-osjetljivom *cdc2* mutantu (Lee i

Nurse, 1987). Posljedično, *S. pombe* nastavlja biti ključni modelni organizam za proučavanje replikacije DNA, pri čemu su u fokusu *cdc* geni, koji su uključeni u različite aspekte replikacije DNA (Mojardín i sur., 2013).

Genom *S. pombe* u potpunosti je sekvenciran 2002. godine, čime je postao šesti u potpunosti sekvenciran eukariotski genom (Wood i sur., 2002). Bez obzira na mali broj protein-kodirajućih gena (5054), fisijski kvasac ima velik broj proteina (trenutno 338 identificiranih) koji su evolucijski očuvani u kralježnjacima. Genom *Schizosaccharomyces pombe* često se koristi za proučavanje stanične diobe i rasta zbog očuvanih genomskih regija koje se nalaze i kod ljudi, uključujući: heterokromatinske regije, velika ishodišta replikacije, velike centromere, očuvane stanične kontrolne točke, telomere te mnoge druge (Sabatinos i sur., 2013; Hayano i sur., 2012). Procjenjuje se da genom *S. pombe* sadrži oko 14 Mb DNA. Obzirom da fisijski kvasac nema toliko dupliciranih gena u usporedbi s pupajućim kvascem, cjelokupna DNA nalazi se u sklopu 3 različita kromosoma (Wood i sur., 2002). Fisijski kvasac ima velike modularne centromere, koje više podsjećaju na centromere razvijenijih organizama nego na tzv. točkaste centromere u *S. cerevisiae*, od kojih su 100-300 puta duže. Evolucijska očuvanost značajki centromera, uključujući veličinu, strukturu i organizaciju, čini fisijski kvasac modelom za proučavanje funkcija centromera i remodeliranja eukariotskog heterokromatina. Osim toga, velike heterokromatizirane centromere *S. pombe* predmet su istraživanja mehanizma transkripcijskog utišavanja (Allshire i sur., 1994). Proučavanje centromernog heterokromatina *S. pombe* dovelo je do uspostave hipoteze „histonskog koda“, bazirane na specifičnim posttranslacijskim modifikacijama histona (Jenuwein i Allis, 2001). Unatoč sličnom broju gena, *S. cerevisiae* ima samo oko 250 introna, dok *S. pombe* ima gotovo 5000. Veliki broj introna kvasca *S. pombe* daje mogućnost za povećanje broja proteina nastalih alternativnim *splicingom* pripadajuće mRNA (Wood i sur., 2002). Za razliku od *S. cerevisiae*, *S. pombe* kroz evoluciju zadržao je tri gena čiji proteinski produkti sudjeluju u putu RNA interferencije (engl. *RNA interference*, *RNAi*), uključujući Dicer (*Dcr1*), RNA-ovisnu RNA polimerazu (*RdRP*; *Rdp1*) i Argonaute (*Ago1*) (Volpe i sur., 2002).

Kada haploidne stanice dosegnu oko 14 μ m duljine, ulaze u mitozu, pri čemu se, kao i kod većine gljiva, nuklearna ovojnica ne razgrađuje, a jezgra se nalazi blizu centra stanice. Nakon mitoze dolazi do binarne diobe (slika 2A) formiranjem septuma, koji se cijepa kako bi se razdvojile dvije stanice kćeri. Jedna specifična značajka ciklusa *S. pombe* jest dulja G2 faza staničnog ciklusa (posljedica tog je stroga kontrola prijelaza G2-M), za razliku od *S. cerevisiae* kojem je G1 najdulja faza staničnog ciklusa (G1-S prijelaz je strogo kontroliran). Diploidne stanice *S. pombe* primjetno su šire od haploidnih stanica i ulaze u citokinezu kada dosegnu duljinu od otprilike 24 μ m (slika 2B). Kontrola mitoze fisijskog kvasca odvija se putem mehanizama koji su slični onima višestaničnih organizama. Osim vegetativnog rasta, *S. pombe* ima seksualni ciklus. Dvije

haploidne stanice odgovarajućeg tipa parenja u nedostatku hranjivih tvari podliježu parenju (konjugaciji) (Egel, 1994; Egel i Egel-Mitani, 1974). Uslijed fuzije stanica formira se diploidna zigota, koja ulazi u mejozu i stvara četiri haploidne spore. Zigotni askusi obično imaju savijen oblik (slika 2C), a azigotni askusi koji potječu od vegetativnih diploidnih stanica kratki su i linearni (slika 2D). Kada se okolišni uvjeti poboljšaju, spore klijaju, čime nastaju proliferirajuće haploidne stanice (Morgan i Veal, 2007). Sojevi divljeg tipa *S. pombe* homotaličnog su tipa parenja koji se naziva h^{90} . Tip parenja određen je informacijom kodiranom na lokusu *mat1*. Svaki alel lokusa *mat1* kodira za dva divergentno transkribirana regulatorna proteina čija je ekspresija inducirana nedostatkom nutrijenata, prvenstveno dušika (Kelly i sur., 1988). Stanice fizijskog kvasca mijenjaju tip parenja izmjenom genetske informacije na transkripcijski aktivnom lokusu *mat1* sa sekvencama iz jednog od dva kriptična (transkripcijski utišana) lokusa, *mat2-P* ili *mat3-M*. Stanice *S. pombe* zahtijevaju uvjete bez hranjivih tvari da bi se parile, ali gotovo sve diploidne zigote odmah sporuliraju.



Slika 2. Stanice i askusi *S. pombe*. Haploidna stanica koja sadrži fizijsku ploču (A). Diploidne stanice (B). Zigotni askusi nastali parenjem dviju haploidnih stanica (C). Azigotni askusi nastali mejozom diploidnih stanica (D). Slike prilagođene prema (Hoffman i sur., 2015).

2.2. EUKARIOTSKI RNA EGZOSOM

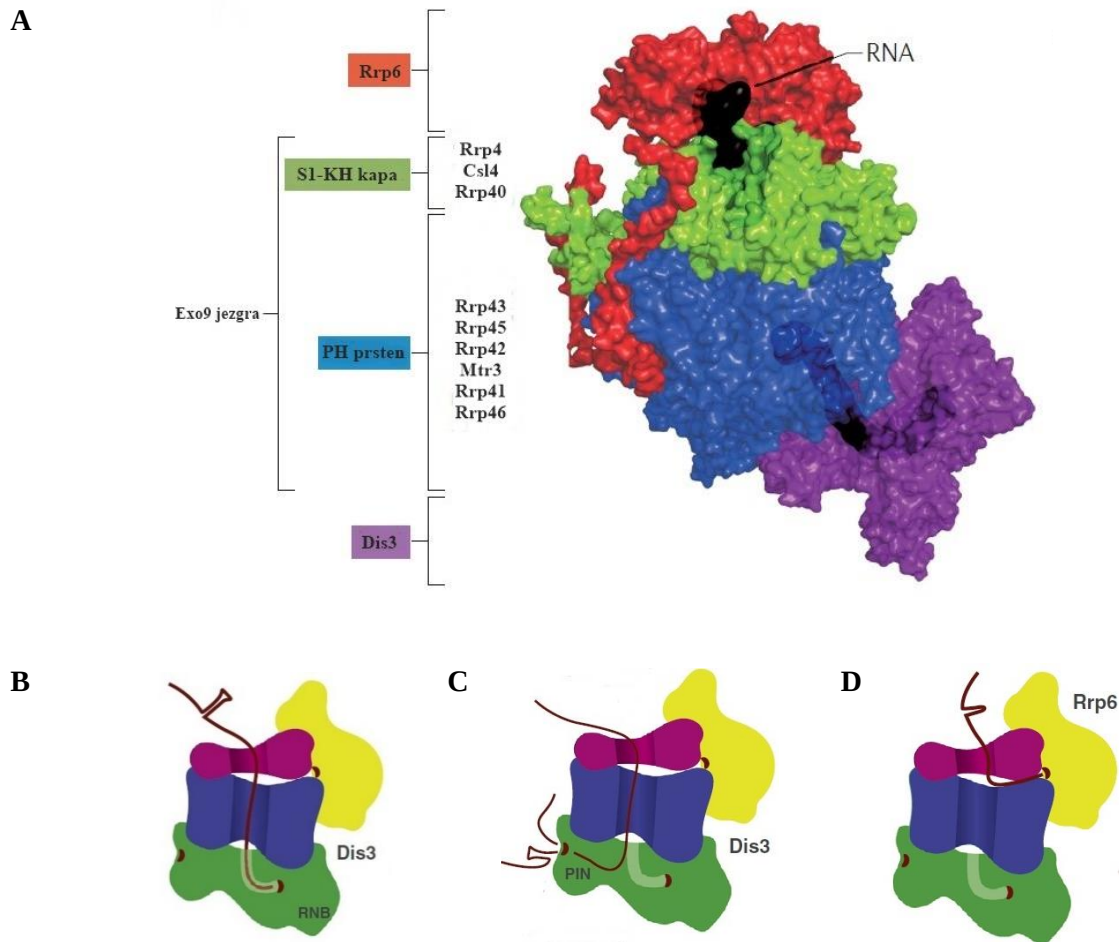
Eukariotske stanice su dinamični sustavi koji neprestano proizvode i razgrađuju RNA. Promjena razina RNA nužna je za održavanje homeostaze staničnog transkriptoma i regulaciju ekspresije gena. Stoga, sve vrste RNA podliježu putevima procesiranja i degradacije (Schmid i Jensen, 2018). Većina istraživanja prethodno je bila usredotočena na razumijevanje procesa degradacije mRNA koji se odvija u citoplazmi. Zanimanje za procese degradacije RNA u jezgri privuklo je pozornost tek otkrićem evolucijski očuvanog kompleksa RNA egzosoma. Tollervey i suradnici otkrili su ga kasnih 1990-ih, pokazavši ulogu ovog RNA-procesirajućeg kompleksa u sazrijevanju 5,8S ribosomalne RNA (rRNA), komponente velike ribosomske podjedinice. Većina onoga što se danas zna o egzosomu prvo je otkriveno u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, u kojem je i prvi put identificiran (Mitchell i sur., 1997). Danas je poznato da je RNA egzosom glavni

kompleks koji katalizira procesiranje i degradaciju RNA u smjeru 3'–5' u eukariotskim stanicama. Ovaj proteinski kompleks sudjeluje u brojnim procesima procesiranja i kontrole kvalitete RNA u jezgri i citoplazmi (Lingaraju i sur., 2020; Zinder i Lima, 2017; Chlebowski i sur., 2013).

Većina regija eukariotskog genoma se transkribira (Jensen i sur., 2013), pri čemu veliki dio transkripcijskih događaja rezultira sintezom RNA koje se ne mogu detektirati zbog njihove brze degradacije u jezgri stanice (Doma i Parker, 2007; Wyers i sur., 2005). Na primjer, degradacija posredovana egzosomom u jezgri rezultira eliminacijom *transfer* RNA (tRNA) koje su aberantne ili u suvišku (Gudipati i sur., 2012). U spomenutom staničnom odjeljku, egzosom specifično skraćuje male nuklearne (sn) i nukleolarne (sno) RNA prekursore (Allmang i sur., 1999; Mitchell i sur., 1997). Također, bitna uloga egzosoma u jezgri je potpuna degradacija produkata nekodirajuće transkripcije, poput kriptičnih nestabilnih transkripata (engl. *Cryptic Unstable Transcripts, CUTs*) u kvascu (Lacava i sur., 2005; Wyers i sur., 2005) i promotorskih uzvodnih transkripata (engl. *Promoter upstream transcripts, PROMPTs*) u ljudskim stanicama (Doma i Parker, 2007). U jezgri, egzosom sudjeluje u sazrijevanju ribosomalne RNA (rRNA). Dodatna klasa ncRNA u ljudi, nazvana *enhancer* RNA (eRNA), nastaje divergentnom transkripcijom na intergenskim pojačivačkim (engl. *enhancer*) regijama te je i ova klasa RNA podložna degradaciji RNA egzosomom (Andersson i sur., 2014). Nasuprot tome, utjecaj egzosoma na metabolizam RNA u citoplazmi očituje se u regulaciji razina specifičnih mRNA kao odgovor na promjene u okolišu. Ključne RNA mete egzosoma u citoplazmi uključuju normalne i aberantne mRNA transkripte, poput onih kojima nedostaje STOP kodon (Schaeffer i sur., 2009). Na primjer, egzosom ima važnu ulogu u ekspresiji gena tijekom razvoja stanica (Biro i sur., 2022). Post-transkripcijski mehanizmi regulirani RNA egzosomom kontroliraju temeljne biološke procese, održavajući osjetljivu ravnotežu između proliferacije i diferencijacije stanica, što je ključno za razvoj eritrocita, epidermalnih stanica, embrionalnih matičnih stanica i drugih vrsta stanica (Fraga De Andrade i sur., 2020).

U ljudi se egzosomske podjedinice nazivaju proteinske komponente egzosoma (engl. *exosome component, EXOSC*). U *S. cerevisiae* većina egzosomskih podjedinica naziva se Rrp proteini, prema izvornom genetskom *screeningu* kvasca za mutante koji aberantno procesiraju ribosomalnu RNA (engl. *ribosomal RNA processing, rrp*). U eukariotima, jezgra egzosoma sadrži 10 različitih podjedinica (Exo10). Istraživanja na kvascu i ljudima pokazala su da devet podjedinica egzosoma sačinjava strukturu sličnu bačvi kojoj nedostaje katalitička aktivnost (Exo9) (Liu i sur., 2006). Exo9 organiziran je u gornji prsten od tri podjedinice (Rrp4/40 i Csl4), s S1-KH domenama sličnima onima koje se nalaze u RNA-vezujućim proteinima, te donji PH prsten od šest podjedinica (Rrp41/42/43/45/46 i Mtr3) (slika 3A). Exo9 sadrži istaknuti središnji kanal koji se u obliku slova L proteže od ulazne pore na vrhu gornjeg prstena do dna donjeg prstena (Bonneau i

sur., 2009; Lorentzen i sur., 2008). Ovaj središnji kanal navodi RNA supstrate do 10. podjedinice, ribonukleaze Rrp44 (također poznate kao Dis3) (Makino i sur., 2013). Dvije katalitičke podjedinice na suprotnim krajevima Exo9 čine Exo11 (slika 3A). Amino-terminalna PIN domena Rrp44 ostvaruje vezu visokog afiniteta s Exo9 (Bonneau i sur., 2009), a osim toga sadrži i dostupno endoribonukleazno aktivno mjesto (Han i van Hoof, 2016; Schaeffer i sur., 2009; Schneider i sur., 2009; Lebreton i sur., 2008). Karboksi-terminalna RNB domena Rrp44 dijeli slične strukturalne značajke kao RNaza II *E. coli* te degradira RNA u 3'–5' smjeru, cijepajući jedan po jedan nukleotid na procesivan način - to jest, katalizira sekvencijalne krugove cijepanja bez disocijacije od RNA supstrata (Lorentzen i sur., 2008; Frazão i sur., 2006). Druga katalitička podjedinica Rrp6 smještena je na vrhu gornjeg prstena poznatog kao S1-KH „kapa“, blizu ulazne pore za RNA. Rrp6 i Dis3 su 3'-5' egzoribonukleaze, ali Dis3 ima i endoribonukleaznu aktivnost (Schaeffer i sur., 2009; Schneider i sur., 2009). Egzoribonukleazna aktivnost Rrp6 odcjepljuje pojedinačne nukleotide u 3'–5' smjeru na distributivni način (tj. disocira od RNA supstrata nakon svakog kruga cijepanja) (Wasmuth i Lima, 2017). U pravilu, Dis3 razgrađuje jednolančane RNA koje su prošle kroz cijeli središnji kanal (slika 3B), osim toga, postoji alternativni put kojim RNA može izravno pristupiti aktivnom mjestu Dis3 (slika 3C). Rrp6 razgrađuje ili skraćuje RNA koja ulaze u S1-KH prsten, a zatim prolaze do aktivnog mjesta Rrp6 (slika 3D) (Zinder i sur., 2016; Wasmuth i Lima, 2012). Exo11 kvasca po strukturi i funkciji sličan je ljudskoj izoformi, ali s određenim razlikama. Na primjer, u ljudskim stanicama postoje dva homologa Dis3, DIS3 u jezgri i DIS3L u citoplazmi, što rezultira različitim inačicama centralne jezgre egzosoma (Staals i Pruijn, 2010; Tomecki i sur., 2010).



Slika 3. Model i prolazak supstrata kroz kompleks RNA egzozoma (Exo11) u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Površinska struktura Exo11 ($\text{Exo10}^{\text{Dis3+Rrp6Cterm}}$), Rrp6 je crvene, a S1-KH kapa zelene boje; i $\text{Exo10}^{\text{Rrp6}}$, PH prsten je plave, Dis3 ljubičaste, a RNA crne boje (**A**). Put do aktivnog mjesta egzonukleaze Dis3 vodi kroz cijeli središnji kanal jezgre egzozoma do RNB domene (**B**). RNA može pristupiti aktivnom mjestu endonukleaze Dis3 bilo kroz središnji kanal ili izravno iz okoline (**C**). RNA prolazi kroz gornji dio središnjeg kanala (S1-KH kapa) kako bi došla do aktivnog mjesta Rrp6 (**D**). Crvena linija označava RNA. Slike su prilagođene prema radovima Kilchert i sur., 2016 i Chlebowska i sur., 2013.

Smatra se da je specifičnost RNA egzozoma za ciljane transkripte moguća zahvaljujući različitim egzozomskim kofaktorima koji usmjeravaju egzozom na različite RNA supstrate predodređene za procesiranje ili razgradnju. Nedavne studije utvrdile su niz kofaktora, odnosno adaptera nuklearnog egzozoma, koji pomažu usmjeravanju egzozoma na određene RNA supstrate (Zinder i Lima, 2017; Kilchert i sur., 2016). Struktura određenih adaptera evolucijski je očuvana, osobito između fizijskog kvasca i ljudi (Richard i sur., 2018). Za maksimalnu aktivnost nuklearnog egzozoma potrebna su tri kofaktora, TRAMP kompleks (Trf4/5-Air1/2-Mtr4), Rrp47 (također poznat kao C1D) i Mpp6. Rrp47 je u interakciji s Rrp6, pri čemu tvore platformu za vezanje Mtr4

(u ljudi, poznat kao SKIV2L2 ili MTREX), esencijalnu RNA DExH-box helikazu (Schuch i sur., 2014) koja djeluje u sklopu TRAMP kompleksa. Takav heterodimerizacijski modul Rrp6-Rrp47 (Makino i sur., 2015) veže se na vrh podjedinice jezgre egzosoma Rrp4 (Wasmuth i sur., 2014). Mpp6 je protein koji se svojom centralnom regijom veže za podjedinicu Rrp40 (Falk i sur., 2017). Mpp6 i heterodimer Rrp6–Rrp47 pridonose privlačenju RNA supstrata (Wasmuth i Lima, 2017) i oba povećavaju aktivnost helikaze Mtr4 (Schuller i sur., 2018; Weick i sur., 2018). Izuzev nuklearnih kofaktora, važan kofaktor egzosoma je i RNA helikaza specifično lokalizirana u citoplazmi, Ski2 (Brown i sur., 2000). Ski2 u sklopu Ski kompleksa doprinosi citoplazmatskim funkcijama egzosoma, uključujući kontrolu kvalitete (prvenstveno mRNA), ali sudjeluje i u procesima poput NMD puteva razgradnje (engl. *Nonsense Mediated Decay*, NMD) (Mitchell i Tollervey, 2003) te RNA interferenciji (Orban i Izaurralde, 2005).

Obzirom da RNA egzosom i njegovi kofaktori imaju velik broj različitih RNA supstrata, oni imaju ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena (Schmid i Jensen, 2018; Kilchert i sur., 2016). Gubitak funkcije egzosoma uslijed mutacija ili nedostatka aktivnosti njegovih podjedinica ili kofaktora može uzrokovati štetne promjene u različitim biološkim procesima i u konačnici pridonijeti razvoju ljudskih bolesti (Fasken i sur., 2020; Morton, 2017). Mutacije u genima koji kodiraju za strukturne podjedinice ovog kompleksa povezane su s određenim bolestima koje se manifestiraju karakterističnim kliničkim slikama te su objedinjene nazivom egzosomopatije (Burns i sur., 2018). Iako su klinički slučajevi egzosomopatija različiti, utjecaj na mali mozak česta je zajednička značajka (Amorim i sur., 2020). Nadalje, mutacija gena i aberantna ekspresija egzosomske komponente Dis3 pronađena je u nizu različitih karcinoma, kao što je multipli mijelom – karcinom koštane srži (Tomecki i sur., 2014; Chapman i sur., 2011).

2.2.1. Katalitička podjedinica RNA egzosoma Rrp6

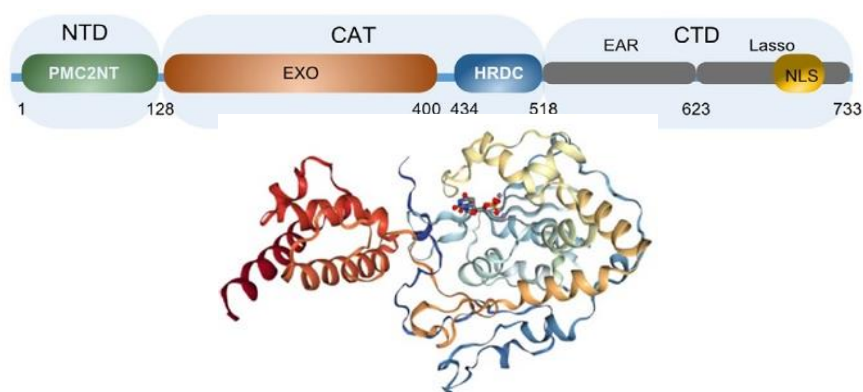
Rrp6 je katalitička podjedinica RNA egzosoma koja ima distributivnu 3'–5' egzoribonukleaznu aktivnost. Rrp6 nalazi se u jezgri kvasca i ljudi, ali je također prisutan u citoplazmi ljudskih stanica (de Almeida i sur., 2010). Nasuprot tome, postoje dokazi da Rrp6 u određenim procesima može djelovati i neovisno o RNA egzosomu (Wang i sur., 2020; Graham i sur., 2009; Callahan i Butler, 2008). Rrp6, osim što je RNA-vezujuća podjedinica nuklearnog RNA egzosoma, sudjeluje u interakcijama s drugim regulatornim proteinima koji vežu RNA i DNA (Marin-Vicente i sur., 2015). Rrp6 je homolog ljudskom autoantigenu PM-Scl 100-kDa te je proučavan u mnogim organizmima poput *Caenorhabditis elegans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Trypanosoma brucei* i *Danio rerio* (Müller i sur., 2020; Lebreton i sur., 2008; Andrulis i sur., 2002). Svaki od ovih eukariotskih proteina u svojim središnjim domenama dijeli homologiju s 3'–5' egzoribonukleazom RNazom D iz *E. coli*, što

upućuje na evolucijsku očuvanost funkcije RNaze D od bakterija do ljudi (Briggs i sur., 1998).

Rrp6 je polipeptid molekulske mase oko 100 kDa te sadrži 733 aminokiselinska ostatka i najmanje četiri različite funkcionalne domene (slika 4). Obzirom da pripada obitelji egzonukleaznih RNaza D, Rrp6 hidrolizira RNA putem mehanizma katalize za koji su bitna dva metalna iona, čime se poboljšavaju prepoznavanje supstrata i katalitička specifičnost (Beese i Steitz, 1991). Rrp6 sadrži amino-terminalnu PMC2NT domenu (eng. *Polycystin 2 N-Terminal, PMC2NT*) koja se povezuje s kofaktorom Rrp47 (Stead i sur., 2007), egzoribonukleaznu domenu (EXO), HRDC domenu (engl. *Helicase RNase D C-terminal domain, HRDC*) i karboksi-terminalnu domenu (CTD) koja se povezuje s jezgrom Exo9 (Callahan i Butler, 2008) i sastoji se od otprilike dvije stotine aminokiselinskih ostataka. Aminokiselinski ostaci CTD stupaju u interakciju s vanjskom površinom Exo9 (Makino i sur., 2013) i na taj način Rrp6 stupa u kontakt s Mtr3, Rrp43 i Csl4, tvoreći regiju za povezivanje s egzosomom (engl. *Exosome Associating Region, EAR*). Preostalih 100 aminokiselinskih ostataka CTD tvore vrlo bazičan i nestrukturirani C-terminalni rep, tzv. „laso“. Rrp6 laso sadrži lokalizacijski signal za import u jezgru (engl. *Nuclear Localization Signal, NLS*) (Phillips i Butler, 2003). Strukturne studije pokazale su da domene EXO i HRDC čine katalitički modul (CAT) unutar kojeg je 3'–5' egzoribonukleazno aktivno mjesto (Midtgaard i sur., 2006). Rrp6 EXO domena u kontaktu je s dva od tri S1/KH proteina, Rrp4 i Rrp40, a HRDC domena najbliže je Rrp4, iako izravni kontakti nisu kristalografski identificirani (Wasmuth i sur., 2014). EXO domena dijeli sekvencijsku sličnost s EXO I, II i III motivima egzonukleazne domene DNA polimeraze I koja sadrži četiri kisela ostatka, DEDD (Ollis i sur., 1985). Četiri spomenuta visoko očuvana aminokiselinska ostatka (3 aspartatna i 1 glutamatni) potrebna su za razgradnju nukleinskih kiselina u 3'–5' smjeru hidrolitičkim reakcijskim mehanizmom (Steitz i Steitz, 1993). Neki enzimi iz DEDD skupine u aktivnom mjestu sadrže dodatni očuvani histidinski ili tirozinski ostatak i prema tome se nazivaju DEDD-H, odnosno DEDD-Y. Ljudski EXOSC10, kvašćev Rrp6 i enzim za degradaciju bakterijske RNA, RNaza D, sadrže DEDD-Y motiv (Midtgaard i sur., 2006; Phillips i Butler, 2003; Blüthner i Bautz, 1992). HRDC domena stupa u interakciju s EXO domenom preko očuvanog aspartatnog ostatka (D457). HRDC domena uključena je u vezanje RNA te je pretpostavka da zapravo omogućava pravilnu orijentaciju kompleksnih supstrata u aktivnom mjestu (Midtgaard i sur., 2006). Domena PMC2NT prostire se preko središnjeg Exo9 kanala, što omogućuje interakciju s Rrp47 te olakšava privlačenje supstrata (Stead i sur., 2007). Rrp47 je neophodan za ekspresiju, odnosno stabilnost Rrp6 *in vivo* (Feigenbutz i sur., 2013). Opisana interakcija evolucijski je očuvana i između EXOSC10 i ljudskog ortologa Rrp47 (C1D) (Schilders i sur., 2007). Delecija gena *RRP6* rezultira izostankom proteina Rrp47, dok je u mutantu *rrp47* razina proteina Rrp6 smanjena do 90 % (Stuparevic i sur., 2013; Feigenbutz i sur., 2013; Stead i sur., 2007). Ovaj fenotip uglavnom je

posljedica promijenjene stabilnosti proteina, jer je uočeno da se razine mRNA *RRP6* i *RRP47* ne smanjuju u spomenutim delecijским mutantima (Garland i sur., 2013; Stuparevic i sur., 2013).

Funkcionalnost svih domena egzoribonukleazne podjedinice Rrp6 potrebna je za uspješno 3' - 5' procesiranje i degradaciju RNA supstrata. Unatoč tome što ima važne i vrlo raznolike uloge, Rrp6 nije esencijalan za vijabilnost stanica. No, stanice mutanta *rrp6* pokazuju temperaturno osjetljivi fenotip (engl. *temperature sensitive*, *ts*), kao i defekte u procesiranju RNA (Briggs i sur., 1998). Stanice mutanta *rrp6* karakterizira sporiji rast u usporedbi sa stanicama divljeg tipa, čak i pri permisivnoj temperaturi. Sojevi koji sadrže mutacije u EXO domeni *rrp6-D238A* (*exo-*) i *rrp6-Y361A* (*rrp6-cat*), također pokazuju sporiji rast pri povišenoj temperaturi, ali takav fenotip nije izražen kao kod deletanta *rrp6* (Assenholt i sur., 2008; Phillips i Butler, 2003).



Slika 4. Struktura i sastav domena Rrp6. Shema strukturnih motiva u N-terminalnoj (NTD), katalitičkoj (CAT) i C-terminalnoj (CTD) domeni Rrp6. Koordinate aminokiseline naznačene su za svaki fragment proteina. EAR, regija za povezivanje s egzosomom; EXO, egzoribonukleazna domena; HRDC, helikazna i RNaza D karboksi terminalna domena; „laso“ domena; NLS, signal nuklearne lokalizacije; PMC2NT, policistin 2 N-terminalna domena. Slika je prilagođena prema radu Stuparević i sur., 2021.

Za razliku od mutanta *rrp6*, katalitički mutant *rrp6-cat* pokazuje osjetljivost na hladnoću (Mukherjee i sur., 2016). To sugerira da su za funkciju ovog proteina bitne značajke koje nisu vezane uz egzoribonukleazno aktivno mjesto Rrp6. Nadalje, nekatalitička uloga Rrp6 pri aktivaciji RNA egzosoma manifestira se kroz alosteričku regulaciju aktivnosti Dis3. Rrp6 se povezuje s vrhom egzosoma (S1/KH kapa), kroz koji RNA molekule ulaze, čime potencijalno regulira prolazak RNA kroz jezgru egzosoma do aktivnog mjesta Dis3 (Makino i sur., 2015). Centralna uloga Rrp6 očituje se u procesiranju 3' krajeva 5,8S pre-rRNA te skraćivanju malih nuklearnih/nukleolarnih RNA (sn/snoRNA) (Allmang i sur., 1999; Briggs i sur., 1998). Također, Rrp6 je nužan za razgradnju kratkoživućih nekodirajućih kriptičnih nestabilnih transkripata (CUTs) (Colin i sur., 2011) i RNA nastalih preranom terminacijom transkripcije (Vasiljeva i Buratowski, 2006), dok u citoplazmi ljudskih stanica regulira duljine poli(A) repa kodirajućih

transkripata (Schmid i sur., 2012). Iako je ljudski EXOSC10 strukturno sličan kvašćevom, uočene su neke jedinstvene strukturne i biokemijske razlike. Na primjer, EXOSC10 u određenoj mjeri bolje razgrađuje supstrate koji sadrže sekundarne strukture u odnosu na kvašćev homolog (Januszyk i sur., 2011).

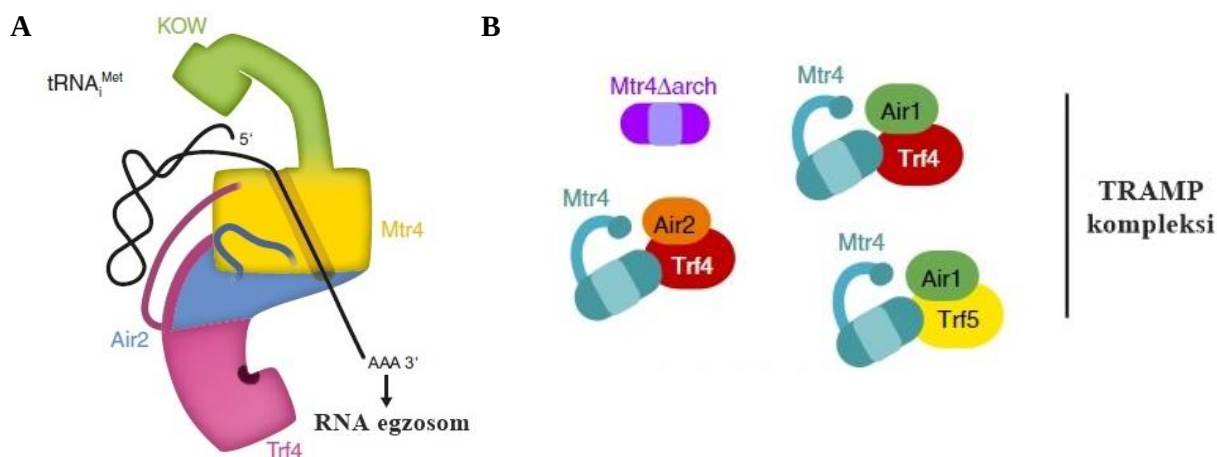
2.2.3. TRAMP kompleks

Jedan od najbolje proučenih puteva razgradnje nekodirajućih RNA u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* zahtijeva aktivnost TRAMP kompleksa. Izvorno, TRAMP kompleks otkrili su LaCava i sur., 2005. godine u kvascu *S. cerevisiae*, te su pokazali da stimulira egzosom prilikom razgradnje RNA supstrata *in vitro* i *in vivo* (LaCava i sur., 2005; Wyers i sur., 2005). TRAMP kompleks je multiproteinski heterotrimerni kompleks koji ima distributivno poliadenilacijsko djelovanje te stimulira egzosom na degradaciju širokog spektra nekodirajućih transkripata. Postoji nekoliko izoformi kompleksa TRAMP, ali svaka uključuje tri komponente: Trf4 ili Trf5, Air1 ili Air2 i Mtr4, a sve komponente evolucijski su očuvane od stanica kvasca do ljudi.

Mtr4 je član obitelji RNA i DNA helikaza sličnih Ski2, uključenih u razgradnju RNA (Mtr4 i Ski2), *splicing* mRNA (Brr2), translaciju (Slh1) i replikaciju/rekombinaciju DNA (Hel308) (Fairman-Williams i sur., 2010; Caprara, 2010). Mtr4, osim u sklopu TRAMP kompleksa, djeluje kao središnja podjedinica mnogih analognih proteinskih kompleksa poput NEXT i PAXT/PPC, koji zajedno s egzosomom sudjeluju u kontroli kvalitete RNA u ljudskim stanicama. NEXT (engl. *Nuclear Exosome Targeting Complex*, NEXT) i PAXT (engl. *Poly(A) Exosome Targeting*, PAXT) kompleksi su koji sadrže Mtr4 specifičnu za višestanične organizme, a prvi put su izolirani iz ljudskih stanica (Meola i sur., 2016; Lubas i sur., 2011). Mtr4 i Ski2 imaju sličnu strukturu (Olsen i Johnson, 2021) i oba imaju središnju ulogu u metabolizmu eukariotske RNA kao aktivatori egzosoma RNA, pri čemu Mtr4 obavlja tu funkciju u jezgri, a Ski2 u citosolu (Mitchell, 2014; Anderson i Parker, 1998). Struktura Mtr4 uključuje helikaznu jezgru s četiri domene (DExH), nestrukturirani N-terminus i jedinstvenu domenu „luka” (engl. *arch* ili *kow* domena) (Olsen i Johnson, 2021). Helikazna jezgra Mtr4 sadrži ATP-aznu aktivnost ovisnu o RNA te posreduje vezanju Trf4 i Air2. Air1 i Air2 su proteini cinkovog prsta (engl. *Zn-knuckle*), koji vežu RNA te koji su originalno detektirani u *screeningu* za faktore koji sudjeluju u modifikacijama heterolognih nuklearnih ribonukleoproteina (Inoue i sur., 2000). Air1/2 sadrže pet CCHC motiva (tri cisteinska i jedan histidinski ostatak) između C i N terminusa, koji su karakteristični za RNA-vezujuće domene. Stoga, pretpostavka je da Air1/2 omogućuju privlačenje TRAMP kompleksa na supstrate vezanjem RNA (Schmidt i Butler, 2013; LaCava i sur., 2005). Osim toga, strukturna i biokemijska

istraživanja pokazala su da cinkovi prsti omogućuju interakciju Air2 s Trf4 (Fasken i sur., 2011; Hamill i sur., 2010). Ovi podaci koreliraju s ranijim istraživanjima koja pokazuju da Trf4 ne uspijeva poliadenilirati supstrate *in vitro* u odsutnosti Air1 i Air2 (Vaňáčová i sur., 2005; Wyers i sur., 2005). Trf4 i Trf5 pripadaju obitelji Cid1 nekanonskih Poli(A) polimeraza. Strukturna jezgra Trf4 ima poli(A) polimeraznu aktivnost i čini platformu za heterodimerizaciju i interakciju s N-terminalnim krajem Air2 (San Paolo i sur., 2009). Trf4 ili Trf5 dodaju kratki oligo(A) rep, znatno kraći od poli(A) repa koji dodaje kanonska polimeraza (Pap1). Arhitektura TRAMP kompleksa predložava model prema kojem Mtr4 provlači RNA kroz helikaznu jezgru do Trf4-Air2 koji joj dodaju kratki poli(A) rep (slika 7A). TRAMP dovodi do usmjeravanja nuklearnog egzosoma na kriptične nestabilne transkripte (CUTs) i hipomodificirane tRNA (Wang i sur., 2008; Kadaba i sur., 2006).

Većina strukturnih i funkcionalnih analiza funkcija TRAMP kompleksa bila je usredotočena na izoformu TRAMP4, a manje se zna o izoformi TRAMP5 (Falk i sur., 2014; Jia i sur., 2012). TRAMP4 prvenstveno sadrži modul Trf4–Air2, a TRAMP5 sadrži isključivo modul Trf5–Air1 (slika 7B).



Slika 6. Model mehanizama djelovanja TRAMP kompleksa i interakcija komponenti TRAMP kompleksa koje formiraju specifične izoforme kompleksa. Shematski prikaz TRAMP kompleksa na kojem je DExH helikazna jezgra Mtr4 prikazana žutom, a domena luka zelenom bojom. Trf4 prikazan je ružičastom bojom s označenim aktivnim poliadenilacijskim mjestom. Air2 je u plavoj boji. N-terminalne domene Trf4 i Air2 u interakciji su s DExH jezgrom. 3' kraj tRNA (crna boja) prolazi kroz kanal helikaze i doseže poliadenilacijsko mjesto Trf4 (A). Proteini TRAMP kompleksa koji međusobnim interakcijama formiraju specifične izoforme istaknuti su bojama: Mtr4 helikaza plavom, Mtr4 mutant bez domene luka ljubičastom, Air1 i Air2 proteini cinkovog prsta zelene i narančaste boje, a Trf4 i Trf5 poli(A) polimeraze u crvenoj i žutoj boji (B). Slike su prilagođene prema Falk i sur., 2014 i Delan-Forino i sur., 2020.

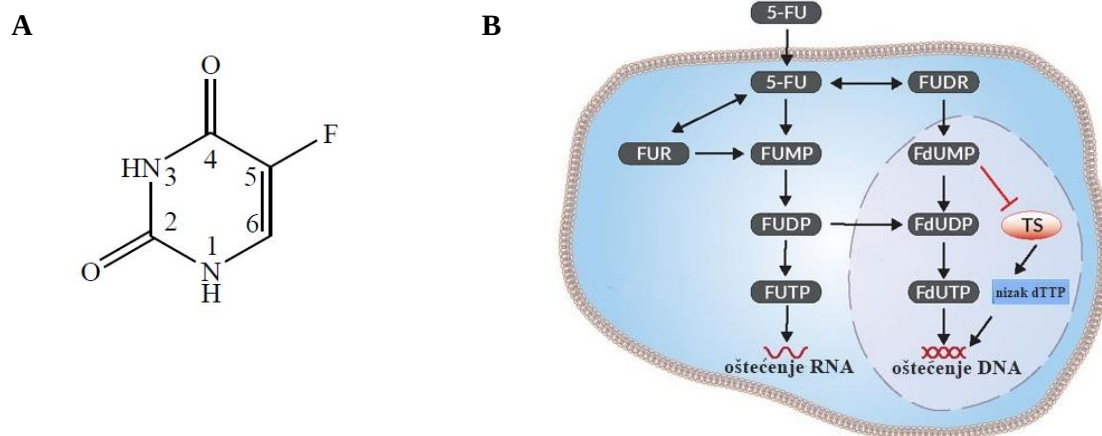
Parovi proteina Air1/2 i Trf4/5 pokazuju određenu funkcionalnu redundantnost. Trf4 i Trf5 dijele 67 % sličnosti aminokiselinskih sekvenci u svojim središnjim regijama, ali se razlikuju u i N- i C-terminalnim regijama. Gubitak obje poli(A) polimeraze je letalan (Castaño i sur., 1996). Smanjena razina Trf5 u deletantu *trf4* povećava razine specifičnih RNA, kao što su U14 snoRNA, 23S pre-rRNA i neke vrste CUT transkripata, što ukazuje da Trf4 i Trf5 pokazuju djelomično preklapajuće specifičnosti prema supstratima *in vivo* (Egecioglu i sur., 2006; Houseley i Tollervey, 2006). Slično, proteini Air1 i Air2 dijele 45 % identiteta aminokiselinske sekvence. N-terminalne regije samo su im ~44 % identične, dok su C-krajevi znatno različiti (Schmidt i Butler, 2013). To korelira s prethodnim eksperimentima, koji su pokazali da se neke različite vrste nekodirajućih RNA nakupljaju u sojevima kojima nedostaje bilo koji od Air proteina (Vaňáčová i sur., 2005; LaCava i sur., 2005). Homolozi Trf4 i Trf5 zastupljeni su u brojnim eukariotima, iako se pokazalo da je samo Cid14 iz *Schizosaccharomyces pombe* funkcionalno homologan s Trf proteinima iz *S. cerevisiae* (Bühler i sur., 2007; Win i sur., 2006; Aravind i Koonin, 1999).

2.3. 5-FLUOROURACIL

5-fluorouracil (5-FU) kemijski je spoj, nukleozidni analog pirimidina koji pripada skupini antimetabolita (slika 8A). 5-FU je sintetizirao Charles Heidelberger 1957. g. Nukleozidni analozi nastaju modifikacijom dušične baze ili šećerne skupine prirodnog nukleozida. Nukleozidni analozi pokazuju razna biološka djelovanja u liječenju virusnih bolesti i tumora, obzirom da dijele veliku strukturnu sličnost s nukleozidima (Jordheim i sur., 2013). Antimetaboliti oponašaju fiziološke uloge nukleozida u staničnom metabolizmu, čime inhibiraju bitne biosintetske procese ili se ugrađuju u makromolekule, kao što su DNA i RNA (Longley i sur., 2003).

In vivo mehanizam citotoksičnosti 5-FU pripisuje se pogrešnoj inkorporaciji fluoronukleotida u RNA i DNA i inhibiciji enzima timidilat sintaze (TS). Stanice koje se brzo dijele (poput tumorskih stanica) ovisne su o povećanoj opskrbi timidilatom za sintezu DNA. Stoga se inhibicijom timidilat sintaze, jedne od najčešćih meta u kemoterapiji (Rose i sur., 2002), zapravo posredno inhibira replikacija DNA. Inhibicijom replikacije dolazi do smrti stanice zbog nedostatka timina, takozvane „*tymineless death*“ (Ladner, 2001). Osim toga, 5-FU ugrađuje se u RNA umjesto uracila te na taj način ometa transkripciju i posttranskripcijsko procesiranje RNA (Hoskins i Scott Butler, 2008). Staničnim anabolizmom 5-FU se prevodi u niz aktivnih metabolita (slika 8B): (1) fluorouridin trifosfat (FUTP) koji utječe na sintezu RNA ugradnjom umjesto uridin trifosfata (UTP); (2) fluorodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) koji utječe na sintezu DNA inkorporiranjem u novonastali lanac umjesto deoksitimidin trifosfata (dTTP); (3) fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) koji utječe na aktivnost timidilat sintaze, čime posljedično utječe na sintezu DNA (Miura

i sur., 2010). Smanjenje razine dTMP rezultira naknadnim smanjenjem deoksitimidin trifosfata (dTTP) (slika 8B), što mehanizmima povratne sprege inducira štetne promjene u razinama drugih deoksinukleotida (dATP, dGTP i dCTP) (Longley i sur., 2003).



Slika 8. Struktura i metabolizam 5-FU. 5-FU s označenim brojevima atoma unutar prstena (**A**). Shematski prikaz staničnog metabolizma 5-FU i nazivi aktivnih metabolita: fluorouridin (FUR), fluorouridin monofosfat (FUMP), fluorouridin difosfat (FUDP), fluorouridin trifosfat (FUTP), fluorodeoksiuridin (FUDR), fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP), fluorodeoksiuridin difosfat (FdUDP), fluorodeoksiuridin trifosfat (FdUTP), deoksitimidin trifosfat (dTTP), prema <https://www.invivogen.com/5-fluorouracil> Pristupljeno: 17.6.2022. (**B**).

FUTP, 5-FU metabolit, u velikoj se mjeri ugrađuje u RNA, čime ometa normalno procesiranje i funkciju RNA. Pogrešna inkorporacija 5-FU može negativno djelovati na metabolizam RNA na nekoliko razina. Ne samo da inhibira procesiranje pre-rRNA u zrele rRNA (Ghoshal i Jacob, 1997; Kanamaru i sur., 1986), već ometa i posttranskripcijsku modifikaciju tRNA (Santi i Hardy, 1987) te nastajanje i aktivnost snRNA/proteinskih kompleksa, čime izravno utječe na *splicing* pre-mRNA (Patton, 1993). Također, rRNA, tRNA i snRNA sadrže modificiranu bazu pseudouridin, koja je bitna za njihove funkcije, a pokazalo se da 5-FU inhibira posttranskripcijsku konverziju uridina u pseudouridin u ovim vrstama RNA (Samuelsson, 1991). Također, poznato je da je poliadenilacija mRNA inhibirana pri relativno niskim koncentracijama 5-FU (Balatsos i sur., 2000).

Obzirom da je metabolizam uracila potencijalna meta za antimetabolitsku kemoterapiju, 5-FU jedan je od najčešće korištenih onkoloških lijekova. Kao monoterapija ili u kombinaciji sa drugim citostaticima, indiciran je za liječenje karcinoma dojke, debelog crijeva i rektuma. Tijekom posljednjih 50 godina, unatoč brojnim prednostima, kliničke primjene bile su uvelike ograničene zbog razvijanja otpornosti stanica tumora na djelovanje 5-FU.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije i enzimi

Kemikalije i enzimi korišteni u ovom radu nabavljeni su od slijedećih proizvođača:

- Phloxine B, 5-fluorouracil, aktinomicin D, SDS, agaroza, akrilamid, adenin, amonijev persulfat, β -merkaptotanol: Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Agar, kvašćev ekstrakt, Ponceau S: Biolife Italiana (Milano, Italija)
- Aminokiseline (histidin, leucin, triptofan, lizin), dušična baza (uracil): Acros Organics (Geel, Belgija)
- D (+) glukoza bezvodna: Lach-Ner (Neratovice, Češka)
- Kvašćeva dušična baza bez aminokiselina (YNB), pepton: Difco (SAD)
- Clarity Western ECL Substrate - otopine za razvijanje imunoblota: Bio-Rad Laboratories (Hercules, SAD)
- Triton X-100, polietilenglikol (PEG) 4000: Fluka Chemie GmbH (Buchs, Švicarska)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED): Fisher Scientific (Hampton, SAD)
- DNaza I bez RNaza, migracijsko bojilo za nukleinske kiseline: New England Biolabs (Ipswich, SAD)
- StainIN Red – boja za nukleinske kiseline: highQu (Kraichtal, Njemačka)
- Pierce™ 660nm Protein Assay kit, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, standardi za proteinsku elektroforezu, fenol/kloroform, EDTA, Natrij acetat: Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- WesternSure Pen: LI-COR Biosciences (Lincoln, SAD)

3.1.2. Otopine i puferi

3.1.2.1. Otopine za izolaciju i pročišćavanje RNA

- AE pufer: 50 mM Natrijev acetat pH 5,3, 10 mM EDTA pH 8, deionizirana voda tretirana dietilpirokarbonatom (DEPC)
- 10 % SDS: 10 g/mL SDS
- Otopina fenola / kloroforma (5:1) pH 4,5
- Otopina fenola / kloroforma / izoamilnog-alkohola (25:24:1) pH 6,7

- 10x pufer za DNazu (pH 7,6): 100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂
- 1 %-tni agarozni gel za elektroforezu: priprema se zagrijavanjem agaroze u TAE puferu
- 50x TAE pufer (pH = 8,5): 2 M Tris; 1 M ledena octena kiselina; 50 mM EDTA, koristi se 1x koncentrirani

3.1.2.2. Otopine i puferi za rad s proteinima

- NaOH 0,2 M i 0,6 M
- Laemmli pufer (0,06 M Tris-HCl pH 6,8; 5 % glicerol, 2 % SDS, 2 % β-merkaptotanol, 0,0025 % bromfenolplavo (nesterilno)) – na magnetnoj mješalici, 1 g SDS otopi se u 3 mL 1 M Tris-HCl te se doda 2,5 mL glicerola, 1 mL β-merkaptotanol i 1,25 mg bromfenol plavo. Volumen otopine potom se namjesti na 50 mL dodatkom deionizirane vode. Isti volumen modificiranog Laemmli pufera sadrži: 3 mL 1 M Tris-HCl, 2,5 mL glicerola, 2 mL β-merkaptotanol, 2 g SDS te 5 mg boje bromfenolplavo
- 50 % PEG – 4000: 0,5 g/mL
- 10x koncentrirani pufer za elektroforetsko razdvajanje proteina (pH 8,3): 25 mM Tris, 192 mM glicin i 0,1 % SDS
- Pufer za donji gel/gel za razdvajanje (pH = 8,8): 1,5 M Tris-HCl pufer
- Pufer za gornji gel poliakrilamida/gel za sabijanje (pH = 6,8): 1 M Tris-HCl pufer
- Matična otopina akrilamida/bisakrilamida: 30 % akrilamid, 8 % bisakrilamid
- 10 % APS: 10 g/mL
- Gel za proteinsku elektroforezu: 10 % donji gel (1,25 mL pufera za donji gel (pH 8,8), 1,25 mL akrilamid, 1,25 mL deH₂O, 2,5 μL TEMED, 19 μL amonij-persulfat (APS)), 4,5 % gornji gel: (1,065 mL pufera za donji gel (pH 6,8), 0,15 mL akrilamid, 1,25 μL TEMED, 11,25 μL amonij-persulfat (APS))
- 10x koncentrirani pufer za SDS elektroforezu: 0,025 M Tris-baza, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS, deH₂O
- Towbin pufer za transfer: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % (v/v) metanol (pH 8,3), deH₂O
- Otopina za blokiranje membrane: 5 % obrano mlijeko u prahu u TBST puferu
- 1x TBST pufer (engl. Tris buffer saline Tween): 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1 % Tween-20, deH₂O
- Ponceau S boja (0,1 % Ponceau S u 5 %-tnoj očetnoj kiselini)

3.1.3. Hranjive podloge

3.1.3.1. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Za uzgoj sojeva kvasca *S. cerevisiae* korištene su YPD i YNB hranjive podloge. U krute hranjive podloge, prije sterilizacije, uz otopinu glukoze dodaje se i agar, koncentracije 16 g/L. U tekuće hranjive podloge, nakon sterilizacije autoklaviranjem, dodaje se sterilizirana otopina glukoze do finalne koncentracije 20 g/L kao i 5-fluorouracil (40 mg/mL) sterilno do finalne koncentracije ovisno o eksperimentu.

- YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) hranjiva podloga

Tekuće YPD podloge korištene su za mjerenje rasta stanica kvasca. Sastav im je: pepton 20 g/L, kvašćev ekstrakt 10 g/L i adenin 0,1 g/L

- YNB (*Yeast Nitrogen Base*) hranjiva podloga

Krute YNB podloge korištene su za test rasta (engl. „*plate assay*“) sastava: YNB 6,7 g/L, smjesa aminokiselina i dušičnih baza *drop out* 2 g/L, triptofan, uracil i histidin svaki po 0,8 g/L, leucin 0,16 g/L

Tablica 1. Smjesa aminokiselina i drugih tvari rasta („*drop-out*“).

adenin	3 g	L-izoleucin	2 g
L-alanin	2 g	L-lizin	4 g
L-arginin	2 g	L-metionin	2 g
L-asparagin	2 g	<i>p</i> -aminobenzojeva kiselina	0,2 g
L-asparaginska kiselina	2 g	L-fenilalanin	2 g
L-cistein	2 g	L-prolin	2 g
L-glutamin	2 g	L-serin	2 g
L-glutaminska kiselina	2 g	L-treonin	2 g
L-glicin	2 g	L-tirozin	2 g
inozitol	2 g	L-valin	2 g

3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Schizosaccharomyces pombe*

Za uzgoj sojeva kvasca *S. pombe* korištene su YPD i YES hranjive podloge. U krute hranjive podloge, prije sterilizacije, dodaje se i agar, koncentracije 16 g/L kao i 5-fluorouracil (40 mg/mL) sterilno do finalne koncentracije ovisno o eksperimentu. U tekuće hranjive podloge, nakon sterilizacije autoklaviranjem, dodaje se sterilizirana otopina glukoze do finalne

koncentracije 30 g/L kao i Phloxine B do finalne koncentracije 5 mg/L.

- YES (*Yeast Extract with Supplements*) hranjiva podloga
Tekuće i krute hranjive podloge su korištene za test rasta i uzgoj stanica kvasca *S. pombe*, a sastava su: kvašćev ekstrakt 5 g/L, aminokiseline - adenin, histidin, uracil, leucin, lizin dodaju se svaka po 0,24 g/L
- YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) hranjiva podloga
Krute YPD podloge korištene su za test rasta: Sastav im je: pepton 20 g/L, kvašćev ekstrakt 10 g/L i adenin 0,1 g/L.

3.1.4. Sojevi kvasca

Tablica 2. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni u ovom radu.

SOJ	GENOTIP	IZVOR
BMA41	wt (divlji tip)	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100</i> Baudin-Baillieu i sur., 1997
	<i>rrp6</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp6::KanMX4</i> Mosrin-Huaman i sur., 2009
	<i>rrp47</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp47::KanMX4</i> Stuparević i sur., 2013
	<i>rrp6-Y361A</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp6Y361A</i> Stuparević i sur., 2013
	<i>trf4</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 trf4::KanMX4</i> Stuparević i sur., 2013
	<i>trf5</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 trf5::KanMX4</i> Stuparević i sur., 2013
	<i>mpp6</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 mpp6::KanMX4</i> Stuparević i sur., 2013
	<i>air1</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 air1::KanMX4</i> Stuparević i sur., 2013
	<i>air2</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 air2::KanMX4</i> Stuparević i sur., 2013
	<i>air1 air2</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 air1::HIS3 air2::KanMX4</i> Mosrin-Huaman i sur., 2009
DLY1354 = <i>DIS3</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 dis3::KanMX4 [pBS3269-DIS3, LEU2]</i> Stuparević i sur., 2013	
DLY1350 = <i>dis3-D171N</i> (<i>dis3 endo</i>)	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 dis3::KanMX4 [pBS3278-dis3D171N, LEU2]</i> Stuparević i sur., 2013	
DLY1358 = <i>dis3-D551N</i> (<i>dis3 exo</i>)	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 dis3::KanMX4 [pBS3270-dis3D551N, LEU2]</i> Stuparević i sur., 2013	

Tablica 2. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni u ovom radu – nastavak.

SOJ		GENOTIP	IZVOR
SK1	wt (divlji tip)	<i>MATa/MATa ho::LYS2/ho::LYS2 ura3/ura3 lys2/lys2 leu2::hisG/leu2::hisG arg4-Nsp/arg4-Bgl his4x::LEU2-URA3/his4B::LEU2</i>	Primig i sur., 2000
	<i>TEF-RRP6</i>	<i>MATa/MATa ho::LYS2/ho::LYS2 ura3/ura3 lys2/lys2 leu2::hisG/leu2::hisG arg4-Nsp/arg4-Bgl his4x::LEU2-URA3/his4B::LEU2 TEF-RRP6/TEF-RRP6</i>	Laboratorij M. Primiga, IRSET Inserm
BY4741	wt (divlji tip)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann i sur., 1998
	<i>rrp6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rrp6::KanMX4</i>	Novačić i sur., 2021
	<i>air1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 air1::KanMX4</i>	EUROSCARF
	<i>air2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 air2::KanMX4</i>	EUROSCARF
JHY222	wt (divlji tip)	<i>MATa/MATa HAP1/HAP1 MKT1(D30G)/MKT1(D30G) RME1(INS308A)/RME1(INS 308A) TAO3(E1493Q)/TAO3(E1493Q)</i>	Lardenois i sur., 2011
	<i>rrp6/rrp6</i>	<i>MATa/MATa HAP1/HAP1 MKT1(D30G)/MKT1(D30G) RME1(INS 308A)/RME1(INS 308A) TAO3(E1493Q)/TAO3(E1493Q) rrp6::KanMX4/rrp6::KanMX4</i>	Lardenois i sur., 2011

Tablica 3. Sojevi kvasca *Schizosaccharomyces pombe* korišteni u ovom radu.

SOJ	GENOTIP	IZVOR
AI16 wt (divlji tip)	<i>h90 ura4-D18 ade6-M210 leu1-32</i>	NBRP Japan (Shimoda, Chikashi)
SP599 <i>rrp6</i>	<i>h90 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 rrp6Δ::kanr</i>	NBRP Japan (Sugiyama, Tomoyasu)
SP1024 <i>RRP6-MYC</i>	<i>h90 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 red1- FLAG::kanr rrp6-myc::kanr</i>	
MY65 wt (divlji tip)	<i>h+ leu1 ura4 his2</i>	NBRP Japan (Yanagida, Mitsuhiro)
MY1240 <i>dis3-54 (dis3^{exo-})</i>	<i>h+ ura4 leu1 his2 dis3-54</i>	

3.1.5. Primarna i sekundarna antitijela

Tablica 4. Popis antitijela korištenih u radu

	Antitijelo	Kataloški broj	Izvor	Razrjeđenje
primarno antitijelo	Anti-Rp6 poliklonsko iz zeca	/	Laboratorij M. Primiga, IRSET Inserm	1:3000
	Anti-Pgk1 monoklonsko iz miša	ab113687	Abcam, UK	1:5000
	Anti-Myc monoklonsko iz miša	9E10	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
	Anti-Beta aktin monoklonsko iz miša	mAbcam 8224	Abcam, UK	1:2500
	Anti-Air2 poliklonsko iz zeca	/	Laboratorij R. Rahmounija, CBM CNRS	1:1000
	Anti-Tfs1 poliklonsko iz zeca	/	Laboratorij R. Rahmounija, CBM CNRS	1:1000
sekundarno antitijelo	Anti-zečji IgG iz kože s vezanom peroksidazom iz hrena	A0545	Sigma-Aldrich, SAD	1:50000
	Anti-mišji IgG iz zeca s vezanom peroksidazom iz hrena	A9044	Sigma-Aldrich, SAD	1:50000

3.1.6. RT-qPCR početnice

Tablica 5. RT-qPCR početnice korištene u ovome radu

Naziv gena	Slijed nukleotida 5'-3'	Duljina produkta [pb]
<i>RRP6</i>	fwd: CGAGACCAAAGCAGACGGAA rev: TTAGTGACAGGCTTGGCTCG	126
<i>CPS1</i>	fwd: GGGGCGTGGTTCTAACGATT rev: GTGCCGCTTGCTTCTTCATC	135
<i>ACT1</i>	fwd: AGTTGCCCCAGAAGAACACC rev: GGACAAAACGGCTTGGATGG	139
<i>TAF10</i>	fwd: CACCTTTTCCATCGGTTGCG rev: CCCATCATCCACTACAGCCTC	110
<i>SCR1</i>	fwd: GGCTGTAATGGCTTTCTGG rev: GTGCGGAATAGAGAACTATCC	123

3.2. METODE

3.2.1. Test rasta („plate assay“)

Test rasta (engl. *plate assay*) je metoda za ispitivanje vijabilnosti stanica. U ovom radu korišten je za usporedbu rasta određenih mutanata u odnosu na stanice divljeg tipa na podlogama s različitim koncentracijama 5-fluorouracila te pri različitim temperaturama. Stanice kvasca

uzgojene su u odgovarajućoj tekućoj podlozi na 30 °C do logaritamske faze rasta, zatim je spektrofotometrijski određena gustoća kulture (OD_{600}/mL) koja je prilagođena na 1 OD_{600}/mL sterilnom vodom. Slijedila je priprema 4 decimalna razrjeđenja ove početne suspenzije sukcesivnim miješanjem 100 μL suspenzije stanica s 900 μL sterilne vode. 10 μL svakog decimalnog razrjeđenja nakapano je na dobro osušenu krutu YNB, YPD ili YES podlogu sa ili bez odgovarajuće koncentracije 5-fluorouracila. Podloge su inkubirane pri 30 °C, 37 °C ili 38 °C tijekom 3 dana i fotografirane Uvidoc HD6 kamerom.

3.2.2. Mjerenje rasta stanica kvasca

Sojevi kvasca uzgojeni su preko noći na rotacijskoj tresilici na 30 °C u tekućoj YPD podlozi do logaritamske faze rasta. Prekonoćnim kulturama spektrofotometrijski je određena gustoća i odgovarajući volumen kulture naciijepljen je po izračunu za logaritamski rast na ciljanoj gustoći stanica od 0,1 OD/mL . Inkubaciji kultura na 30 °C ili 37 °C prethodi dodatak odgovarajuće koncentracije 5-fluorouracila. Praćenje rasta provodi se kontinuiranim mjerenjem OD_{600} u logaritamskoj fazi rasta kultura inkubiranih na rotacijskoj tresilici na 30 °C ili 37 °C.

3.2.3. Izolacija ukupne RNA i sinteza cDNA za RT-qPCR

Prije početka izolacije RNA sve radne površine i pribor tretirani su otopinom RNaza Zap koja uništava enzim RNazu. RNaza je enzim koji katalizira reakciju razgradnje RNA. Voda je tretirana dietilpirokarbonatom (DEPC) te potom autoklavirana kako bi se inaktivirale potencijalno prisutne RNaze. Talog od 10 OD jedinica stanica kvasca uzgojenih u odgovarajućim uvjetima je resuspendiran u sterilnoj deH_2O . Slijedi centrifugiranje (1 min/11000 rpm) nakon kojeg se talog resuspendira u 1 mL AE pufera. Nakon još jednog koraka centrifugiranja supernatant se ukloni, a talog stanica je skladišten na – 80 °C. Ukupna RNA iz smrznutih uzoraka ekstrahirana je metodom vrućeg fenola prema Schmitt i sur., 1990. Talog stanica resuspendira se u 400 μL AE pufera, prebaci u Eppendorf epruvetu koja sadrži staklene kuglice za razbijanje stanica te se u suspenziju doda 10 % SDS. Suspenzija se kratko vorteksira i dodaje se 440 μL otopine fenola i kloroforma (5:1, pH 4,5) prethodno zagrijane na 65 °C. Fenol solubilizira biološki materijal i denaturira proteine. Nakon solubilizacije dodatak kloroforma dovodi do odvajanja faza pri čemu se proteini ekstrahiraju u organsku fazu, DNA se nalazi u međufazi, a RNA ostaje u vodenoj fazi. Suspenzija se snažno vorteksira u tri ciklusa po 1 minutu uz grijanje na 65 °C u pauzama između vorteksiranja. Nakon inkubacije na – 80 °C tijekom 20 min, opet su uslijedila tri ciklusa vorteksiranja uz zagrijavanje. Potom su uzorci centrifugirani u centrifugi s hlađenjem (10 min/10000 rpm/4 °C). Oko 400 μL gornje vodene faze pažljivo je prebačeno je u novu Eppendorf epruvetu. Tome je

dodan jednak volumen otopine fenol/kloroform/IAA (24:25:1, pH 6,7) i sve je promiješano okretanjem Eppendorf epruvete. Nakon centrifugiranja (10 min/10000 rpm/4 °C) vodena faza se izdvoji u novu Eppendorf epruvetu uz dodatak natrijevog acetata do finalne 0,3 M koncentracije pa 3 volumena 100 % etanola u svrhu taloženja RNA. Uzorci se talože na – 80 °C oko 20 minuta. Suspenzija je centrifugirana (10 min/10000 rpm/4 °C) te je talog RNA ispran s 80 % etanolom u svrhu ispiranja zaostalih soli. Nakon centrifugiranja (10 min/10000 rpm/4 °C), supernatant je odliven, a epruveta s talogom je osušena u termobloku na 30 °C, kako bi sav etanol ispario. Izolirana RNA resuspendira se u 100 µL DEPC vode i uzorci se skladište na – 80 °C.

3.2.3.1. *Tretman RNA DNazom*

Na dobivenim uzorcima ukupne RNA proveden je tretman enzimom DNazom kako bi se uklonila genomska DNA koja se djelomično ekstrahira zajedno s RNA. Za tretman korišten je enzim RNase-free DNase I (New England Biolabs, SAD). Na temelju masenih koncentracija RNA određenih Nanodrop spektrofotometrom nakon izolacije izračunat je potreban volumen za reakcijsku smjesu tako da u toj smjesi bude oko 10 µg nepročišćene RNA. U reakcijsku smjesu se zatim doda 10 µL pufera za DNazu I i 1 µL DNaze I. Dodatkom DEPC vode konačni volumen reakcijske smjese iznosi 100 µL. Reakcijske smjese inkubirane su 10 minuta na 37 °C, zatim je proveden još jedan korak fenolizacije dodavanjem jednakog volumena otopine fenol/kloroform/IAA (pH 6,7). U izdvojenu vodenu fazu dodaje se natrijev acetat do finalne 0,3 M koncentracije kao i 3 V 100 % etanola te se uzorci talože na – 80 °C. Talog RNA centrifugira se (10 min/10000 rpm/4 °C) i ispiri se s 80 % etanolom u svrhu ispiranja zaostalih soli. Nakon centrifugiranja (10 min/10000 rpm/4 °C), etanol se izdvaja pipetiranjem, a Eppendorf epruveta ostavlja se otvorena kako bi preostali etanol ispario. Izolirana RNA resuspendira se u 15 µL DEPC vode i skladišti na – 80 °C.

3.2.4. Određivanje koncentracije RNA

Koncentracija i čistoća ukupne RNA dobivene izolacijom iz stanica kvasca i pročišćene RNA uslijed tretmana DNazom I određena je pomoću NanoDrop spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Nakon mjerenja svakog uzorka treba provjeriti sljedeće parametre: omjer A_{260}/A_{230} i A_{260}/A_{280} za provjeru prisutnosti kontaminacija u obliku proteina, fenola i soli.

3.2.5. Agarozna RNA elektroforeza

Provjera integriteta RNA provodila se RNA elektroforezom. Korišten je 1 %-tni agarozni gel u koji je dodana boja StainINTM RED Nucleic Acid STAIN. Dodatkom ove boje nakon elektroforeze nije potrebno inkubirati gel u otopini etidij bromida čime se smanjuje mogućnost degradacije RNA molekula. Pripremljeni uzorci RNA pipetiraju se u jažice gela uronjenog u TAE pufer u kadici za elektroforezu te se elektroforeza provodi 1 sat pri naponu od 55 V uz hlađenje. Gel je vizualiziran pod UV svjetlom pomoću uređaja UVIDOC HD6.

3.2.6. Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

U svrhu analize ekspresije gena, proveden je proces reverzne transkripcije u kojem se sintetizira kodirajuća DNA (cDNA), katalizator reakcije je enzim reverzna transkriptaza, a lanac RNA služi kao kalup za sintezu. Ovom metodom izolirana RNA (1 µg) prevedena je u cDNA, a reakcija se provodi u PCR termobloku. Korištena je ekvimolarna smjesa specifičnih početnica, pri čemu je finalna koncentracija svake u reakcijskoj smjesi bila 0,1 µM. Za umnažanje mRNA *RRP6* korištena je nizvodna (engl. *reverse*) početnica koja umnaža samo *sense* lanac cDNA, odnosno izbjegava se eventualno umnažanje *antisense* RNA transkribirane s tog lokusa, a za umnažanje *housekeeping* transkripata korištene su odgovarajuće *reverse* početnice. Aktinomicin D dodaje se u reakcijsku smjesu kako bi se spriječilo nespecifično umnažanje *antisense* transkripata, odnosno sinteza drugog lanca cDNA. Za RT je korišten High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD). Prema dobivenim masenim koncentracijama RNA nakon DNaznog tretmana uzeto je 1 µg RNA i stavljeno u mikroepruvetu za PCR, te je prema potrebi dodana DEPC voda tako da ukupan volumen bude 10 µL. Pripremljena je smjesa za reverznu transkripciju. Sastav smjese za reverznu transkripciju prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Prikaz sastava smjese za reverznu transkripciju (RT)

Komponenta smjese za RT	V [µL]
10x pufer za reverznu transkriptazu	2
25x smjesa dNTP-ova (100 mM)	0,8
Ekvimolarna smjesa specifičnih početnica	1,6
MultiScribe TM reverzna transkriptaza	1
Aktinomicin D (50 µg/ml)	2
DEPC voda	2,6

U smjese za reverznu transkripciju dodano je 10 μL pripremljene otopine RNA različitih uzoraka te je sve dobro promiješano pipetom. Uzorci su kratko centrifugirani i reakcija se provodi u PCR termobloku. Program reverzne transkripcije prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Program za reverznu transkripciju

Parametri	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	25	37	85	4
Vrijeme [min]	10	120	5	∞

Nakon završetka reverzne transkripcije uzorci su spremljeni na -80°C . Dobivena cDNA i početnice koje su specifične za *RRP6* te početnice specifične za 4 različite *housekeeping* endogene kontrole (*ACT1*, *CPS1*, *TAF10*, *SCR1*), analizirani su kvantitativnim PCR-om koristeći qPCR set kemikalija Maxima SYBR Green. Na mikrotitarskoj pločici za qPCR eksperimente pripremljene su reakcijske smjese s uzorcima cDNA, ukupnog volumena 10 μL s 2 tehničke paralele za svaki uzorak. Sastav jedinične reakcije je u tablici 8. Mikrotitarsku pločica kratko se *spinna* i zatim stavlja u uređaj za qPCR (Thermo Scientific™ PikoReal™ Real-Time PCR System). Pokrenut je program za kvantitativni PCR (tablica 9). Nakon početnog zagrijavanja na 95°C tijekom 10 minuta (aktivacija polimeraze), provedeno je 40 ciklusa amplifikacije s denaturacijom na 95°C tijekom 15 sekundi te vezanje početnica i elongacija na 60°C tijekom 1 minute. Nakon završetka programa dobiveni podaci su analizirani u programu Excel metodom $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Tablica 8. Prikaz sastava smjese za kvantitativni PCR (qPCR)

Komponenta	V [μL]
Maxima SYBR Green Master Mix	5
Uzvodna (fwd) početnica	0,5
Nizvodna (rev) početnica	0,5
DEPC voda	3
cDNA	1

Tablica 9. Program za kvantitativni PCR (qPCR)

Parametar	Korak 1	Korak 2	Korak 3
Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	95	95	60
Vrijeme	7''	15''	45''

40x

3.2.7. Izolacija ukupnih proteina iz stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Izolacija ukupnih proteina iz stanica kvasca provedena je prema Kushnirov, 2000. Izdvojen je volumen kulture koji je sadržavao 5 OD jedinica kvasca te je centrifugiran 5 min/3000 rpm. Talog stanica resuspendiran je u 200 μ L deH₂O, zatim je dodan isti volumen 0,2 M NaOH za lizu stanica i sve je preneseno u Eppendorf epruvetu u kojoj je inkubirano 5 min pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, otopina je centrifugirana 5 min/110000 rpm. Supernatant se odbacuje, a talog se resuspendira u 100 μ L Laemmli pufera (0,06 M Tris-HCl pH 6,8, 5 % glicerol, 2 % SDS, 2 % β -merkaptetanol, 0,0025 % bromfenolplavo). Uzorci se ponovno inkubiraju u termobloku 3 min pri 100 °C te potom centrifugiraju 1 min/11000 rpm. Proteinski ekstrakt (supernatant) izdvaja se u novu Eppendorf epruvetu i čuva pri – 20 °C do SDS elektroforeze i western blot analize.

3.2.7.1. Izolacija ukupnih proteina iz stanica kvasca *Schizosaccharomyces pombe*

Protokol za izolaciju proteina iz stanica kvasca *S. pombe* prilagođen je protokolu za izolaciju proteina iz stanica kvasca *S. cerevisiae*. Nakon izdvajanja 5 OD jedinica kvasca talog stanica resuspendira se u 300 μ L deH₂O i dodaje se 0,6 M NaOH, a inkubacija se odvija pri sobnoj temperaturi tijekom 10 min. Nakon koraka centrifugiranja i izdvajanja supernatanta, talog se resuspendira u 70 μ L modificiranog Laemmli pufera (0,06 M Tris-HCl pH 6,8, 5 % glicerol, 4 % SDS, 4 % β -merkaptetanol, 0,01 % bromfenolplavo). Ostali koraci jednaki su protokolu pod 3.2.7.

3.2.8. Kvantifikacija ukupnih proteina

Ukupni proteini stanica kvasca kvantificirani su komercijalnim setom kemikalija za određivanje koncentracije proteina „Pierce™ 660nm Protein Assay Kit“. Kolorimetrijska metoda bazira se na vezanju kompleksa boja-metal na protein u kiselim uvjetima što uzrokuje pomak maksimuma apsorpcije boje, koji se mjeri na 660 nm. Kompleks boja-metal crvenkasto-smeđe je boje i mijenja se u zelenu nakon vezanja proteina. Promjena boje nastaje deprotonacijom boje pri niskom pH potpomognutom interakcijama s pozitivno nabijenim skupinama aminokiselina u proteinima. Zbog toga boja uglavnom stupa u interakciju s bazičnim ostacima u proteinima, kao što su histidin, arginin i lizin te u manjoj mjeri s tirozinom, triptofanom i fenilalaninom. U Eppendorf epruveti pripremi se otopina s 45 μ L Laemmli pufera, 5 μ L uzorka i 750 μ L reagensa za određivanje koncentracije proteina. Slijepa proba sadržavala je iste sastojke izuzev proteinskog ekstrakta. Otopine se vorteksiraju i premjeste u usku kivetu. Nakon inkubacije od 5 min mjeri se apsorbanacija uzoraka i slijepe probe na 660 nm. Na temelju standardne krivulje, izrađene prema

razrjeđenjima poznatih koncentracija albumina iz seruma goveda (engl. *Bovine serum albumine*, BSA), izračunaju se nepoznate koncentracije proteinskih uzoraka.

3.2.9. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza

SDS-PAGE (engl. *Sodium dodecyl sulphate polyacryl gel electrophoresis*) ili SDS poliakrilamidna gel elektroforeza metoda je kojom se u električnom polju razdvajaju proteini na osnovu razlike u masi. U poliakrilamidni gel dodaje se deterdžent SDS (engl. *Sodium dodecyl sulphate*) te se SDS u konstantnom masenom omjeru vežu na proteine, što maskira naboj proteina i doprinosi ukupnom negativnom naboju molekule. Na taj način, svi proteini u uzorku imaju jednak omjer mase i naboja. SDS-PAGE najčešće je korištena elektroforetska tehnika za analizu proteina, prvenstveno zahvaljujući sposobnosti SDS-a da u prisutnosti reagensa za razaranje disulfidnih veza, denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance. U ovom radu korištena je diskontinuirana SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza, za koju su pripremljena dva gela, gela za sabijanje i gela za razdvajanje. Gornji, 4,5 %-tni gel za sabijanje i donji, 10 %-tni gel za razdvajanje međusobno se razlikuju u sastavu i pH. Gel za sabijanje je rjeđi i manjeg pH (pH=6,8) te služi za poravnavanje uzoraka, dok je gel za razdvajanje gušći, većeg pH (pH=8,8) i služi za razdvajanje proteina na temelju razlika u molekulskim masama. Za izradu oba gela korištena su stakla za gel elektroforezu s razmaknicom od 1 mm ili 0,75 mm. Između stakla umetnuta na nosače prvo se ulije gel za razdvajanje te nakon njegove polimerizacije dodaje se gel za sabijanje i postavlja češljic za 10 jažica. Nakon polimerizacije, češljic se izvadi i nanosi se 10 µg ukupnih staničnih proteina skupa s Laemmli puferom u kojem su bili ekstrahirani. Laemmli pufer sadrži boju bromfenolplavo koja omogućuje vizualizaciju uzoraka i njihovo praćenje za vrijeme putovanja kroz gel tijekom elektroforeze. Kadica za SDS-elektroforezu Mini-PROTEAN (Biorad) napuni se s puferom za elektroforezu. U jažice je nanešeno 2,5 µL Precision Plus Protein Standarda te je kadica spojena na uređaj za napajanje. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 180 V i jakosti struje 380 mA oko 1 h.

3.2.10. Western blot analiza

Western blot je imunokemijska metoda u kojoj se proteini elektroforetski razdvojeni na gelu prenose na nitroceluloznu membranu. Membrana se blokira, a potom tretira s primarnim antitijelom, sekundarnim antitijelom s vezanim enzimom te se dodaje supstrat koji omogućava vizualizaciju. Nakon SDS elektroforeze, proteini iz gela prenešeni su na nitroceluloznu membranu te je korištena tzv. tehnika mokrog prijenosa, pri kojoj proteini iz gela izlaze u pufer za prijenos i vežu se na površinu membrane, gdje su lako dostupni za interakcije sa specifičnim monoklonskim

ili poliklonskim antitijelima. Prijenos proteina odvijao se u sustavu za transfer (Bio-Rad, SAD) ispunjenim puferom za transfer (25 mM Tris, 192 mM glicin pH 8,3, 20 % metanol). Sustav za prijenos proteina spojen je na izvor napajanja pod uvjetima stalne jakosti struje od 90 V tijekom 1,5 h. Nakon prijenosa, membrane određenih uzoraka inkubirane su u otopini boje Ponceau S (0,1 % Ponceau S u 5 %-tnoj očetnoj kiselini) za detekciju proteinskih vrpca nakon prijenosa na membranu, a membrana je potom odbojana deioniziranom vodom. Zatim slijedi inkubacija membrane 1 h u 10 mL pufera za blokiranje (5 % obrano mlijeko u TBST puferu). Potom se membrana inkubira preko noći u otopini primarnog antitijela i TBST pufera. Primarna i sekundarna antitijela razrijeđena su u 1x TBST puferu na željenu koncentraciju te se primarno antitijelo nanosi na membranu, tako da prekrije površinu membrane. Inkubacija se odvija pri sobnoj temperaturi tijekom 1 h uz protresanje, a zatim pri 4 °C preko noći bez protresanja. Membrana se ispiri tri puta po 5 min u 1x TBST puferu kako bi se uklonila nevezana primarna antitijela. Membrane su zatim inkubirane u otopini sa sekundarnim antitijelom s vezanom peroksidazom iz hrena 1 h pri sobnoj temperaturi uz protresanje. Nakon inkubacije membrana se ispiri tri puta po 5 min TBST puferom i inkubira u otopinama Clarity Western ECL Blotting Substrate (Biorad). Standardi na membranama označeni su WesternSure olovkom. Membrana je vizualizirana pomoću uređaja C-Digit Blot Scanner (LI - COR), a kvantifikacija proteinskih vrpca napravljena je programom GelAnalyzer.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Eukariotski RNA egzozom sudjeluje u dinamičnoj posttranskripcijskoj regulaciji ključnoj za uspostavljanje i održavanje staničnog transkriptoma (Fraga De Andrade i sur., 2020). Rrp6 jedna je od dvije katalitičke podjedinice RNA egzozoma koja svojom 3'-5' egzoribonukleaznom aktivnošću selektivno procesira i razgrađuje RNA supstrate, čime izravno utječe na razine različitih klasa RNA u stanici (Sloan i sur., 2012). Sukladno tome, nedostatak proteina Rrp6 uzrokuje defekte u procesiranju RNA. Slično, narušavanje homeostaze metabolizma nukleinskih kiselina očituje se uslijed djelovanja antimetabolita 5-fluorouracila. Učinci 5-FU na staničnu DNA uglavnom su poznati i većina terapeutika na bazi 5-FU temelji se na inhibiciji biosinteze pirimidina i enzima timidilat sintaze (Longley i sur., 2003). Međutim, citotoksičnosti nukleoizidnog analoga 5-FU posreduje i njegovo ugrađivanje u staničnu RNA. Osim negativnog učinka na sazrijevanje rRNA, 5-FU inhibira posttranskripcijsku modifikaciju tRNA, snRNA te *splicing* mRNA (Zhao i Yu, 2007; Ghoshal i Jacob, 1997; Santi i Hardy, 1987).

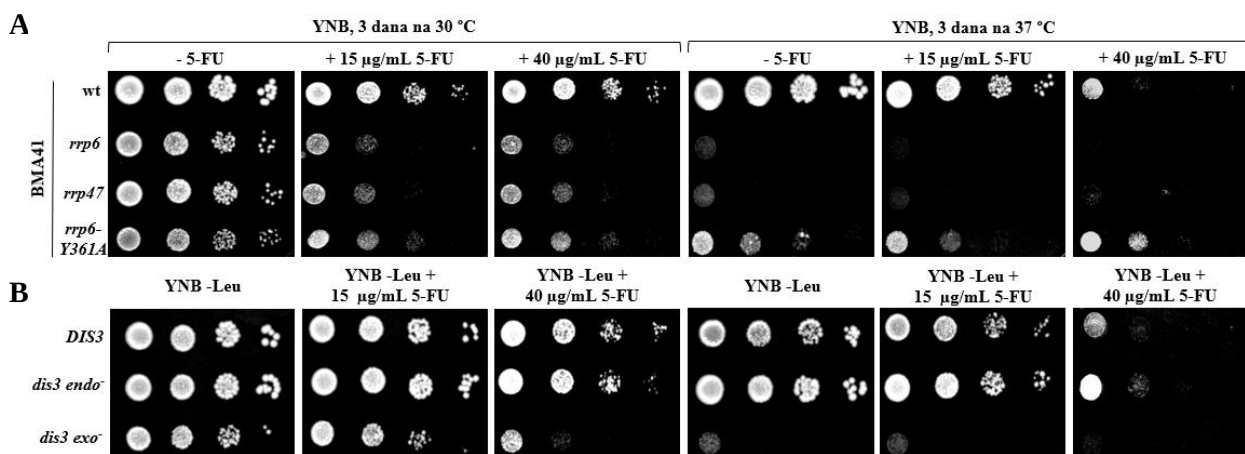
DNA *microarray* analiza transkriptoma kvasca provedena sa stanicama tretiranim 5-FU otkrila je nakupljanje poliadeniliranih pre-rRNA (Kuai i sur., 2004; Fang i sur., 2004). Ovaj učinak bio je izraženiji u heterozigotnom soju *RRP6+ /rrp6-*, koji je pokazao najviši stupanj osjetljivosti na 5-FU prilikom *screeninga* provedenog na razini cijelog genoma. Daljnja istraživanja predložila su model djelovanja 5-FU na Rrp6. Ugradnja 5-FU u RNA interferira s posttranskripcijskim modifikacijama, što dovodi do stvaranja aberantnih vrsta RNA koje su manje podložne djelovanju egzoribonukleazne aktivnosti Rrp6. Također, stanice kvasca kojima nedostaje *RRP6* pojačano su osjetljive na 5-FU, a restriktivna temperatura pojačava citotoksični učinak ovog antimetabolita (Xie i sur., 2019; Hoskins i Butler, 2007). Ljudski i kvašćev egzozom evolucijski su očuvani pa nedostatak EXOSC10 također uzrokuje staničnu osjetljivost uslijed tretmana 5-FU, čak i u prisustvu cjelovite jezgre egzozoma i druge katalitičke podjedinice DIS3 (Kammler i sur., 2008). Kako bi se dodatno istražilo međudjelovanje ove ribonukleaze i antitumorskog lijeka 5-FU, cilj ovog rada bio je ispitati povezanost između djelovanja 5-FU i razine ekspresije Rrp6 te ustanoviti je li opisani efekt djelovanja 5-FU specifičan za Rrp6 ili su i druge podjedinice RNA egzozoma te njegovi kofaktori potrebni za rast i otpornost stanica kvasca u prisutnosti 5-FU. Istraživanje je provedeno sa stanicama dva eukariotska jednostanična organizma, kvascima *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, koji se standardno koriste kao modelni organizmi za istraživanje strukture i funkcije RNA egzozoma.

4.1. POVEZANOST DJELOVANJA ANTITUMORSKOG LIJEKA 5-FLUOROURACILA I RAZINE EKSPRESIJE EGZORIBONUKLEASE Rrp6 U KVASCU *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.1. Stanice mutanata za katalitičke podjedinice i kofaktore RNA egzosoma pokazuju osjetljivost na tretman 5-fluorouracilom

Poznato je da delecija gena *RRP6* pojačava citotoksični učinak 5-FU u stanicama kvasca (Hoskins i Butler, 2007). Citotoksični učinak uslijed djelovanja 5-FU izraženiji je kod mutanata *rrp6* iz različitih linija sojeva kvasca prilikom rasta na povišenoj temperaturi (Lum i sur., 2004; Gustavsson i Ronne, 2008). To sugerira da Rrp6 ima direktnu ulogu u staničnom odgovoru na djelovanje 5-FU. Međutim, trenutno je slabo istraženo jesu li i druge podjedinice i kofaktori egzosoma uključeni u otpornost na 5-FU. Različiti sojevi kvasca *S. cerevisiae* podvrgnuti su *in vivo* fenotipskoj analizi - testu rasta (engl. *plate assay*). Test rasta semi-kvantitativna je metoda koja omogućuje identifikaciju stanica koje se ne mogu dijeliti pri određenim uvjetima. Metoda se zasniva na uspoređivanju rasta mutanata s kontrolnim stanicama divljeg tipa. Rast stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* divljeg tipa (wild type, wt) iz linije sojeva BMA41 te izogenih mutanata *rrp6*, *rrp47* i *rrp6-Y361A* ispitan je na YNB podlozi sa i bez 15 ili 40 µg/mL 5-FU prilikom uzgoja na 30 °C i 37 °C tijekom 3 dana (vidi Materijale i metode). U stanicama mutanta *rrp6* deletiran je cijeli gen *RRP6*, dok je u stanicama mutanta *rrp6-Y361A* u gen *RRP6* uvedena točkasta mutacija koja dovodi do inaktivacije katalitičke aktivnosti proteina Rrp6 (Stuparevic i sur., 2013). U stanicama mutanta *rrp47* deletiran je gen *RRP47* koji kodira za stabilizacijski kofaktor egzoribonukleazne podjedinice Rrp6, protein Rrp47. Eksperimenti na slici 9 provedeni su pri dvije koncentracije 5-FU kako bi se omogućilo detektiranje povećane osjetljivosti na 5-FU na 37 °C, a koncentracije su odabrane i prilagođene prema radu Gustavsson i Ronne, 2008. Nakon 3 dana nije vidljiva razlika u rastu između stanica sojeva linije sojeva BMA41 prilikom uzgoja na 30 °C bez dodatka 5-FU (slika 9A). Međutim, uslijed rasta na podlogama s 15 ili 40 µg/mL 5-FU na 30 °C može se uočiti defekt u rastu stanica mutanta *rrp6* u usporedbi s divljim tipom, što potvrđuje prethodno opisanu osjetljivost tog mutanta (Hoskins i Butler, 2007). Sličan rezultat može se uočiti u rastu mutanta *rrp47*, što je u skladu s očekivanim obzirom da Rrp47 stabilizira podjedinicu egzosoma Rrp6 (Garland i sur., 2013; Stuparevic i sur., 2013). U slučaju mutanta *rrp6-Y361A* isto se može primijetiti osjetljivost stanica na 5-FU, čime je potvrđeno da je katalitička aktivnost Rrp6 potrebna za otpornost stanica na 5-FU (Fang i sur., 2004). Nadalje, nakon uzgoja na 37 °C bez dodatka 5-FU uočljiv je defekt u rastu mutanata *rrp6* i *rrp47*, čime je pokazana prethodno opisana temperaturna osjetljivost tih mutanata (vidi poglavlje 2.2.1.). Stanice divljeg tipa pri istim uvjetima pokazuju normalan rast, dok je temperaturno osjetljivi fenotip očekivano slabo izražen u slučaju mutanta *rrp6-Y361A*. Dodatkom 15 µg/mL 5-FU, nakon trodnevne inkubacije na 37 °C može se

uočiti da je osjetljivost mutanata *rrp6* i *rrp47* izraženija na povišenoj temperaturi u odnosu na stanice divljeg tipa. Uzgoj u podlogama s višom koncentracijom 5-FU, 40 µg/mL, pri istoj temperaturi, u potpunosti je inhibirao rast spomenutih mutanata, no blaži sintetski fenotip pri ovim uvjetima vidljiv je i u rastu divljeg tipa. Obzirom da mutant *rrp6-Y361A* pokazuje znatno slabiji temperaturno-osjetljivi fenotip prilikom rasta na povišenoj temperaturi, može se primijetiti da dodatak 5-FU usporava rast stanica tog mutanta u usporedbi s divljim tipom, ali ne u tolikoj mjeri kao kod mutanata *rrp6* i *rrp47* (slika 9A).



Slika 9. Osjetljivost stanica kvasca analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa te izogenih mutanata *rrp6* i *rrp6-Y361A* linije sojeva BMA41 uzgojene su u YNB podlozi do logaritamske faze rasta na 30 °C te četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja takve kulture naciepljena su na krutu YNB hranjivu podlogu na 30 °C i 37 °C. Pri obje temperature u medij je dodan 5-FU u koncentracijama od 15 ili 40 µg/mL (A). Vijabilnost sojeva *DIS3*, *dis3 endo⁻*, *dis3 exo⁻* ispitana je u YNB –Leu podlozi na isti način kao i kod linije sojeva BMA41 (B). Podloge s kolonijama fotografirane su nakon 3 dana rasta.

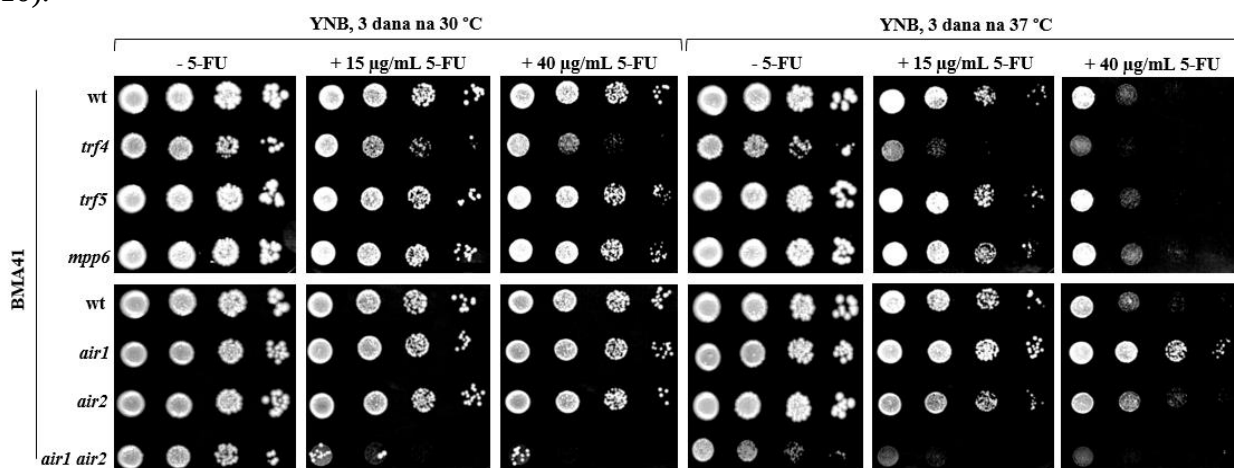
Za razliku od gena *RRP6* i *RRP47*, gen *DIS3* koji kodira za drugu katalitičku podjedinicu RNA egzosoma je esencijalan. Stoga, delecija ovog gena nije moguća, zbog čega je provedeno istraživanje s mutantima kod kojih su inaktivirane katalitičke aktivnosti proteina Dis3. U tu svrhu korišteni su prethodno konstruirani sojevi kojima je u genomu deletiran gen *DIS3*, a na centromernom plazmidu prisutna je funkcionalna kopija gena *DIS3* (ekvivalentne stanicama divljeg tipa, *DIS3*) ili inačica gena *DIS3* u koju je uvedena točkasta mutacija koja inaktivira endoribonukleaznu (stanice *dis3 endo⁻*, odnosno *dis3-D171N*), odnosno egzoribonukleaznu (stanice *dis3 exo⁻*, *dis3-D551N*) aktivnost proteina Dis3 (Stuparevic i sur., 2013). Kako bi se osigurala selekcija stanica s plazmidom, na plazmidu se nalazi marker gen *LEU2* te su stanice tijekom svih eksperimenata uzgajane u YNB podlozi koja ne sadrži aminokiselinu leucin. Rast i

vijabilnost stanica *DIS3* i izogenih katalitičkih mutanata *dis3 endo⁻* i *dis3 exo⁻* ispitan je testom rasta na isti način kao što je prethodno opisano. Nakon tri dana uzgoja pri 30 °C na kontrolnim hranjivim podlogama bez dodatka 5-FU nije bilo razlike u fenotipu sojeva. No, rastom na 30 °C na podlozi s dodatkom 15 µg/mL 5-FU uočljiv je slabiji rast stanica *dis3 exo⁻*, a dodatkom 40 µg/mL 5-FU rast je skoro u potpunosti izostao (slika 9B). To potvrđuje da je i druga katalitička podjedinica RNA egzosoma, odnosno njena egzoribonukleazna aktivnost, potrebna za rast stanica u prisustvu 5-FU, čime se isključuje da je samo Rrp6 uključen u otpornost na djelovanje 5-FU. Za razliku od toga, stanice mutanta *dis3 endo⁻* rastu vrlo slično kao stanice divljeg tipa pri istim uvjetima uzgoja, iz čega proizlazi da endonukleazna aktivnost Dis3 nije uključena u staničnu otpornost na djelovanje 5-FU. Katalitičkog mutanta za egzoribonukleaznu aktivnost Dis3 karakterizira temperaturna osjetljivost (Milbury i sur., 2019). Uslijed uzgoja na 37 °C na podlozi bez dodatka 5-FU uočljiv je slabiji rast stanica *dis3 exo⁻*, u odnosu na stanice divljeg tipa i *dis3 endo⁻*. Kod uzgoja tijekom 3 dana na 37 °C i već uz 15 µg/mL 5-FU primijećen je potpuni gubitak vijabilnosti mutanta *dis3 exo⁻* za razliku od stanica *DIS3* i mutanata *dis3 endo⁻*. Prilikom uzgoja stanica u podlogama s višom koncentracijom (40 µg/mL) 5-FU, defekt u rastu može se primijetiti čak i kod stanica *DIS3* i mutanta *dis3 endo⁻* što potvrđuje da visoka koncentracija 5-FU i restriktivna temperatura imaju sinergistički efekt na rast stanica (slika 9B).

Istraživanje Fang i sur., 2004 prvi put je pokazalo ulogu RNA egzosoma u otpornosti na 5-FU. Rezultati ovog rada (slika 9A) u skladu su s navedenim istraživanjem, budući da je pokazana primjetna osjetljivost stanica mutanata *rrp6*, *rrp47* i *rrp6-Y361A* na djelovanje 5-FU. U tom istraživanju je ustanovljena i osjetljivost mutanata za neke od podjedinica jezgre egzosoma na 5-FU, no ona nije bila toliko izražena, potencijalno zato što je eksperimentalna strategija uključivala heterozigotne stanice kvasca s jednom funkcionalnom kopijom gena. Također, recentnim istraživanjem ispitani su različiti fenotipovi katalitičkih mutanata Dis3 te nije ustanovljeno da su osjetljivi na djelovanje 5-FU (Milbury i sur., 2019). Razlog tome može biti što je u spomenutom istraživanju korištena puno slabija koncentracija 5-FU, za razliku od koncentracija ispitanih u ovom radu kod kojih je uočljiva izrazita osjetljivost mutanta *dis3 exo⁻* (slika 9B). Zaključno, obje katalitičke podjediniice RNA egzosoma, Rrp6 i Dis3, uključene su u otpornost stanica kvasca *S. cerevisiae* na antitumorski lijek 5-FU te su pri tome ključne njihove egzoribonukleazne aktivnosti.

RNA egzosom za svoju aktivnost zahtjeva kofaktore. TRAMP kompleks i protein Mpp6, uz Rrp47, kofaktori su nuklearne izoforme egzosoma. TRAMP kompleks je multiproteinski kompleks uključen u prepoznavanje i procesiranje 3'-kraja različitih RNA supstrata. U *S. cerevisiae*, kompleks se sastoji od podjedinica Trf4 ili Trf5, Air1 ili Air2, i Mtr4 koje poli(A) polimeraznom, RNA-vezujućom i helikaznom aktivnošću posreduju u aktivaciji egzosoma prilikom prepoznavanja supstrata. Protein Mpp6 asocira se s jezgrom egzosoma i time omogućuje

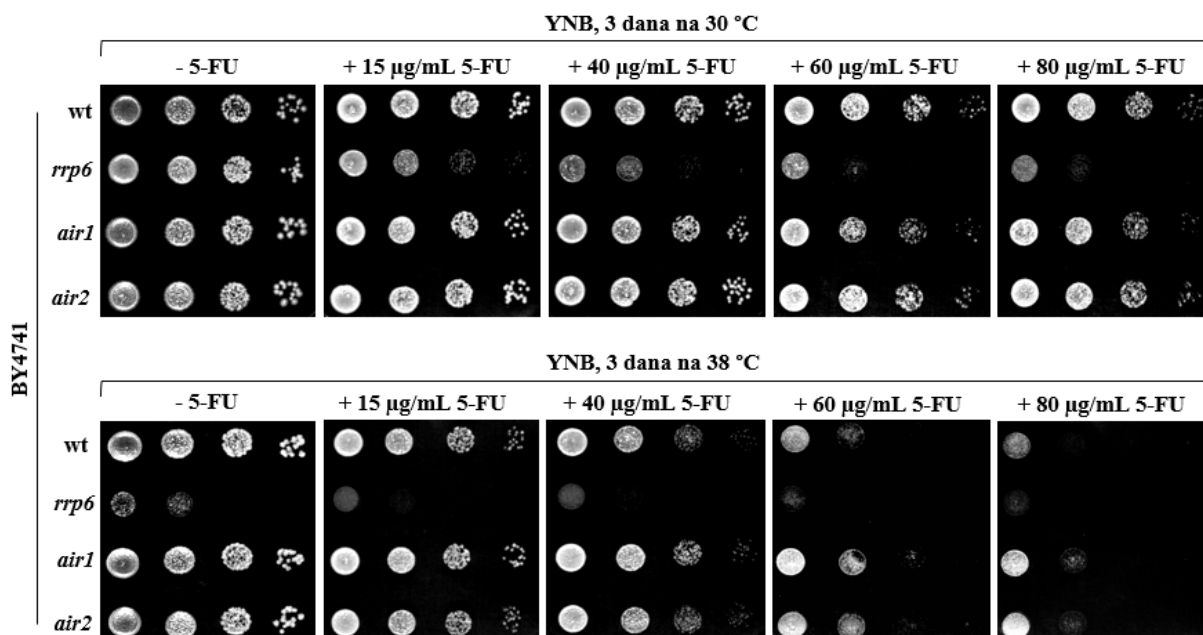
privlačenje helikaze Mtr4. Testom rasta ispitana je uključenost kofaktora nuklearnog egzosoma u odgovor na djelovanje 5-FU. Eksperimentalna izvedba ista je kao što je prethodno opisano u poglavlju 3.2.1. Rezultati su pokazali da prilikom trodnevnog uzgoja na 30 °C bez 5-FU svi sojevi pokazuju normalan rast (slika 10). Dodatkom 15 µg/mL 5-FU najizraženiji defekt u rastu bio je kod mutanata *trf4* i *air1 air2* u odnosu na ostale sojeve koji su normalno rasli pri opisanim uvjetima uzgoja. Povećanjem koncentracije 5-FU na 40 µg/mL kod mutanta *trf4* defekt u rastu je još izraženiji, a rast dvostrukog mutanta *air1 air2* skoro je u potpunosti inhibiran, tj., stanice su iznimno osjetljive. Povećanje koncentracija 5-FU ne djeluje inhibitorno na ostale ispitane sojeve pri temperaturi od 30 °C (slika 10). Dobiveni rezultati indiciraju da je prisutnost poli(A) polimeraze Trf4 nužna za otpornost stanica na 5-FU, kao i prisutnost barem jednog od Air proteina, jer izostanak oba rezultira letalnim fenotipom prilikom tretmana 5-FU. Nakon uzgoja sojeva na povišenoj temperaturi od 37 °C, vidljiv je defekt u rastu dvostrukog mutanta *air1 air2* koji pokazuje temperaturno osjetljivi fenotip (Novačić i sur., 2021a). Temperatura od 37 °C i dodatak 15 µg/mL 5-FU inhibitorni su uvjeti za rast mutanata *trf4* i *air1 air2*, a kod ostalih sojeva može se primijetiti blagi efekt sporijeg rasta u odnosu na rast bez 5-FU pri istoj temperaturi. Tijekom tri dana inkubacije na 37 °C uz dodatak 40 µg/mL 5-FU može se uočiti značajna inhibicija rasta većine ispitanih sojeva mutanata te stanica divljeg tipa. Zanimljiv rezultat dobiven je u slučaju mutanta *air1*. Stanice tog mutanta pokazale su povećanu otpornost u odnosu na stanice divljeg tipa prilikom korištenja veće koncentracije 5-FU i tijekom uzgoja na restriktivnoj temperaturi (slika 10).



Slika 10. Osjetljivost stanica kvasca analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa te izogenih mutanata *trf4*, *trf5*, *mpp6*, *air1*, *air2* te dvostrukog mutanta *air1 air2* iz linije sojeva BMA41 uzgojene su u YNB podlozi do logaritamske faze rasta na 30 °C te četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena su na krutu YNB podlogu na 30 °C i 37 °C. Pri obje temperature u medij je dodan 5-FU u koncentracijama od 15 ili 40 µg/mL. Podloge s kolonijama fotografirane su nakon 3 dana rasta.

4.1.1.2. Tretman 5-fluorouracilom utječe na ekspresiju proteina *Air2*

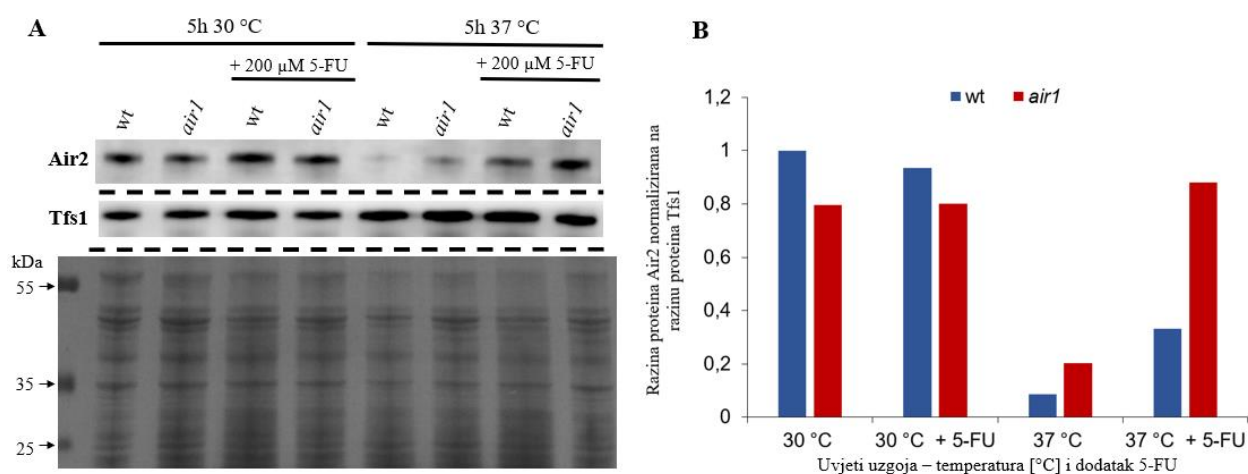
Budući da je rezultat testa rasta (slika 10) pokazao zanimljiv efekt kod mutanta *air1*, bilo je potrebno provjeriti je li takav efekt specifičan za liniju sojeva BMA41 ili se isti rezultat može detektirati i u drugoj liniji sojeva. Proveden je test rasta u liniji sojeva BY4741 prema prethodno opisanom protokolu u poglavlju 3.2.1. Stanice divljeg tipa, mutanata *rrp6*, *air1* i *air2* uzgojene su na YNB podlozi sa i bez 5-FU, na 30 i 38 °C. Osim prethodno ispitanih koncentracija 5-FU (15 i 40 µg/mL), ispitan je rast pri višim koncentracije od 60 i 80 µg/mL te rast pri 38 °C jer je poznato da je linija sojeva BY4741 manje temperaturno osjetljiva od linije sojeva BMA41 (Novačić i sur., 2021b). Očekivano, nakon tri dana uzgoja na 30 °C nije vidljiva razlika u rastu između divljeg tipa i mutanata *rrp6*, *air1* i *air2* (slika 11). Kao i u liniji sojeva BMA41, dodatak 5-FU djelovao je inhibitorno jedino na rast mutanta *rrp6* na 30 °C. Ako se uspoređuje rast stanica pri 38 °C, jasno se može uočiti da mutant *rrp6* pokazuje temperaturnu osjetljivost, za razliku od ostalih sojeva, čije stanice rastu pri svim decimalnim razrjeđenjima. Pri temperaturi od 38 °C, dodatkom 5-FU može se uočiti da su stanice mutanata *air1* i *air2* podjednako ili manje osjetljive od stanica divljeg tipa, za razliku od drastične osjetljivosti mutanta *rrp6*. Najbitnije, rezultati testa rasta pri višim koncentracijama 5-FU i povišenoj temperaturi pokazali su da su stanice mutanata *air1* otpornije na 5-FU u odnosu na one divljeg tipa, što je najprimjetnije pri koncentracijama od 40 i 60 µg/mL (slika 11). Iako je ovaj efekt nešto slabije izražen u liniji sojeva BY4741 nego u liniji sojeva BMA41, potvrđuje prethodno pokazanu otpornost stanica mutanta *air1* na 5-FU pri povišenoj temperaturi, čime je pokazano da ovaj efekt nije specifičan za liniju sojeva.



Slika 11. Vijabilnost stanica kvasca analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa te izogenih mutanata *rrp6*, *air1*, *air2* iz linije sojeva BY4741 uzgojene su u YNB podlozi do logaritamske faze rasta na 30 °C te četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena su na krute YNB podloge na 30 °C i 37 °C. Pri obje temperature u medij je dodan 5-FU u koncentracijama od 15, 40, 60 ili 80 µg/mL. Podloge s kolonijama fotografirane su nakon 3 dana rasta.

Testovima rasta utvrđeno je da osim proteina Rrp6, Trf4 i egzoribonukleazne aktivnosti Dis3, Air proteini sudjeluju u otpornosti stanica na 5-FU. *AIR1* i *AIR2* paralogni su geni, te njihovi proteinski produkti imaju redundantne uloge. Generalno, za paralogne gene pokazano je da se u stanicama deletanta za jedan paralog često pojačava razina ekspresije drugog paraloga (DeLuna i sur., 2010; Kafri i sur., 2006). Budući da se otpornost stanica na 5-FU javlja u nedostatku proteina Air1, a dodatni nedostatak proteina Air2 u stanicama dvostrukog mutanta uzrokuje pojačanu osjetljivost (slika 10), moguće je da u stanicama mutanta *air1* dolazi do prekomjerne ekspresije proteina Air2, na čemu bi se mogla temeljiti navedena otpornost. Sukladno tome, sljedeći korak bio je dobiti uvid u razinu ekspresije proteina Air2 u stanicama mutanta *air1* koje su tretirane 5-FU. Stanice divljeg tipa i mutanta *air1* linije sojeva BMA41 uzgojene su u tekućoj podlozi na 30 i 37 °C bez i u prisutnosti 200 µM 5-FU. Uzorci kultura uzorkovani su nakon 5 sati uzgoja i zatim je provedena izolacija ukupnih staničnih proteina prema protokolu Kushnirov, 2000 opisanom u poglavlju 3.2.7. Proteinski ekstrakti podvrgnuti su imunokemijskoj analizi metodom western blot. Za semi-kvantitativnu detekciju proteina od interesa Air2 korišteno je anti-Air2 poliklonsko antitijelo. Također, u svim uzorcima korišteno je anti-Tfs1 antitijelo na osnovi čijeg signala je normalizirana razina ekspresije proteina Air2. Konstitutivno eksprimirani gen *TFS1* kodira fosfolipid-vezujući protein koji sudjeluje u regulaciji signalnog puta protein kinaze A (PKA), kao

i inhibiciji vakuolarne proteaze CPY (karboksipeptidaza Y). Također, membrana je nakon transfera obojana bojom Ponceau S, koja nespecifično veže sve proteine kako bi se dodatno potvrdilo da je nanosena jednaka količina svih ekstrakata, budući da su rezultati pokazali da pri povišenoj temperaturi dolazi do nešto više razine ekspresije kontrolnog proteina Tfs1. Na slici 12A rezultat western blot analize demonstrira da pri uzgoju stanica na 30 °C tretman s 200 μM 5-FU u trajanju od 5 sati ne utječe na razinu proteina Air2, odnosno da je ona podjednaka u stanicama divljeg tipa i mutanta *air1*. S druge strane, u stanicama divljeg tipa pri 37 °C može se detektirati značajan pad razine proteina Air2, koji je nešto slabiji ako se stanice tretiraju s 5-FU pri tim uvjetima, međutim razina ostaje i dalje značajno manja nego u stanicama uzgojenim na 30 °C. Pri uzgoju na 37 °C, razina proteina Air2 neznatno je veća u stanicama mutanta *air1* u odnosu na stanice divljeg tipa. Nasuprot tome, u stanicama mutanta *air1* razina Air2 proteina u uvjetima uzgoja s dodatkom 5-FU na 37 °C značajno je viša od one u stanicama divljeg tipa pri istim uvjetima, štoviše podjednaka je kao u stanicama divljeg tipa i mutanta *air1* pri 30 °C. Ovaj rezultat potvrđuje pretpostavku da se paralog Air2 pojačano eksprimira u stanicama mutanta *air1* pri uvjetima u kojima ove stanice pokazuju otpornost, odnosno uvjetima tretmana s 5-FU pri povišenoj temperaturi.



Slika 12. Razina ekspresije proteina Air2 i kvantifikacija dobivenog signala. Semi-kvantitativna analiza proteina Air2 i Tfs1 metodom western blot. Prikazana je ista membrana vizualizirana bojanjem s Ponceau S (dolje) i kemiluminiscencijom (gore) (**A**). Vrijednosti razine proteina Air2 normalizirane su na Tfs1 kvantifikacijom u programu GelAnalyzer i izražene u odnosu na razinu proteina u stanicama divljeg tipa na 30 °C (**B**).

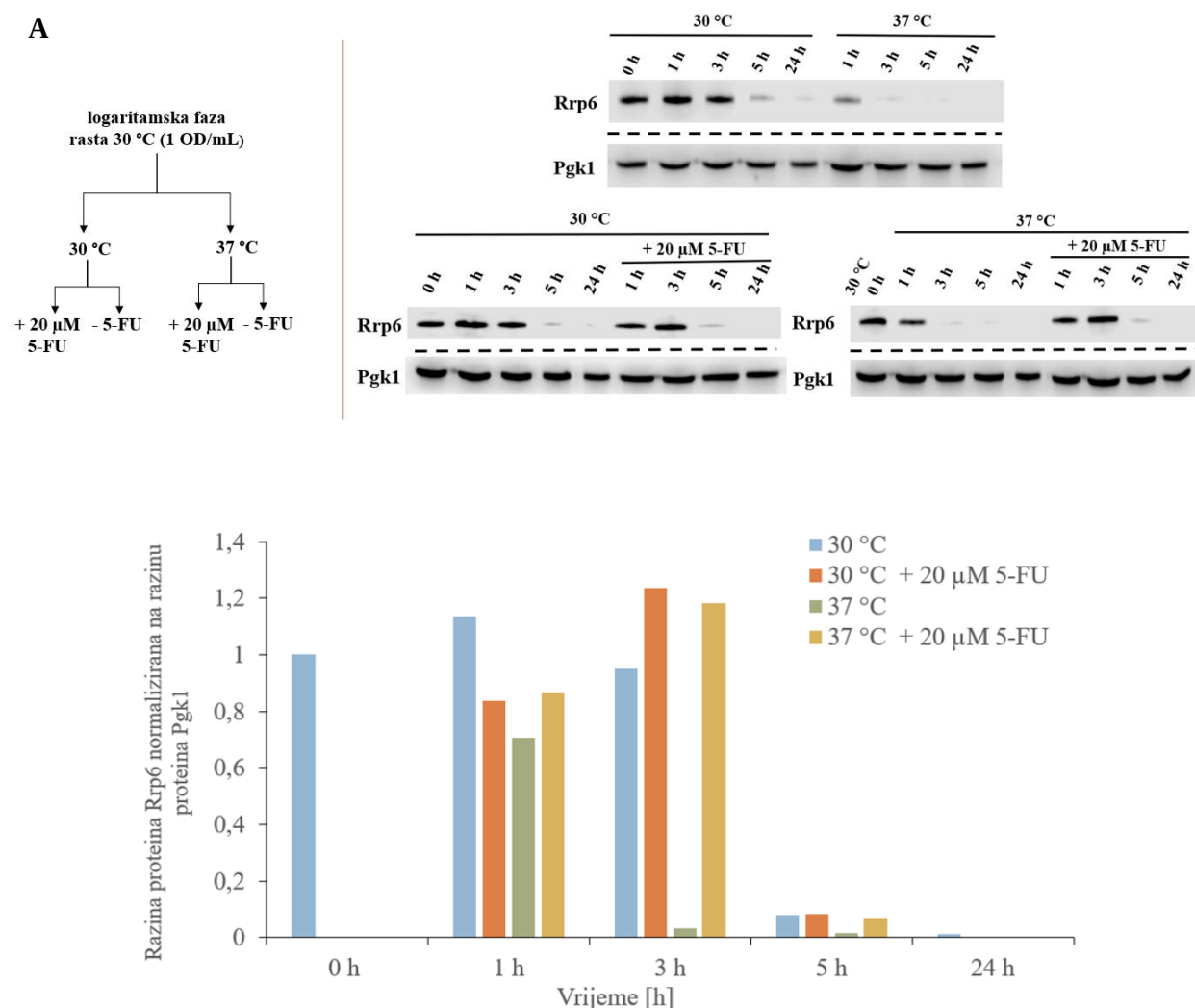
U radu autora Schmidt i sur., 2012 također je ispitano dolazi li u fiziološkim uvjetima od 30 °C do pojačane ekspresije jednog Air proteina uslijed delecije paralognog gena, pri čemu, kao i u ovom radu, nije uočena razlika. No, u ovom je radu pokazano da prilikom uzgoja pri povišenoj

temperaturi i u prisustvu 5-FU dolazi do prekomjerne ekspresije proteina Air2 u stanicama mutanta *air1* u odnosu na stanice divljeg tipa (slika 12). Ovaj rezultat može se objasniti u kontekstu prethodno ustanovljenog fenomena da se kompenzacijski efekt u ekspresiji jednog paraloga uslijed delecije drugog može preferencijalno dogoditi primarno u uvjetima u kojima je njihova funkcija izrazito potrebna, na primjer u stresnim uvjetima (DeLuna i sur., 2010).

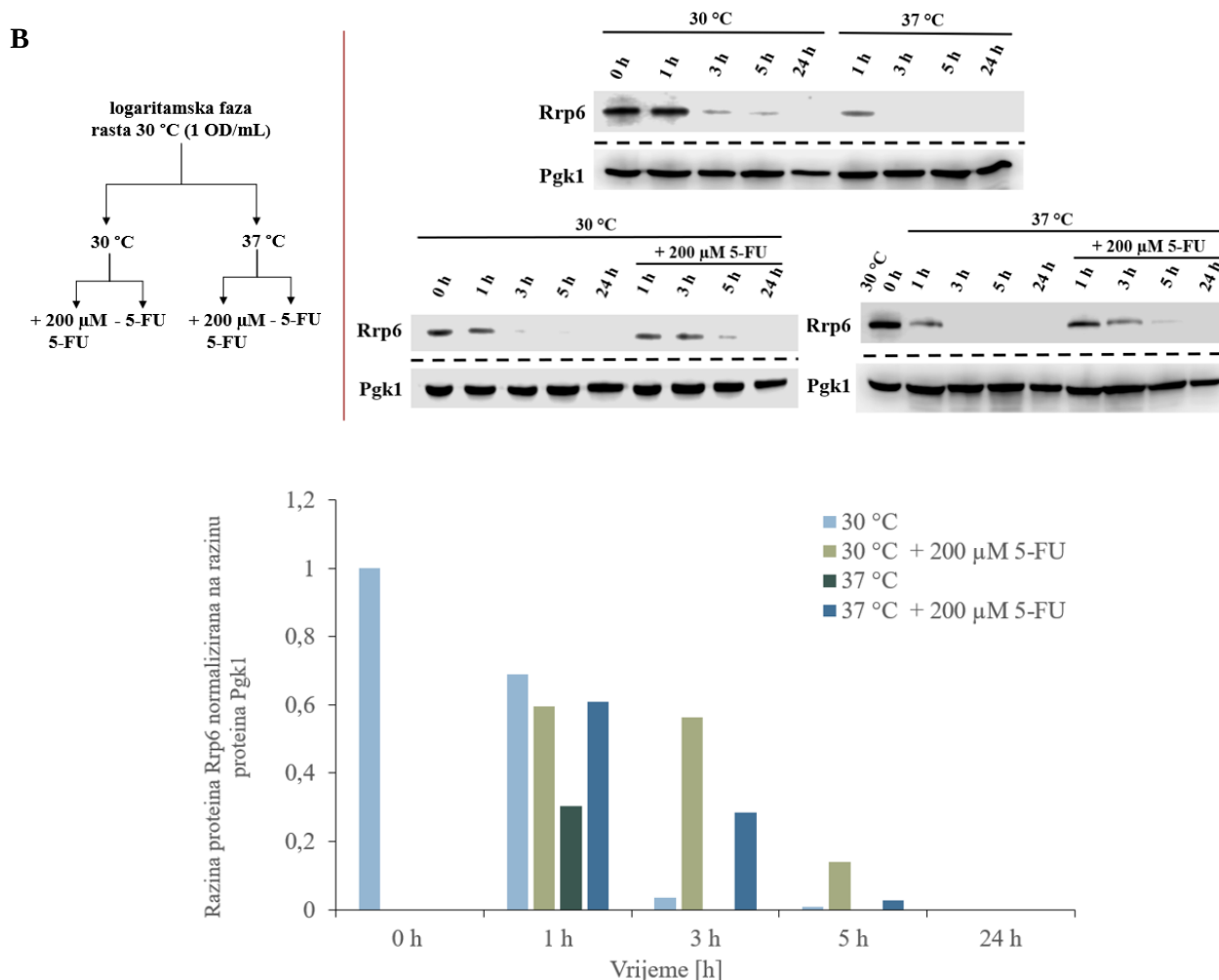
4.1.2. Tretman 5-fluorouracilom utječe na razinu ekspresije proteina Rrp6

Prethodno je pokazano da je Rrp6 potreban za normalan rast u prisutnosti 5-FU (Hoskins i Butler, 2007). Međutim, nije poznato mijenja li se sama ekspresija, odnosno razina proteina Rrp6 u stanicama kvasca tijekom tretmana s 5-FU. Kako bi se ispitala razina ekspresije proteina Rrp6, stanice divljeg tipa linije sojeva BMA41 uzgojene su u YPD tekućoj podlozi bez i u prisustvu 20 ili 200 μ M 5-FU na 30 ili 37 °C (slika 13A). Uzorci kultura stanica izuzimani su u određenim vremenskim točkama uzgoja (1, 3, 5 i 24 h uzgoja). S uzorcima provedena je izolacija ukupnih proteina, a proteinski ekstrakti analizirani su metodom western blot. Za detekciju razine ekspresije proteina Rrp6 korišteno je anti-Rrp6 poliklonsko antitijelo koje prepoznaje C-terminus kvašćevog proteina Rrp6. Razina ekspresije Rrp6 pri eksperimentalnim uvjetima normalizirana je na razinu konstitutivno eksprimiranog proteina Pgc1 za čiju je detekciju korišteno monoklonsko antitijelo anti-Pgc1. Pgc1, odnosno fosfoglicerat kinaza 1 (engl. *phosphoglycerate kinase 1*, *Pgc1*), jedan je od citosolnih enzima uključenih u glikolizu. Rezultati su pokazali da je Rrp6 stabilno eksprimiran na 30 °C, tijekom eksponencijalne faze (0 - 3 h) uzgoja stanica (slika 13A). U kasnijim fazama uzgoja (5 h), odnosno ulaskom u stacionarnu fazu (24 h uzgoja), razina proteina Rrp6 drastično se smanjuje. Puno izraženiji efekt pada razine ekspresije Rrp6 može se uočiti tijekom uzgoja na restriktivnoj temperaturi od 37 °C. Pri toj temperaturi signal proteina Rrp6 ne može se detektirati već nakon trećeg sata uzgoja (slika 13A). Ovi rezultati sugeriraju da je ekspresija proteina Rrp6 regulirana fazom rasta jer se ulaskom stanica u kasnije faze rasta njegova ekspresija znatno smanjuje, ali i povišenom temperaturom, koja također doprinosi padu razine ekspresije proteina. Na slici 13A može se uočiti da tijekom rasta stanica na 30 °C ne dolazi do značajnijeg pada razine ekspresije proteina Rrp6 uslijed dodatka 20 μ M 5-FU te je proteinski signal usporediv sa signalom detektiranim za stanice uzgojene bez 5-FU. Zanimljiv rezultat dobiven je prilikom uzgoja na 37 °C, pri čemu je jasno vidljivo da je prilikom dodatka 20 μ M 5-FU moguće detektirati protein Rrp6 do petog sata uzgoja, odnosno razina proteina je veća uz dodatak 5-FU u odnosu na razinu detektiranu u uvjetima bez dodatka 5-FU. Isti eksperiment proveden je s višom koncentracijom 5-FU, dodatkom 200 μ M 5-FU, kako bi se provjerilo hoće li se moći uočiti još značajnija stabilizacija razine proteina. Na slici 13B može se vidjeti da uzgojem stanica na 30 °C u prisutnosti 200 μ M 5-

FU razina proteina Rrp6 ostaje uočljiva čak i tijekom petog sata uzgoja, za razliku od istih stanica koje nisu bile izložene 5-FU. Također, pri većoj koncentraciji 5-FU na 37 °C, tretman s 5-FU dovodi do pojačane razine ekspresije Rrp6 u odnosu na uvjete bez 5-FU od prvog do petog sata uzgoja. Finalno, razina proteina Rrp6 je preniska za detekciju u kasnijim fazama uzgoja (24 h) pri obje temperature, neovisno o dodatku 5-FU. Sukladno dobivenim rezultatima, tretman 5-FU izravno utječe na razinu ekspresije proteina Rrp6 u stanicama kvasca *S. cerevisiae*. Specifično, detektirana je povećana razina ekspresije proteina Rrp6 u logaritamskoj fazi rasta uslijed tretmana s 5-FU pri temperaturama od 30 °C i 37 °C.



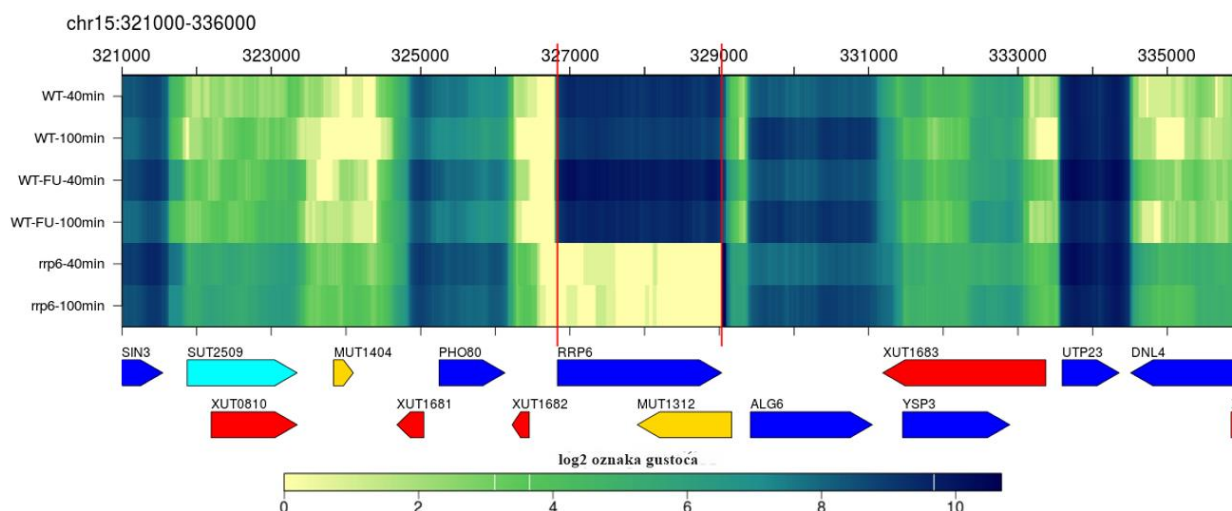
Slika 13. Razina ekspresije Rrp6 proteina i kvantifikacija dobivenog signala. Semi-kvantitativna analiza proteina Rrp6 i Pgk1 metodom western blot. Shema prikazuje uvjete uzgoja stanica na 30 i 37 °C, na membrani je vidljiva razina proteina Rrp6 i Pgk1 uslijed tretmana 5-FU u koncentraciji od 20 μM (**A**) ili 200 μM (**B**). Vrijednosti razine proteina Rrp6 normalizirane su na Pgk1 i izražene u odnosu na razinu proteina u stanicama divljeg tipa na 30 °C. Membrane su vizualizirane kemiluminiscencijom.



Slika 13. Razina ekspresije Rrp6 proteina i kvantifikacija dobivenog signala. Semi-kvantitativna analiza proteina Rrp6 i Pgk1 metodom western blot. Shema prikazuje uvjete uzgoja stanica na 30 i 37 °C, na membrani je vidljiva razina proteina Rrp6 i Pgk1 uslijed tretmana 5-FU u koncentraciji od 20 μM (A) ili 200 μM (B). Vrijednosti razine proteina Rrp6 normalizirane su na Pgk1 i izražene u odnosu na razinu proteina u stanicama divljeg tipa na 30 °C. Membrane su vizualizirane kemiluminiscencijom – *nastavak*.

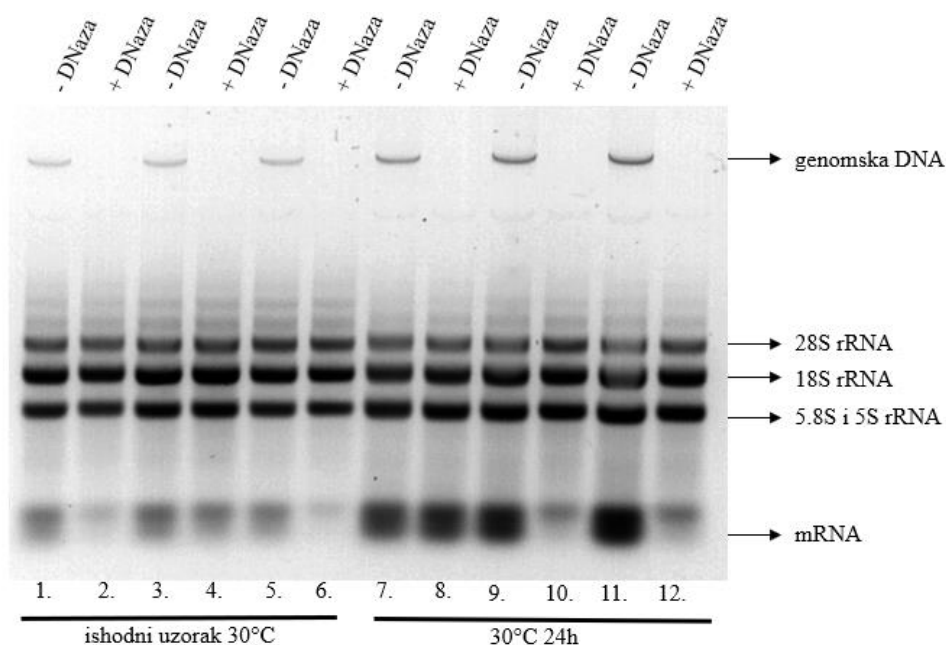
Obzirom da su prethodni rezultati pokazali efekt povećanja razine Rrp6 na proteinskoj razini, idući korak bio je provjeriti može li se na razini transkripta *RRP6* uočiti isti efekt, odnosno provjeriti na kojoj je razini regulirana njegova ekspresija. U radu Xie i sur., 2019 je provedena analiza transkriptoma 5-FU tretiranih, naspram netretiranih diploidnih stanica divljeg tipa i stanica mutanata *rrp6* kojima je sinkroniziran mitotički stanični ciklus. Stanični ciklus zaustavljen je u G1 uzgojem stanica divljeg tipa i mutanta *rrp6* u mediju siromašnom nutrijentima, nakon čega su stanice prebačene u svježi bogati medij (YPD) u prisutnosti i odsutnosti 20 μg/mL 5-FU. Sojevi su uzorkovani nakon 40 i 100 minuta, što su dvije vremenske točke koje općenito odgovaraju G1/S prijelazu i početku G2/M-faza.

Ekspresijski profil (slika 14) pokazao je da prilikom tretmana stanica divljeg tipa 5-FU dolazi do pojačane razine ekspresije mRNA *RRP6* u odnosu na netretirane stanice i to pri 40 i 100 minuta trajanja tretmana. Ovi rezultati pokazuju da je viša razina proteina Rrp6 detektirana prilikom tretmana stanica s 200 μ M 5-FU (slika 13B) vjerojatno posljedica povišene razine transkripcije gena *RRP6* pri istim uvjetima.



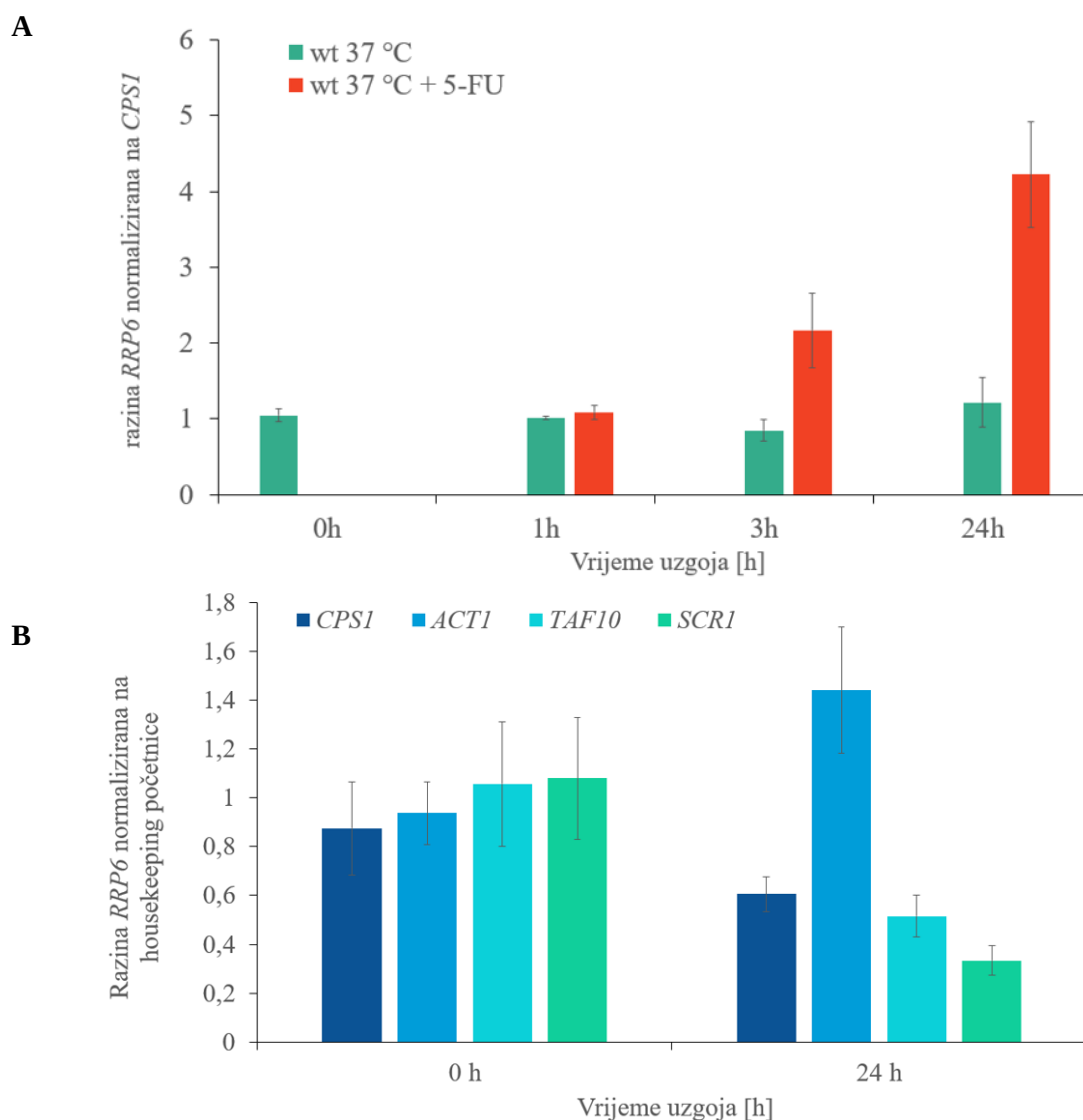
Slika 14. Ekspresijski profil lokusa *RRP6* na 15. kromosomu kvasca *S. cerevisiae* pri uvjetima uzgoja bez i sa tretmanom 5-FU. Povećana razina ekspresije (na log2 skali) označena je tamnoplavom bojom, a smanjena žuto-zelenom. Brojevi kromosoma i koordinate genoma prikazani su u sredini. Desno su prikazani uzorci divljeg tipa (WT), tretirani s 5-FU (WT 5-FU) i mutant *rrp6*, te vremenske točke u minutama. Na slici su prikazani samo transkripti s gornjeg (+) lanca DNA. Prilagođeno prema bazi podataka <http://vm-gb.curie.fr/mprimig/5FU/>, Query: *RRP6*, Pristupljeno 1.10.2021.

Budući da je povećanje razine proteina Rrp6 opaženo na 37 °C pri obje ispitane koncentracije 5-FU, postavlja se pitanje dolazi li povećanja razine transkripta *RRP6* i na 37 °C. U tu svrhu, stanice divljeg tipa uzgojene su u YPD tekućoj hranjivoj podlozi i tretirane s 5-FU. RNA je izolirana iz stanica uzgojenih od logaritamske faze do stacionarne faze rasta (uzorkovanje tijekom 0, 1, 3 i 24 h) metodom vrućeg fenola opisanom u poglavlju 3.2.3. Izolirana RNA tretirana je DNazom, a efikasnost te reakcije i integritet izolirane RNA provjereni su agaroznom gel elektroforezom. Elektroforeza ukupne RNA omogućila je razdvajanje različitih vrsta RNA te je integritet RNA potvrđen je ostrim vrpčama rRNA velike molekularne težine (28S i 18S), rRNA male molekularne težine (5.8S i 5S) kao i mRNA bez znakova degradacije (slika 15).



Slika 15. Reprezentativni primjer provjere integriteta ukupne stanične RNA. Elektroforetski profil ukupnog uzorka RNA na 1 % agaroznom gelu uključujući genomsku DNA prisutnu u uzorcima netretiranim DNazom, 28S rRNA, 18S rRNA, mRNA i male RNA, kao što je 5.8S i 5S RNA. Redoslijed jažica na slici predstavlja biološke paralele ishodnih uzoraka stanica uzgojenih na 30 °C te uzoraka nakon 24 h uzgoja.

Nadalje, uslijedila je reverzna transkripcija, a cDNA je kvantificirana metodom sa specifičnim početnicama za *RRP6* i *housekeeping* transkripte. Za praćenje ekspresije *RRP6* pri uvjetima povišene temperature i uz dodatak 5-FU korištene su početnice za umnažanje *CPS1*. Gen *CPS1* koji kodira za vakuolarnu karboksipeptidazu, odabran je kao *housekeeping* kontrola zato što je u stacionarnoj fazi konstitutivno eksprimiran, što je u skladu eksperimentalnim uvjetima u ovom radu (Nevers i sur., 2018). Slika 16A prikazuje rezultate qPCR analize. U slučaju stanica divljeg tipa uzgojenih bez tretmana 5-FU, razina mRNA *RRP6* ostaje podjednaka tijekom uzgoja na 37 °C. Uzevši u obzir prethodne rezultate koji su pokazali značajan pad razine proteina pri istim uvjetima (slika 13), može se zaključiti da se regulacija ekspresije Rrp6 uslijed uzgoja na povišenoj temperaturi odvija na posttranslacijskoj razini. Prijašnji rezultati (slika 13) pokazali su da se razina proteina Rrp6 stabilizira uslijed tretmana 5-FU pri 37 °C. Slično se može uočiti i kod razine transkripta *RRP6* u stanicama koje su tretirane 5-FU. Naime, tijekom svih sati uzgoja razina *RRP6* veća je u odnosu na razinu u stanicama koje nisu podvrgnute djelovanju 5-FU (slika 16A). Povišena razina mRNA, ali i proteina upućuje da se djelovanje 5-FU na stanice u eksponencijalnoj fazi rasta manifestira na transkripcijskoj razini regulacije.



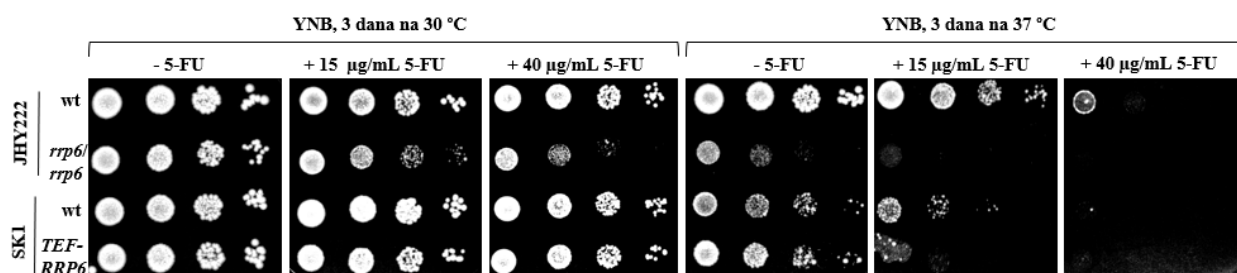
Slika 16. Razina ekspresije transkripta *RRP6*. Kvantifikacija umnoženih fragmenata cDNA i prikaz omjera ekspresije *RRP6/CPS1* ovisno o fazi rasta stanica divljeg tipa na 37 °C i dodatku 5-FU (A). Razina ekspresije *RRP6* transkripta normalizirana na četiri *housekeeping* endogene kontrole: *CPS1*, *ACT1*, *TAF10* i *SCR1* uslijed uzgoja stanica divljeg tipa do stacionarne faze pri 30 °C (B).

Razina proteina Rrp6 stabilna je u ranijim fazama uzgoja, a onda se do stacionarne faze (24 h) signal više ne može detektirati (slika 13). Za razliku od toga, razina transkripta *RRP6* je relativno stabilna tijekom cijelog perioda uzgoja bez 5-FU na 37 °C (slika 16A). Sukladno tome, regulacija ekspresije Rrp6 obzirom na fazu rasta vjerojatno se odvija na proteinskoj razini. Kako bi se sa sigurnošću mogao potvrditi rezultat prethodnog eksperimenta na slici 16A, ponovljen je uzgoj stanica u logaritamskoj i stacionarnoj fazi bez tretmana 5-FU, samo pri 30 °C, te je razina transkripta *RRP6* normalizirana na četiri različita *housekeeping* transkripta. U ovom je eksperimentu pokazano da se razina ekspresije mRNA *RRP6* smanjuje u odnosu na početne faze

uzgoja (slika 16B), međutim ne u jednakoj mjeri kao što je detektirano za drastičan pad razine proteina pri istim uvjetima (slika 13). Jedina iznimka je razina ekspresije *RRP6* normalizirane na transkript *ACT1* (slika 16B). Ovakvo povećanje razine ekspresije može se objasniti ekspresijom gena *ACT1* koji je endogena kontrola za uzgoj i analizu u logaritamskoj fazi rasta, za razliku od stacionarnih uvjeta rasta u ovom eksperimentu. *ACT1* kodira za citoskeletni protein β -aktin i validiran je kao prikladan gen za normalizaciju ekspresije gena uključenih u središnji metabolizam ugljika kao odgovor na kratkoročni puls glukoze (Ståhlberg i sur., 2008). S druge strane, upotreba *ACT1* nije prikladna kao interna kontrola za kvantitativnu analizu ekspresije gena u kvascu *S. cerevisiae* tijekom dugotrajnog rasta na glukozi (Teste i sur., 2009). U slučaju ostalih *housekeeping* transkriptata (*CPS1*, *TAF10* i *SCR1*) može se uočiti da je razina ekspresije *RRP6* podjednaka nakon 24 h, ali smanjena u odnosu na početak uzgoja (slika 16B). Dakle, u stacionarnim uvjetima uzgoja ekspresija Rrp6 može biti djelomično transkripcijski regulirana, ali se vjerojatno odvija i posttranslacijskim mehanizmom obzirom da je efekt proteinske degradacije značajniji.

4.1.3. Prekomjerna ekspresija Rrp6 negativno utječe na rast stanica prilikom tretmana 5-FU pri povišenoj temperaturi

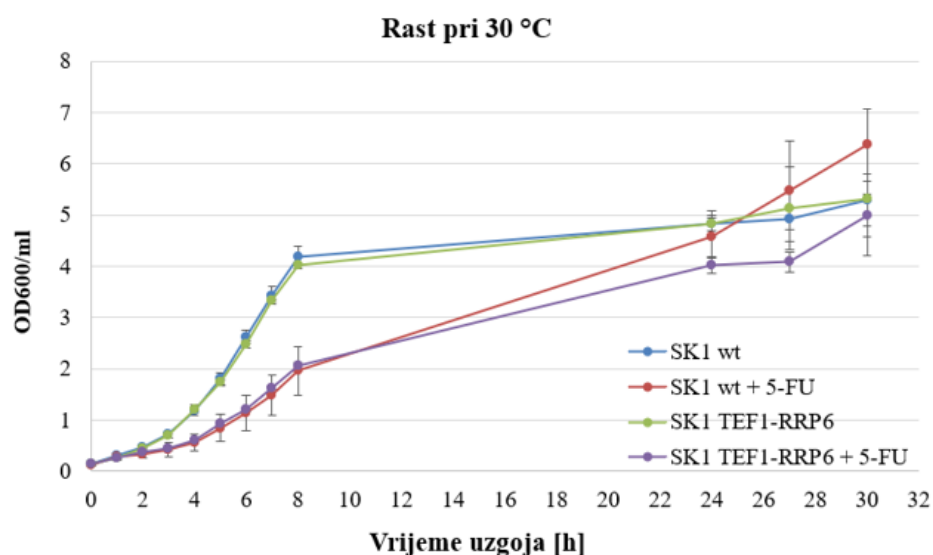
Kada se stanice uzgajaju u prisutnosti 5-FU, povećava se razina ekspresije proteina Rrp6, kao što je potvrđeno prethodnim eksperimentima (slika 13). Kako bi se provjerilo hoće li prekomjerna ekspresija Rrp6 doprinijeti otpornosti stanica na djelovanje 5-FU, ispitan je rast stanica kvasca s pojačano eksprimiranim Rrp6 u odnosu na odgovarajuće stanice divljeg tipa. U tu svrhu korišten je soj *TEF1-RRP6* iz linije sojeva SK1 koji je prethodno konstruiran u laboratoriju M. Primiga (IRSET Inserm, Rennes, Francuska). Ovaj soj umjesto nativnog promotora gena *RRP6* ima jaki konstitutivni promotor *TEF1*. Kao kontrola za fenotip mutanta *rrp6*, korišteni su diploidni sojevi linije sojeva JHY222 jer je poznato da u liniji sojeva SK1 delecija obje kopije gena *RRP6* nije vijabilna (Lardenois i sur., 2011). Stanice linija sojeva SK1 i JHY222 uzgojene su na YNB podlozi sa i bez 5-FU, na 30 i 37 °C tijekom tri dana. Trodnevna inkubacija pokazala je da su stanice mutanta *rrp6* očekivano osjetljivije od izogenog divljeg tipa JHY222 uslijed uzgoja na 30 °C uz tretman 15 μ g/mL, a posebice 40 μ g/mL 5-FU, te da pokazuju temperaturno-osjetljivi fenotip na 37 °C (slika 17). S druge strane, rast stanica soja *TEF1-RRP6* linije sojeva SK1 usporediv je s rastom stanica divljeg tipa SK1 na 30 °C neovisno o prisutnosti 5-FU. U slučaju stanica linije sojeva SK1 nema razlike u rastu divljeg tipa i soja *TEF1-RRP6* pri uzgoju na 37 °C bez 5-FU. No, prekomjerna ekspresija Rrp6 ne doprinosi otpornosti stanica prilikom rasta na podlozi s 15 μ g/mL 5-FU, čak je uočljiv i slabiji rast mutanta *TEF1-RRP6* u odnosu na stanice divljeg tipa (slika 17). Vidljivo je da 40 μ g/mL i 37 °C djeluju gotovo u potpunosti inhibitorno na rast svih sojeva.



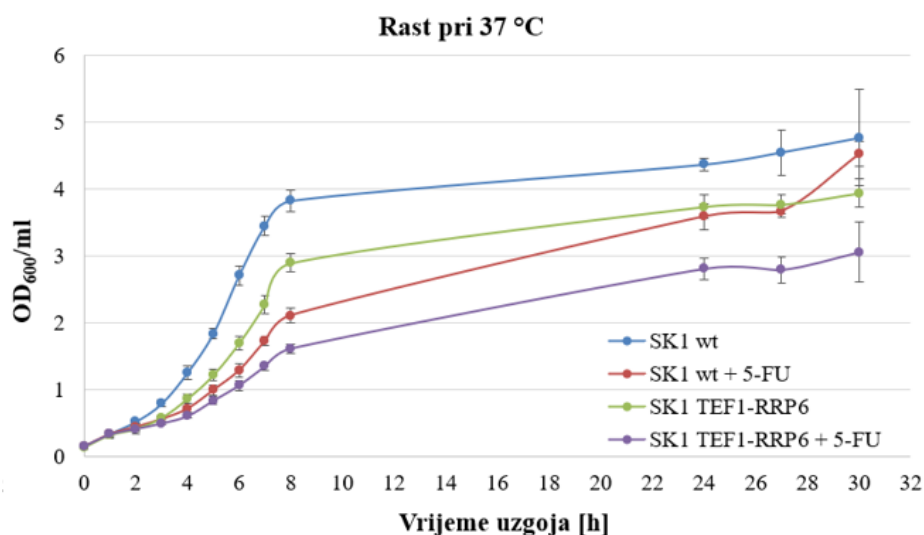
Slika 17. Osjetljivost stanica kvasca analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa i mutanata *rrp6* iz JHY222 (A) te divljeg tipa i mutanta *TEF-RRP6* iz (B) linija sojeva SK1 uzgojene su u YNB podlozi do logaritamske faze rasta na 30 °C te su četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena na su na krute YNB podloge na 30 °C i 37 °C. Pri obje temperature u medij je dodan 5-FU u koncentracijama od 15 ili 40 µg/mL. Podloge s kolonijama fotografirane su nakon 3 dana rasta.

Nakon provjere osjetljivosti stanica testom rasta na pločama bilo je potrebno provjeriti rast istih sojeva i u tekućoj podlozi. Obzirom da metoda testa rasta ne daje uvid u kinetiku rasta stanica, krivuljom rasta može se dobiti informacija o brzinama rasta pojedinih sojeva uzgojenih u određenim uvjetima. Biološke paralele kultura divljeg tipa i mutanta *TEF1-RRP6* u logaritamskoj fazi rasta precijepljene su na 0,1 OD₆₀₀/mL te je rast stanica praćen spektrofotometrijski pri uvjetima uzgoja na 30 i 37 °C bez ili uz tretman 5-FU. Pri 30 °C nije zamijećena razlika u rastu stanica divljeg tipa i soja s prekomjernom ekspresijom Rrp6 (slika 18A). Tretman s 5-FU na 30 °C usporio je rast oba soja linije sojeva SK1. Međutim, nije bilo razlike u brzini rasta stanica kod fiziološke ili prekomjerne ekspresije Rrp6. Dakle, divlji tip i soj s prekomjernom ekspresijom Rrp6 podjednako rastu u uvjetima bez i s 5-FU. Za razliku od toga, prilikom uzgoja na restriktivnoj temperaturi evidentno je da stanice soja *TEF1-RRP6* sporije rastu od stanica divljeg tipa, a dodatkom 5-FU takav efekt je još izraženiji (slika 18B). Ovim je eksperimentima pokazano da prekomjerna ekspresija Rrp6 uzrokuje smanjenje brzine rasta stanica kvasca u odnosu na stanice s endogenom ekspresijom Rrp6 pri uvjetima povišene temperature, sa ili bez prisutnosti 5-FU.

A



B



Sojevi t_g	30 °C	37 °C	Sojevi t_g	30 °C	37 °C
wt	1,514	1,634	wt + 5FU	1,966	2,391
<i>TEF1-RRP6</i>	1,500	1,871	<i>TEF1-RRP6</i> + 5FU	1,856	2,635

Slika 18. Kinetika rasta sojeva kvasca te pripadajuća generacijska vremena. Stanice divljeg tipa SK1 i mutanta *TEF1-RRP6* uzgajane su pri 30 °C i 37 °C na rotacijskoj tresilici u uvjetima bez i sa tretmanom 5-FU. Apsorbancija je mjerena je pomoću spektrofotometra tijekom uzgoja. Iz dobivenih OD₆₀₀ vrijednosti konstruirane su krivulje rasta pri 30 °C (**A**) i 37 °C (**B**) te su izračunata generacijska vremena. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Ovi rezultati pokazuju da pojačana razina ekspresije proteina Rrp6, inače potrebnog za rezistenciju stanica na 5-FU, nema pozitivan, već dapače, ima negativan učinak na rast stanica u prisutnosti 5-

FU. Budući da je Rrp6 dio kompleksa egzosoma, moguće je da njegova pojedinačna prekomjerna ekspresija nije dovoljna kako bi se ostvarila njegova potpuna funkcija. Moguće je da se prekomjernom ekspresijom Rrp6 stvaraju uvjeti u kojima je prisutna razina jezgre egzosoma zasićena s Rrp6. Ostatak prekomjerno eksprimiranog Rrp6 onda ne bi mogao sudjelovati u staničnom odgovoru na 5-FU, odnosno djelovati na 5-FU modificirane transkripte. Uvidom u bazu podataka s informacijama o ekspresiji mRNA za podjedinice egzosoma ovisno o tretmanu 5-FU (<http://vm-gb.curie.fr/mprimig/5FU/>), može se primijetiti da je kod nekih podjedinica jezgre egzosoma i katalitičke podjedinice Dis3 ekspresija pojačana. Stoga, moguće je da samo prekomjerna ekspresija Rrp6 neće imati željeni učinak, odnosno bez prekomjerne ekspresije ostalih podjedinica egzosoma nije dovoljna za omogućavanje otpornosti na 5-FU.

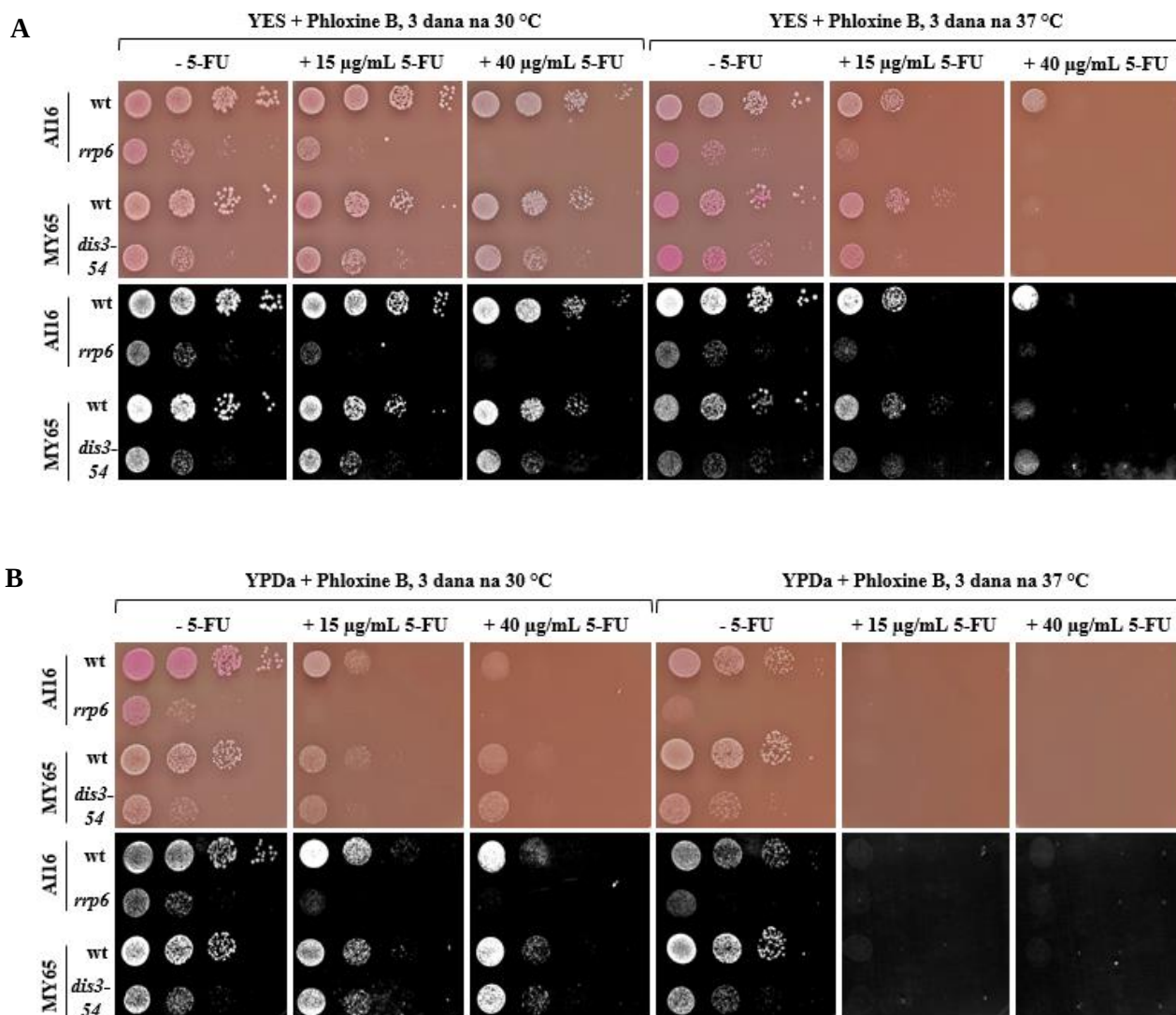
4.2. POVEZANOST DJELOVANJA ANTITUMORSKOG LIJEKA 5-FLUOROURACILA I RAZINE EKSPRESIJE EGZORIBONUKLEAZE Rrp6 U KVASCU *Schizosaccharomyces pombe*

4.2.1. Stanice mutanata katalitičkih podjedinica RNA egzosoma pokazuju osjetljivost na tretman 5-fluorouracilom

Iako ih karakteriziraju brojne sličnosti, vrste *S. pombe* i *S. cerevisiae* evolucijski su se odvojile prije otprilike 400 milijuna godina (Wood i sur., 2002; Sipiczki, 2000). RNA egzosom istražen je u brojnim organizama, a najopsežnije proučavan je u modelnom kvascu *S. cerevisiae*. Međutim, postoje značajke egzosoma koje su jedinstvene za *S. pombe*. Na primjer, pokazano je da RNA egzosom pridonosi pravovremenoj mejotičkoj diferencijaciji ciljanjem transkripata specifičnih za mejozu koji trebaju biti razgrađeni tijekom mitotičkog staničnog ciklusa. *S. pombe* eksprimira dva ortologna proteina Mtr4, Mtr4 i Mtl1, pri čemu je protein Mtl1 uključen u ciljanje i degradaciju mejotičkih RNA (Egan i sur., 2014). Fisijski kvasac prethodno je korišten kao modelni organizam kako bi se dobio uvid u *in vivo* mehanizam djelovanja kojim 5-FU uzrokuje toksičnost temeljenu na RNA u eukariotskim stanicama. Cjelogenomske studije sa *S. pombe* identificirale su gene čija disrupcija rezultira osjetljivošću na 5-FU (Mojardín i sur., 2015; Mojardín i sur., 2013; Gustavsson i Ronne, 2008). Pokazano je da su glavne mete djelovanja 5-FU metabolizam RNA te segregacija i organizacija kromosoma (Mojardín i sur., 2013). Specifično, u radu Mojardín i sur., 2013 DNA *microarray* tehnologijom dobiven je uvid u transkripcijski profil stanica tretiranih 5-FU. Pokazano je da, osim što 5-FU uzrokuje citotoksičnost u stanicama *S. pombe*, pri tretmanu 5-FU dolazi do defekata u procesiranju pre-rRNA te nakupljanja istih. Tretman 5-FU doveo je do indukcije različitih gena čija je funkcija povezana uz metabolizam rRNA, pri čemu je detektirana i povišena razina podjedinice jezgre

egzosoma Rrp45.

Spomenute indikacije o djelovanju 5-FU na komponente RNA egzosoma otvorile su pitanje je li stanični odgovor na djelovanje 5-FU evolucijski očuvan i u kvascu *S. pombe*, odnosno jesu li katalitičke podjedinice RNA egzosoma kvasca *S. pombe* uključene u otpornost na djelovanje 5-FU. Kako bi se to ispitalo proveden je test rasta. Za test rasta korištene su stanice mutanta *rrp6* i mutanta za egzoribonukleaznu katalitičku podjedinicu Dis3 te njihovi izogeni divlji tipovi. Mutant *dis3-54* sadrži točkastu mutaciju u egzoribonukleaznoj RNB domeni Dis3 koja rezultira supstitucijom aminokiseline Pro509 s Leu509 (Mukarami i sur., 2007). Rast stanica kvasca *S. pombe* ispitan je na YES i YPDa podlogama, prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1. Iako se YPD podloga koristi u istraživanjima sa stanicama *S. pombe*, pepton u YPD inducira lizu mutanata *ura4⁻* (Matsuo i sur., 2013), koji su korišteni u ovom radu. Stoga, osim YPDa podloge, za test rasta korišten je i YES bogati medij za uzgoj *S. pombe* koji sadrži samo ekstrakt kvasca, glukozu i aminokiseline histidin, adenin, uracil, lizin i leucin (Gutz i Schmidt, 1985). U obje vrste podloge dodana je boja Phloxine B koja se koristi za detekciju ploediteta i vijabilnosti stanica. Intenzitet ružičastog obojenja kolonija uslijed rasta na podlogama s Phloxinom B može identificirati umiruće stanice. Pri uzgoju na toj podlozi, haploidni divlji tip formira svjetlo ružičaste kolonije, diploidne kolonije su tamnije ružičaste boje, dok su umiruće stanice tamno crvene boje. Sojevi kvasca *S. pombe* uzgojeni su na YES ili YPDa podlogama bez ili u prisutnosti 15 ili 40 µg/mL 5-FU, tijekom tri dana pri 30 ili 37 °C. Vidljivo je da već prilikom rasta stanica na YES podlogama pri 30 °C dolazi do defekta u rastu mutanata *rrp6* i *dis3-54* u odnosu na izogene divlje tipove (slika 19A). Uzgojem pri permisivnoj temperaturi na podlogama s 15 µg/mL 5-FU uočljiva je osjetljivost mutanta *rrp6*, koja je još izraženija pri višoj koncentraciji 5-FU u odnosu na stanice divljeg tipa. S druge strane, osjetljivost mutanta *dis3-54* pri 30 °C u YES podlogama s 15 ili 40 µg/mL nije uočljiva te je njegov rast podjednak kao u podlogama bez 5-FU. U slučaju YPD podloga, može se uočiti da je intenzitet ružičastog obojenja veći kod mutanta *rrp6* i izogenog divljeg tipa pri uzgoju na 30 °C (slika 19B). Također, značajno je veća osjetljivost stanica divljih tipova prilikom dodatka 5-FU u YPD podloge, a rast stanica mutanata *rrp6* i *dis3-54* gotovo je nezamjetan. Na slici 19 jače ružičasto obojenje na YES i YPDa podlogama sugerira temperaturnu osjetljivost stanica mutanta *rrp6* i *dis3-54*, odnosno smanjenje vijabilnosti uzgojem na restriktivnoj temperaturi (37 °C). Na YPDa podlogama rast stanica svih sojeva ne može se detektirati pri 37 °C uz dodatak 5-FU.



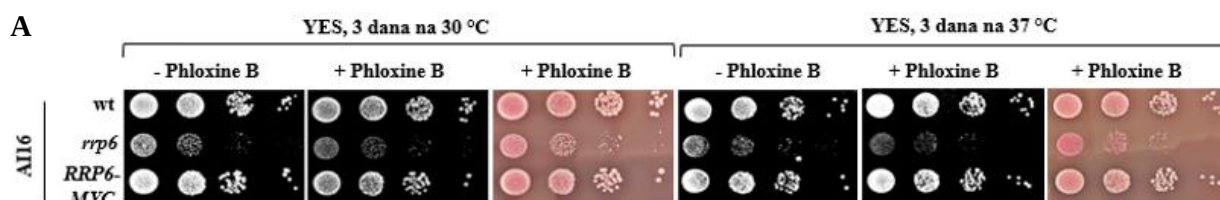
Slika 19. Osjetljivost stanica kvasca analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa AII6 i mutanata *rrp6* te divljeg tipa MY65 i izogenog mutanta *dis3-54* uzgojene su u YES tekućoj podlozi do logaritamske faze rasta na 30 °C te su četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena na su na krute YES (A) ili YPDa (B) podloge s dodatkom Phloxina B na 30 °C i 37 °C. Pri obje temperature u medij je dodan 5-FU u koncentracijama od 15 ili 40 µg/mL. Podloge s kolonijama fotografirane su nakon 3 dana rasta. Prikazane su crno-bijele te fotografije u boji za iste podloge, kako bi se jasnije uočile razlike u rastu te obojenju bojom Phloxine B.

Rezultati testa rasta pokazuju da kod kvasca *S. pombe* (slika 19), kao i kod kvasca *S. cerevisiae* (slika 10), podjedinica Rrp6 sudjeluje u otpornosti na 5-FU, budući da dodatak 5-FU pri permisivnoj i restriktivnoj temperaturi inhibira rast mutanata *rrp6* obje vrste kvasca. Također, stanice mutanata *rrp6* obje vrste kvasca pokazuju fenotip temperature osjetljivosti. S druge strane, stanice mutanta *dis3-54* *S. pombe* ne pokazuju sličan stupanj osjetljivosti na 5-FU kao stanice mutanta *dis3 exo⁻* *S. cerevisiae* u odnosu na odgovarajuće stanice divljih tipova. Razlog

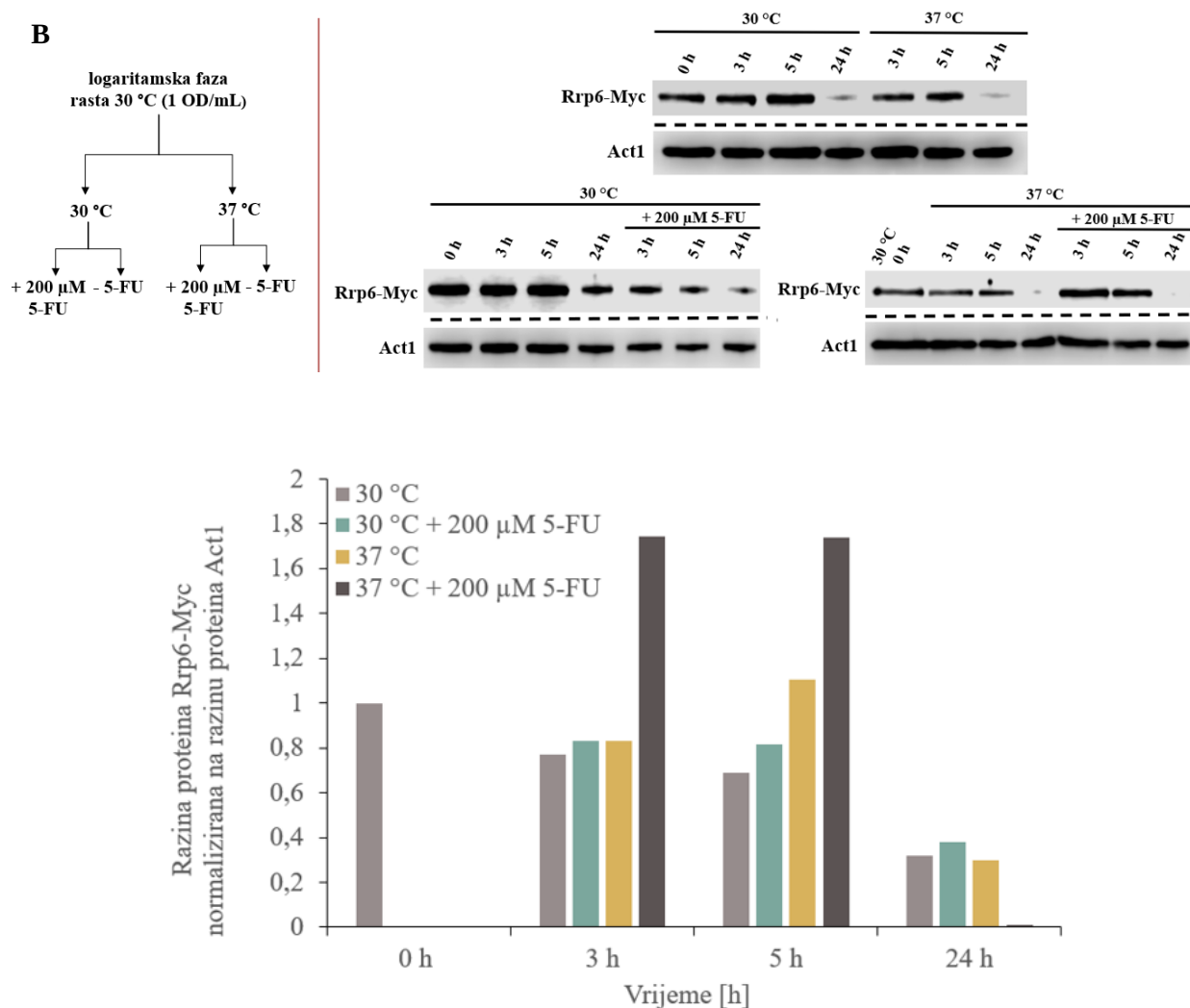
tome može biti da podjedinica Dis3 u *S. pombe* nema ulogu u otpornosti na 5-FU ili da slabo karakterizirana mutacija *dis3-54* nije u potpunosti inaktivirala funkciju Dis3 koja može biti potrebna za rast na 5-FU.

4.2.2. Tretman 5-fluorouracilom utječe na ekspresiju proteina Rrp6

Budući da je pokazano da tretman stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 5-FU utječe na ekspresiju proteina Rrp6, bilo je potrebno istražiti hoće li 5-FU djelovati na razine Rrp6 kvasca *Schizosaccharomyces pombe*. Kako bi se provela analiza ekspresije proteina Rrp6 metodom western blot u stanicama kvasca *S. pombe*, bilo je potrebno koristiti soj u kojem je protein Rrp6 označen Myc oznakom. Obzirom na razlike u sekvencama proteina Rrp6 između dva kvasca, anti-Rrp6 poliklonsko antitijelo, koje prepoznaje C-terminus Rrp6 u kvascu *S. cerevisiae*, nije bilo moguće primijeniti u kvascu *S. pombe*. U svrhu detekcije Rrp6 u kvascu *S. pombe* korišteno je anti-Myc monoklonsko antitijelo. Budući da označavanje proteina može utjecati na samu funkciju proteina, prvo je bilo potrebno ispitati narušava li Myc oznaka na C-terminusu stabilnost i funkciju proteina Rrp6. To je preliminarno provjereno testom rasta za koji su stanice divljeg tipa, mutanata *rrp6* i *RRP6-MYC* uzgojene na YES podlogama bez ili u prisutnosti Phloxina B tijekom trodnevne inkubacije pri 30 ili 37 °C. Stanice soja *RRP6-MYC* rasle su istovjetno stanicama divljeg tipa pri svim uvjetima (slika 20A), čime je utvrđeno da Myc oznaka ne narušava funkciju proteina Rrp6.



Slika 20. Provjera rasta soja *RRP6-MYC* i razina ekspresije Rrp6 proteina uz kvantifikaciju dobivenog signala. Stanice divljeg tipa AI16 te mutanata *rrp6* i *RRP6-MYC* uzgojene su u YES tekućoj podlozi do logaritamske faze rasta na 30 °C te su četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena na krute YES podloge na 30 °C i 37 °C. Pri obje temperature u medij je dodana boja za detekciju vijabilnosti Phloxine B. Podloge s kolonijama fotografirane su nakon 3 dana rasta (A).



Slika 20. Provjera rasta soja *RRP6-MYC* i razina ekspresije Rrp6 proteina uz kvantifikaciju dobivenog signala. Semi-kvantitativna analiza proteina Rrp6 i Act1 metodom western blot (**B**). Shema prikazuje uvjete uzgoja stanica na 30 i 37 °C, na membrani je vidljiva razina proteina Rrp6 i Act1 uslijed tretmana 5-FU u koncentraciji od 200 μM. Vrijednosti razine proteina Rrp6 normalizirane su prema razini proteina Act1 u stanicama divljeg tipa na 30 °C. Membrane su vizualizirane kemiluminiscencijom - *nastavak*.

Stanice mutanta *RRP6-MYC* uzgojene su u tekućoj YES podlozi bez i u prisustvu 200 μM 5-FU na 30 ili 37 °C. Iz kulture kvasca izolirani su ukupni stanični proteini metodom opisanom u poglavlju 3.2.7.1., tijekom 0, 3, 5 i 24 h. Treba napomenuti da stanična stijenka kvasca *S. pombe* je rigidnija od stanične stijenke *S. cerevisiae* (Pérez i Ribas, 2017) i stoga se prilikom izolacije ukupnih proteina koristio modificirani Laemmli pufer. Također, prvo uzorkovanje stanica za izolaciju proteina vršilo se u 3. satu obzirom da je generacijsko vrijeme *S. pombe*, 2.5 h. Za normalizaciju detektiranog signala Rrp6-Myc pri opisanim uvjetima uzgoja korišteno je antitijelo anti-Act1. Na slici 20B vidljivo je da je proteina Rrp6 stabilno eksprimiran tijekom 0 – 5 h ekspanzije uzgoja pri 30 °C. Pri permisivnoj temperaturi, tijekom stacionarne faze (24

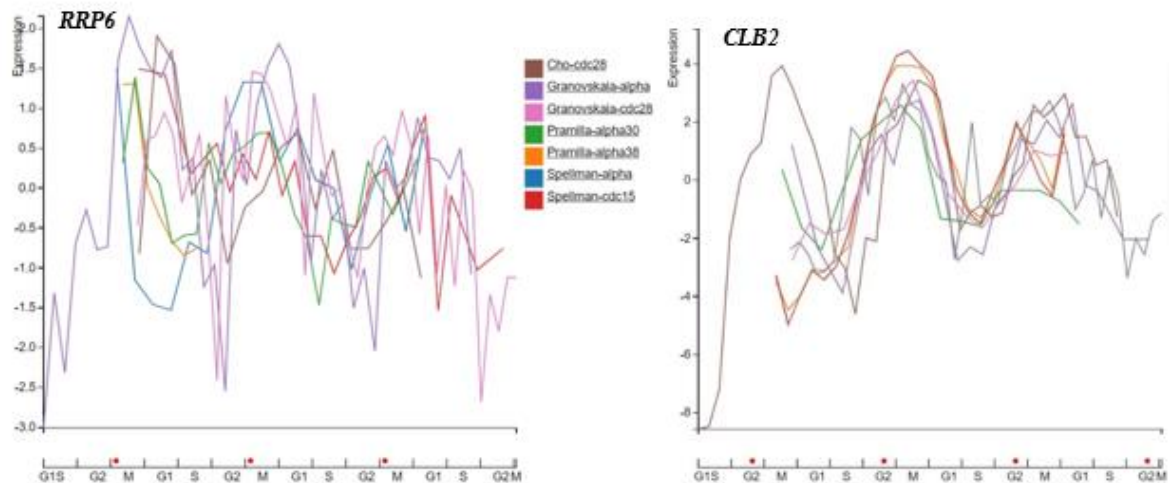
h) razina proteina Rrp6 zamjetno opada. Efekt pada razine proteina Rrp6 ovisno o fazi rasta izraženiji je na povišenoj temperaturi (slika 20B). Kao što je vidljivo na slici 20B, ekspresija proteina Rrp6 u kvascu *S. pombe* regulirana je fazom rasta jer se uzgojem u kasnoj stacionarnoj fazi rasta njegova ekspresija smanjuje te povišena temperatura također doprinosi padu razine ekspresije proteina, kao i u slučaju Rrp6 kvasca *S. cerevisiae* (slika 13B). U prisustvu 200 μ M 5-FU pri 30 °C razina proteina Rrp6 usporediva je s onom detektiranom u uvjetima bez 5-FU pri istoj temperaturi. Međutim, prilikom uzgoja kvasca *S. pombe* pri restriktivnoj temperaturi, vidljiva je povećana razina proteina Rrp6 uslijed tretmana 5-FU. Pojačana ekspresija Rrp6 najizraženija je tijekom eksponencijalne faze rasta (0 – 5 h) (slika 20B). Sličan trend može se primijetiti i u slučaju razine Rrp6 kvasca *S. cerevisiae* (slika 13B). Premda evolucijska udaljenost uvjetuje strukturne različitosti Rrp6 između kvasaca *S. pombe* i *S. cerevisiae*, rezultati western blot analize potvrdili su da je razina proteina Rrp6 kvasca *S. pombe* također regulirana tretmanom 5-FU.

Kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* korišteni su kako bi se dobio *in vivo* uvid u citotoksično djelovanje analoga nukleozida 5-fluorouracila u eukariotskim stanicama. Ovim radom pokazano je da 5-FU utječe na razinu ekspresije katalitičke podjedinice RNA egzosoma, Rrp6, koja je zaslužna za otpornost evolucijski udaljenih kvasaca *S. cerevisiae* i *S. pombe* na djelovanje 5-FU. Praćenjem razine ekspresije Rrp6 na razini mRNA (RT-qPCR) i proteinskoj razini (western blot), uočeno je da se razina Rrp6 stabilizira pri uvjetima uzgoja na restriktivnoj temperaturi kao kompenzacijski odgovor na djelovanje 5-FU. S druge strane, ostaje otvoreno pitanje ima li takvo povećanje razine ekspresije Rrp6 protektivan učinak, budući da je prethodno uočeno da 5-FU djeluje na aktivnost Rrp6 *in vitro* te na njegovu integraciju u RNA egzosom u S2 *Drosophila* kulturi stanica. RNA-posredovani citotoksični učinak 5-FU otežava asocijaciju Rrp6 s ostalim podjedinicama egzosoma, što posljedično dovodi do prezasićenja slobodnog Rrp6 (Silverstein i sur., 2011). Komponenta jezgre egzosoma hRrp45 (PM/Sc175) kao i hRrp6 poznati su autoantigeni u sklerodermijskim bolestima [sindromom polimiozitisa/skleroderme (PM/Sc)] koje su povezane s povećanom incidencijom razvoja tumora (Hill i sur., 2003). Nadalje, nedavno je pokazano kako je 3' - 5' egzoribonukleazna aktivnost EXOSC10 nužna za procesiranje oštećenjem-nastalih ncRNA (engl. *damage-induced non-coding RNA, dincRNA*) (Domingo-Prim i sur., 2019). Osim toga, poznato je da je EXOSC10 uključen u popravak dvolančanih lomova DNA (engl. *Double Strand Break, DSB*) homolognom rekombinacijom (engl. *Homologous Recombination, HR*) u tumorskim staničnim linijama. Postoji implikacija da je EXOSC10 uključen u mehanizam popravka DNA baziran na ncRNA, koji bi time mogao biti relevantan za otpornost stanica raka na kemoterapeutske agense koji izazivaju oštećenje DNA, kao što je 5-fluorouracil, za koji je predloženo da smanjuje učinkovitost popravaka

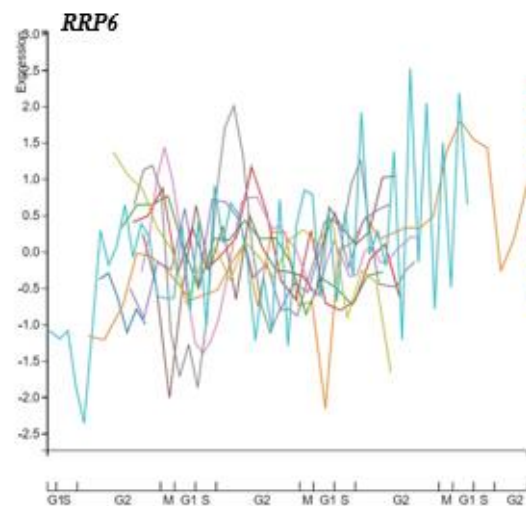
homolognom rekombinacijom (Srinivas i sur., 2015).

U ovom je radu također ispitano na kojoj razini regulacije tretman 5-FU inducira razinu ekspresije Rrp6. Kao što je pokazano za uvjete tretmana 5-FU, ekspresija Rrp6 može biti transkripcijski regulirana (slika 16), ali se vjerojatno pri određenim uvjetima poput visoke temperature i ulaskom stanica u stacionarnu fazu odvija i posttranslacijskim mehanizmom, obzirom da je efekt proteinske degradacije pri tim uvjetima značajniji (slika 13). Gen *RRP6* konstitutivno se transkribira te pokazuje mitotički obrazac ekspresije koji dostiže vrhunac tijekom G2/M faze, sličan ciklinu B-tipa *CLB2* (Santos i sur., 2015) (slika 21). Prikazani ekspresijski profil iz baze podataka CycleBase sugerira da je produkt gena *RRP6* potreban u određenoj točki staničnog ciklusa te da se njegova ekspresija regulira obzirom na vrijeme prikladno za njegovu funkciju. Periodičnost ekspresije mRNA *RRP6/EXOSC10* izražena je kod *S. cerevisiae* i *H. sapiens*, a kod kvasca *S. pombe* postoji trend periodičnosti, ali je slabije izražen (slika 21). U prilog tome govori i činjenica da je kod *S. pombe* G2 najdulja faza staničnog ciklusa (posljedica tog je stroga kontrola prijelaza G2-M), za razliku od *S. cerevisiae* kojem je G1 najdulja faza staničnog ciklusa (G1-S prijelaz je strogo kontroliran). Sukladno tome, veći broj gena snažno je reguliran tijekom staničnog ciklusa pupajućeg kvasca u usporedbi s fisijskim kvascem (Bähler, 2005). Periodična transkripcija većine gena nije očuvana između dva kvasca, osim za relativno mali osnovni skup gena koji uglavnom funkcioniraju u osnovnim procesima staničnog ciklusa kao što su mitozu, citokinezu i replikaciju DNA (Bähler, 2005). Prethodnim je istraživanjima pokazano da izlaganje humanih stanica niskim dozama 5-FU može zaustaviti stanice u G2 fazi i blokirati prijelaz G2/M (Huang i sur., 2010). Iako u ovom radu nije izravno istraženo zašto pri tretmanu 5-FU dolazi do povećanja razine mRNA *RRP6*, navedeno sugerira da se djelovanje 5-FU na stanični ciklus može izravno reflektirati na razinu Rrp6, obzirom da je ekspresija Rrp6 ovisna o staničnom ciklusu. Sukladno tome, kvasac *S. cerevisiae* kod kojeg je ekspresija *RRP6* jako periodično izražena, pokazuje jače i jasnije efekte na protein Rrp6 uslijed tretmana 5-FU (slika 13), a u kvascu *S. pombe* djelovanje 5-FU pokazuje slabije efekte na ekspresiju proteina Rrp6 (slika 20).

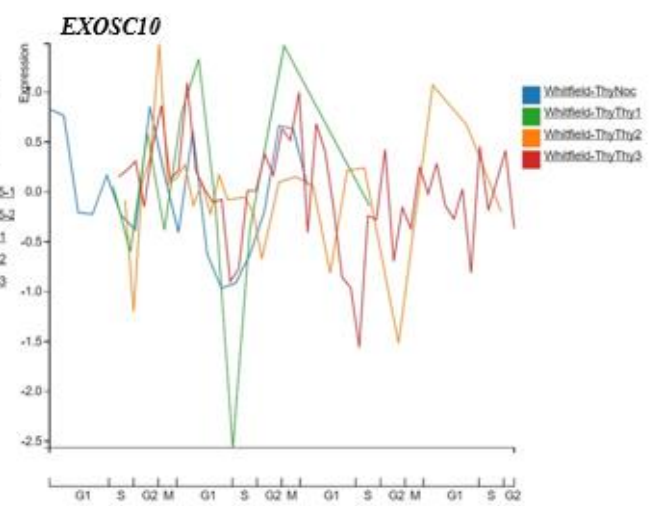
Saccharomyces cerevisiae



Schizosaccharomyces pombe



Homo sapiens



Slika 21. Podaci o ekspresiji gena *RRP6* u različitim organizmima. Ekspresijski profil *RRP6/EXOSC10* u odnosu na fazu staničnog ciklusa i mitotički obrazac ekspresije *CLB2* preuzet je iz baze podataka CycleBase (<https://cyclebase.org>), pristupljeno: 18.6.2022.

Kao što je vidljivo na slici 21, obrazac ekspresije ljudskog *EXOSC10* također je periodičan, što implicira da bi efekti djelovanja 5-FU mogli imati sličan učinak na *EXOSC10* kao što je primijećeno u kvascu *S. cerevisiae*.

Jedan od ciljeva ovog rada bilo je istražiti hoće li prekomjerna ekspresija Rrp6 u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* doprinijeti otpornosti stanica na djelovanje 5-FU. Pokazano je da prekomjerna ekspresija Rrp6 uzrokuje smanjenje brzine rasta stanica kvasca u odnosu na stanice s endogenom ekspresijom Rrp6 pri uvjetima povišene temperature, sa ili bez prisutnosti 5-FU (slika 18). Kada je Rrp6 pod regulacijom jakog konstitutivnog promotora *TEF1* njegova ekspresija je otprilike 5-10 puta jača (neobjavljeni rezultati Laboratorija za biokemiju). Smanjenje brzine

rasta stanica s prekomjernom ekspresijom mogao bi biti posljedica previsoke razine ekspresije Rrp6. Obzirom da prisutnost 5-FU i prekomjerna ekspresija stvaraju aditivni efekt, moguće je da bi se mogućnost stjecanja otpornosti na 5-FU mogla bolje ispitati eksperimentom u kojem bi se postigla finija regulacija razine ekspresije gena *RRP6*. Nadalje, Rrp6 djeluje u kontekstu egzosoma, a pokazano je da je odgovor na djelovanje 5-FU vezan i uz ostale podjedinice egzosoma (Mojardín i sur., 2013; Fang i sur., 2004; ovaj rad). Umjetnim povećanjem razine Rrp6, a ne i ostalih podjedinica RNA egzosoma, potencijalno dolazi do kompeticije slobodnog Rrp6, koji ne može djelovati samostalno, i Rrp6 uklopljenog u egzosom, koji može djelovati na 5-FU modificirane transkripte. U tom kontekstu, ovaj rezultat ne ide u prilog prethodno indiciranoj samostalnoj ulozi Rrp6 koja je neovisna od jezgre egzosoma (Wang i sur., 2020; Callahan i Butler, 2008), barem u kontekstu otpornosti na djelovanje 5-FU. Unatoč tome što prekomjerna ekspresija Rrp6 nije smanjila osjetljivost stanica na 5-FU, rezultati ovog rada pokazali su kompenzacijski mehanizam Air paralognih proteina kojim pojačana ekspresija proteina Air2 u stanicama mutanta *air1* potencijalno smanjuje osjetljivost tih stanica na djelovanje 5-FU (slika 10 i 12). To sugerira bitnu ulogu proteina Air2 u mehanizmu rezistencije na 5-FU koji bi trebao biti dodatno istražen daljnjim eksperimentima u kojima bi se ispitao utjecaj prekomjerne ekspresije proteina Air2 u stanicama divljeg tipa. Air proteini funkcioniraju u sklopu TRAMP kompleksa. TRAMP kompleks potencijalno može postojati u četiri različite izoforme s kombinacijama proteina Trf4/5 i Air1/2, zajedno s Mtr4. Međutim, u stanicama kvasca ne postoje sve četiri izoforme, nego Air1 preferencijalno stupa u interakciju s Trf4 i Trf5, dok Air2 stupa u interakciju gotovo isključivo s Trf4, pri čemu nastaju izoforme Trf4+Air1 (TRAMP4-1), Trf4+Air2 (TRAMP4-2) i Trf5+Air1 (TRAMP5-1) (Delan-Forino i sur., 2020). Također, poznato je da svaka izoforma TRAMP kompleksa pokazuje određenu razinu specifičnosti u ciljanju različitih RNA supstrata. Međutim, u istom je radu pokazano da delecija gena *air1* dovodi do preraspodjele TRAMP izoformi, pri čemu nastaje forma Trf5+Air2 (Delan-Forino i sur., 2020), čije bi djelovanje bilo zanimljivo istražiti u kontekstu otpornosti na 5-FU. Humani ortolog Air proteina je protein ZCCHC7 koji dijeli 35 % odnosno 34 % identiteta s Air1 i Air2. Ukupna stopa odgovora uznapređovalog kolorektalnog karcinoma na 5-FU još uvijek je samo 10-15 % (Giacchetti i sur., 2000), a kombinacija 5-FU s drugim antitumorskim lijekovima poboljšala je stope odgovora na 40-50 % (Gu i sur., 2019; Douillard i sur., 2000). Postoje indikacije da se otpornost na 5-FU može razviti zbog slabije bioraspodjelivosti lijeka, aktivacije puteva popravka DNA i razvijanja otpornosti na apoptozu (Sethy i Kundu, 2021). U ovom radu jasno je pokazna mogućnost da bi manipulacija razinama ekspresije humanih homologa proteina Rrp6 ili Air2 mogla doprinijeti shvaćanju otpornosti na 5-FU kao i razvoju novih terapija, budući da su mehanizmi otpornosti zasad slabo istražena tema od značajnog znanstvenog interesa.

5. ZAKLJUČCI

1. Katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6 i Dis3 te komponente TRAMP kompleksa, Trf4 i Air podjedinice, sudjeluju u otpornosti stanica kvasca *S. cerevisiae* na djelovanje 5-fluorouracila.
2. 5-fluorouracil i povišena temperatura induciraju prekomjernu ekspresiju proteina Air2 kao kompenzacijski mehanizam u stanicama deletanta za paralogni gen *air1* kvasca *S. cerevisiae*.
3. Tretman 5-fluorouracilom inducira povećanje razine ekspresije proteina Rrp6 u stanicama kvasca *S. cerevisiae* i *S. pombe*. U stanicama *S. cerevisiae* je pri istim uvjetima povećana razina mRNA *RRP6*, što indicira transkripcijski mehanizam regulacije.
4. Ekspresija gena *RRP6* kvasca *S. cerevisiae* regulirana je višestrukim mehanizmima na transkripcijskoj i posttranslacijskoj razini, obzirom na fazu rasta, temperaturu i tretman 5-FU.
5. Prekomjerna ekspresija proteina Rrp6 ima negativan učinak na rast stanica kvasca *S. cerevisiae* u prisutnosti 5-fluorouracila pri povišenoj temperaturi.

6. LITERATURA

Aguilera A., García-Muse T. (2013) Causes of genome instability. *Annu Rev Genet* **47**, 1–32. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-111212-133232>

Allmang C., Kufel J., Chanfreau G., Mitchell P., Petfalski E., Tollervey D. (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* **18(19)**, 5399–5410. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5399>

Allshire RC., Javerzat JP., Redhead NJ., Cranston G. (1994) Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell* **76**, 157–169. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90180-5)

Amorim J de, Slavotinek A, Fasken MB, Corbett AH, Morton DJ, Corbett AH (2020) Modeling Pathogenic Variants in the RNA Exosome. *RNA & Disease* **7**, 1–9. <https://doi.org/10.14800/rd.1166>

Anderson JSJ, Parker R (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* **17**, 1497–1506. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/17.5.1497>

Andersson R, Refsing Andersen P, Valen E, Core LJ, Bornholdt J, Boyd M. (2014) Nuclear stability and transcriptional directionality separate functionally distinct RNA species. *Nature Communications* 2014 **5**, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms6336>

Andrulis ED, Werner J, Nazarian A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lis JT (2002) The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in Drosophila. *Nature* 2002 **420**, 837–841. <https://doi.org/10.1038/nature01181>

Aravind L, Koonin E. (1999) DNA polymerase β -like nucleotidyltransferase superfamily: Identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Research* **27**, 1609–1618. <https://doi.org/10.1093/NAR/27.7.1609>

Assenholt J, Mouaikel J, Andersen KR, Brodersen DE, Libri D, Jensen TH (2008) Exonucleolysis is required for nuclear mRNA quality control in yeast THO mutants. *RNA* **14**, 2305–2313. <https://doi.org/10.1261/RNA.1108008>

Baghban R, Farajnia S, Rajabibazl M, Ghasemi Y, Mafi AA, Hoseinpoor R, i sur. (2019) Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Mol Biotechnol* **61**, 365–384. <https://doi.org/10.1007/S12033-019-00164-8>

Bähler J (2005) Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annual Review of Genetics* **39**, 69–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095808>

Balatsos NAA, Havredaki M, Tsiapalis CM (2000) Early 5-fluorouracil-induced changes of poly(A) polymerase in HeLa and WISH cells. *Int J Biol Markers* **15**, 294–299. <https://doi.org/10.1177/172460080001500403>

Beach D, Durkacz B, Nurse P (1982) Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* **300**, 706–709. <https://doi.org/10.1038/300706A0>

Beese LS, Steitz TA (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J* **10**, 25–33. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1991.TB07917.X>

Biot A, Kus K, Priest E, al Alwash A, Castello A, Mohammed S, i sur. (2022) RNA-binding protein Mub1 and the nuclear RNA exosome act to fine-tune environmental stress response. *Life Science Alliance* **5**, e202101111. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101111>

Blüthner M, Bautz FA (1992) Cloning and characterization of the cDNA coding for a polymyositis-scleroderma overlap syndrome-related nucleolar 100-kD protein. *J Exp Med* **176**, 973–980. <https://doi.org/10.1084/JEM.176.4.973>

Bonneau F, Basquin J, Ebert J, Lorentzen E, Conti E (2009) The Yeast Exosome Functions as a Macromolecular Cage to Channel RNA Substrates for Degradation. *Cell* **139**, 547–559. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.042>

Briggs MW, Burkard KTD, Butler JS (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J Biol Chem* **273**, 13255–13263. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.21.13255>

Brown JT, Bai X, Johnson AW (2000) The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA* **6**, 449–457. <https://doi.org/10.1017/S1355838200991787>

Brunner D, Nurse P (2000) CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**, 695–704. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00091-X)

Bühler M, Haas W, Gygi SP, Moazed D (2007) RNAi-Dependent and -Independent RNA Turnover Mechanisms Contribute to Heterochromatic Gene Silencing. *Cell* **129**, 707–721. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.038>

Burns DT, Donkervoort S, Müller JS, Knierim E, Bharucha-Goebel D, Faqeih EA, i sur. (2018) Variants in EXOSC9 Disrupt the RNA Exosome and Result in Cerebellar Atrophy with Spinal Motor Neuronopathy. *American Journal of Human Genetics* **102**, 858–873. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.011>

Callahan KP, Butler JS (2008) Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Research* **36**, 6645–6655. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn743>

Caprara MG (2010) RNA Helicases. *RSC Biomolecular Sciences* , str. 149–167. <https://doi.org/10.1039/9781849732215-00149>

Castaño IB, Heath-Pagliuso S, Sadoff BU, Fitzhugh DJ, Christman MF (1996) A novel family of TRF (DNA topoisomerase I-related function) genes required for proper nuclear segregation. *Nucleic Acids Res* **24**, 2404–2410. <https://doi.org/10.1093/NAR/24.12.2404>

Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**, 467–472. <https://doi.org/10.1038/nature09837>

Chlebowski A, Lubas M, Jensen TH, Dziembowski A (2013) RNA decay machines: The exosome. - Gene Regulatory Mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* **1829**, 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbarm.2013.01.006>

Colin J, Libri D, Porrua O (2011) Cryptic transcription and early termination in the control of gene expression. *Genet Res Int* **2011**, 1–10. <https://doi.org/10.4061/2011/653494>

de Almeida SF, García-Sacristán A, Custódio N, Carmo-Fonseca M (2010) A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination. *Nucleic Acids Research* **38**, 8015–8026. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq703>

Delan-Forino C, Spanos C, Rappsilber J, Tollervy D (2020) Substrate specificity of the TRAMP nuclear surveillance complexes. *Nature Communications* **2020** **11**, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16965-4>

DeLuna A, Springer M, Kirschner MW, Kishony R (2010) Need-based up-regulation of protein levels in response to deletion of their duplicate genes. *PLoS Biology* **8** <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000347>.

Dietrich MR, Ankeny RA, Crowe N, Green S, Leonelli S (2020) How to choose your research organism. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* **80**, 1012–1127. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2019.101227>

Doma MK, Parker R (2007) RNA Quality Control in Eukaryotes. *Cell* **131**, 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.041>

Domingo-Prim J, Endara-Coll M, Bonath F, Jimeno S, Prados-Carvajal R, Friedländer MR, (2019) EXOSC10 is required for RPA assembly and controlled DNA end resection at DNA double-strand breaks. *Nature Communications* **10**. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10153-9>

Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P (2000) Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone. as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* **355**, 1041–1047. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02034-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02034-1)

Egan ED, Braun CR, Gygi SP, Moazed D (2014) Post-transcriptional regulation of meiotic genes by a nuclear RNA silencing complex. *RNA* **20**, 867–881. <https://doi.org/10.1261/RNA.044479.114>

- Egecioglu DE, Henras AK, Chanfreau GF (2006) Contributions of Trf4p- and Trf5p-dependent polyadenylation to the processing and degradative functions of the yeast nuclear exosome. *RNA* **12**, 26–32. <https://doi.org/10.1261/RNA.2207206>
- Egel, R (1994) Regulation of Meiosis and Sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. U: Wessels, J.G.H., Meinhardt, F. (ured.) Growth, Differentiation and Sexuality. *The Mycota*, 1 izd., Springer, Berlin, Heidelberg, str. 251-265. https://doi.org/10.1007/978-3-662-11908-2_14
- Egel R, Egel-Mitani M (1974) Premeiotic DNA synthesis in fission yeast. *Experimental Cell Research* **88**, 127–134. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(74\)90626-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(74)90626-0)
- Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E (2010) SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 313–324. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2010.03.011>
- Falk S, Bonneau F, Ebert J, Kögel A, Conti E (2017) Mpp6 Incorporation in the Nuclear Exosome Contributes to RNA Channeling through the Mtr4 Helicase. *Cell Rep* **20**, 2279–2286. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.08.033>
- Falk S, Weir JR, Hentschel J, Reichelt P, Bonneau F, Conti E (2014) The Molecular Architecture of the TRAMP Complex Reveals the Organization and Interplay of Its Two Catalytic Activities. *Molecular Cell* **55**, 856–867. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.07.020>
- Fang F, Hoskins J, Butler JS (2004) 5-Fluorouracil Enhances Exosome-Dependent Accumulation of Polyadenylated rRNAs. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 10766–10776. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.24.10766-10776.2004>
- Fasken MB, Leung SW, Banerjee A, Kodani MO, Chavez R, Bowman EA, (2011) Air1 zinc knuckles 4 and 5 and a conserved IWRXY motif are critical for the function and integrity of the Trf4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation (TRAMP) RNA quality control complex. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 37429–37445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271494>
- Fasken MB, Morton DJ, Kuiper EG, Jones SK, Leung SW, Corbett AH (2020) The RNA Exosome and Human Disease. *Methods Mol Biol* **2062**, 3–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9822-7_1/COVER
- Feigenbutz M, Garland W, Turner M, Mitchell P (2013) The exosome cofactor Rrp47 is critical for the stability and normal expression of its associated exoribonuclease Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **8**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080752>
- Ferea TL, Botstein D, Brown PO, Rosenzweig RF (1999) Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9721–9726. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.17.9721>

Fielden J, Ruggiano A, Popović M, Ramadan K (2018) DNA protein crosslink proteolysis repair: From yeast to premature ageing and cancer in humans. *DNA Repair* **71**, 198–204. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2018.08.025>

Flores C-L, Rodríguez C, Petit T, Gancedo C (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 507–529. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2000.TB00553.X>

Fraga De Andrade I, Mehta C, Bresnick EH (2020) Post-transcriptional control of cellular differentiation by the RNA exosome complex. *Nucleic Acids Res* **48**, 11913–11928. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA883>

Frazão C, McVey CE, Amblar M, Barbas A, Vornrhein C, Arraiano CM, (2006) Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex. *Nature* **443**, 110–114. <https://doi.org/10.1038/NATURE05080>

Friedman JM (1998) Leptin, Leptin Receptors, and the Control of Body Weight. *Nutrition Reviews* **56**, S38–S46. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.1998.TB01685.X>

Garland W, Feigenbutz M, Turner M, Mitchell P (2013) Rrp47 functions in RNA surveillance and stable RNA processing when divorced from the exoribonuclease and exosome-binding domains of Rrp6. *Rna* **19**, 1659–1668. <https://doi.org/10.1261/rna.039388.113>

Ghoshal K, Jacob ST (1997) An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochemical Pharmacology* **53**, 1569–1575. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00040-3)

Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, (2000) Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **18**, 136–147. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.1.136>

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, (1996) Life with 6000 Genes conveniently among the different interna- Old Questions and New Answers The genome . At the beginning of the se- of its more complex relatives in the eukary- cerevisiae has been completely sequenced Schizosaccharomyces pombe indicate. *Science* (1979) **274**, 546–567. <https://doi.org/jyu>

Graham AC, Kiss DL, Andrulis ED (2009) Core Exosome-independent Roles for Rrp6 in Cell Cycle Progression. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 2242–2253. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>

Gu J, Li Z, Zhou J, Sun Z, Bai C (2019) Response prediction to oxaliplatin plus 5-fluorouracil chemotherapy in patients with colorectal cancer using a four-protein immunohistochemical model. *Oncol Lett* **18**, 2091–2101. <https://doi.org/10.3892/OL.2019.10474>

- Gudipati RK, Xu Z, Lebreton A, Séraphin B, Steinmetz LM, Jacquier A, (2012) Extensive Degradation of RNA Precursors by the Exosome in Wild-Type Cells. *Molecular Cell* **48**, 409–421. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.018>
- Gustavsson M, Ronne H (2008) Evidence that tRNA modifying enzymes are important in vivo targets for 5-fluorouracil in yeast. *RNA* **14**, 666–674. <https://doi.org/10.1261/RNA.966208>
- Gutz H, Schmidt H (1985) Switching genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics* 1985 9:5 **9**, 325–331. <https://doi.org/10.1261/RNA.966208>
- Hamill S, Wolin SL, Reinisch KM (2010) Structure and function of the polymerase core of TRAMP, a RNA surveillance complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15045–15050. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1003505107/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Han J, van Hoof A (2016) The RNA Exosome Channeling and Direct Access Conformations Have Distinct In Vivo Functions. *Cell Rep* **16**, 3348–3358. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.08.059>
- Hayano M, Kanoh Y, Matsumoto S, Renard-Guillet C, Shirahige K, Masai H (2012) Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast. *Genes & Development* **26**, 137–150. <https://doi.org/10.1101/GAD.178491.111>
- Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB (2001) Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**, 1129–1133. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1061457>
- Heinicke S, Livstone MS, Lu C, Oughtred R, Kang F, Angiuoli S, (2007) The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): A Comparative Genomics Analysis Tool for Biologists. *PLOS ONE* **2**, e766. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000766>
- Herskowitz I (1988) Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **52(4)**, 536–553. <https://doi.org/10.1128/mr.52.4.536-553.1988>
- Hill CL, Nguyen AM, Roder D, Roberts-Thomson P (2003) Risk of cancer in patients with scleroderma: a population based cohort study. *Ann Rheum Dis* **62**, 728–731. <https://doi.org/10.1136/ARD.62.8.728>
- Hinnen A, Hicks JB, Fink GR (1978) Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 1929–1933. <https://doi.org/10.1073/PNAS.75.4.1929>
- Hoffman CS, Wood V, Fantes PA (2015) An ancient yeast for young geneticists: A primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system. *Genetics* **201**, 403–423. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181503>
- Hoskins J, Butler JS (2007) Evidence for distinct DNA- and RNA-based mechanisms of 5-fluorouracil cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**, 861–870. <https://doi.org/10.1002/YEA.1516>

- Hoskins J, Scott Butler J (2008) RNA-based 5-fluorouracil toxicity requires the pseudouridylation activity of Cbf5p. *Genetics* **179**, 323–330. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.107.082727>
- Houseley J, Tollervy D (2006) Yeast Trf5p is a nuclear poly(A) polymerase. *EMBO Reports* **7**, 205. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.7400612>
- Huang L, Wong YP, Cai YJ, Lung I, Leung CS, Burd A (2010) Low-dose 5-fluorouracil induces cell cycle G2 arrest and apoptosis in keloid fibroblasts. *Br J Dermatol* **163**, 1181–1185. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2133.2010.09939.X>
- Inoue K, Mizuno T, Wada K, Hagiwara M (2000) Novel RING finger proteins, Air1p and Air2p, interact with Hmt1p and inhibit the arginine methylation of Npl3p. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 32793–32799. <https://doi.org/10.1074/JBC.M004560200>
- Januszyk K, Liu Q, Lima CD (2011) Activities of human RRP6 and structure of the human RRP6 catalytic domain. *RNA* **17**, 1566. <https://doi.org/10.1261/RNA.2763111>
- Jensen TH, Jacquier A, Libri D (2013) Dealing with pervasive transcription. *Molecular Cell* **52**, 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.032>
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1063127>
- Jia H, Wang X, Anderson JT, Jankowsky E (2012) RNA unwinding by the Trf4/Air2/Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 7292–7297. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1201085109/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Johnson JD, Kaiser II, Horowitz J (1980) Effects of 5-fluorouracil on the formation of modified nucleosides in yeast transfer RNA. *Biochim Biophys Acta* **607**, 285–294. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(80\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0005-2787(80)90081-7)
- Johnson Sagolla M, Uzawa S, Cande WZ (2003) Individual microtubule dynamics contribute to the function of mitotic and cytoplasmic arrays in fission yeast. *Journal of Cell Science* **116**, 4891–4903. <https://doi.org/10.1242/JCS.00796>
- Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C (2013) Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **12**, 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd4010>
- Kadaba S, Wang X, Anderson JT (2006) Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. *RNA* **12**, 508–521. <https://doi.org/10.1261/RNA.2305406>

- Kafri R, Levy M, Pilpel Y (2006) The regulatory utilization of genetic redundancy through responsive backup circuits. *PNAS* **103** (31), 11653–11658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604883103>
- Kammler S, Lykke-Andersen S, Jensen TH (2008) The RNA exosome component hRrp6 is a target for 5-fluorouracil in human cells. *Molecular Cancer Research* **6**, 990–995. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2217>
- Kanamaru R, Kakuta H, Sato T, Ishioka C, Wakui A (1986) The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **17**, 43–46. <https://doi.org/10.1007/BF00299864>
- Kellis M, Birren BW, Lander ES (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617–624. <https://doi.org/10.1038/NATURE02424>
- Kelly M, Burke J, Smith M, Klar A, Beach D (1988) Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *The EMBO Journal* **7**, 1537–1547. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1988.TB02973.X>
- Kilchert C, Wittmann S, Vasiljeva L (2016) The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 227–239. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.15>
- Kuai L, Fang F, Butler JS, Sherman F (2004) Polyadenylation of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8581–8586. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0402888101>
- Kushnirov VV. (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**(9), 857–860. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000630\)16:9%3C857::aid-yea561%3E3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000630)16:9%3C857::aid-yea561%3E3.0.co;2-b)
- LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E, Jacquier A, (2005) RNA Degradation by the Exosome Is Promoted by a Nuclear Polyadenylation Complex. **121**, 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.029>
- Ladner R (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr Protein Pept Sci* **2**, 361–370. <https://doi.org/10.2174/1389203013380991>
- Lardenois A, Liu Y, Walther T, Chalmel F, Evrard B, Granovskaia M, (2011) Execution of the meiotic noncoding RNA expression program and the onset of gametogenesis in yeast require the conserved exosome subunit Rrp6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1058–1063. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016459108>
- Lebreton A, Tomecki R, Dziembowski A, Séraphin B (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* **456**, 993–996. <https://doi.org/10.1038/nature07480>

- Lee MG, Nurse P (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* **327**, 31–35. <https://doi.org/10.1038/327031a0>
- Lenz HJ, Manno DJ, Danenberg KD, Danenberg P (1994) Incorporation of 5-fluorouracil into U2 and U6 snRNA inhibits mRNA precursor splicing. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 31962–31968. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)31789-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)31789-7)
- Lingaraju M, Schuller JM, Falk S, Gerlach P, Bonneau F, Basquin J, (2019) To Process or to Decay: A Mechanistic View of the Nuclear RNA Exosome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **86**, 155-163. <https://doi.org/10.1101/sqb.2019.84.040295>
- Liu Q, Greimann JC, Lima CD (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* **127**, 1223–1237. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.10.037>
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* **3**, 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lorentzen E, Basquin J, Tomecki R, Dziembowski A, Conti E (2008) Structure of the Active Subunit of the Yeast Exosome Core, Rrp44: Diverse Modes of Substrate Recruitment in the RNase II Nuclease Family. *Molecular Cell* **29**, 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.018>
- Lubas M, Christensen MS, Kristiansen MS, Domanski M, Falkenby LG, Lykke-Andersen S, (2011) Interaction profiling identifies the human nuclear exosome targeting complex. *Mol Cell* **43**, 624–637. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.06.028>
- Lum PY, Armour CD, Stepaniants SB, Cavet G, Wolf MK, Butler JS, (2004) Discovering Modes of Action for Therapeutic Compounds Using a Genome-Wide Screen of Yeast Heterozygotes. *Cell* **116**, 121–137. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01035-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01035-3)
- Makino DL, Baumgärtner M, Conti E (2013) Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature* **495**, 70–75. <https://doi.org/10.1038/NATURE11870>
- Makino DL, Schuch B, Stegmann E, Baumgärtner M, Basquin C, Conti E (2015) RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* **524**, 54–58. <https://doi.org/10.1038/nature14865>
- Marin-Vicente C, Domingo-Prim J, Eberle AB, Visa N (2015) *RRP6/EXOSC10* is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *J Cell Sci* **128**, 1097–1107. <https://doi.org/10.1242/JCS.158733>
- Mata J, Wilbrey A, Bähler J (2007) Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol* **8**. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-10-r217>
- Matsuo Y, Nishino K, Mizuno K, Akihiro T, Toda T, Matsuo Y, (2013) Polypeptone Induces Dramatic Cell Lysis in *ura4* Deletion Mutants of Fission Yeast. *PLoS ONE* **8**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059887>

- Matthews BJ, Voss hall LB (2020) How to turn an organism into a model organism in 10 “easy” steps. *Journal of Experimental Biology* **223**. <https://doi.org/10.1242/jeb.218198>
- Meola N, Domanski M, Karadoulama E, Chen Y, Gentil C, Pultz D (2016) Identification of a Nuclear Exosome Decay Pathway for Processed Transcripts. *Molecular Cell* **64**, 520–533. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.09.025>
- Midtgaard SF, Assen Holt J, Thyssen Jonstrup A, Van LB, Heick Jensen T, Brodersen DE (2006) Structure of the nuclear exosome component Rrp6p reveals an interplay between the active site and the HRDC domain. *Proc Natl Acad Sci* **103(32)**, 11898–11903. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604731103>
- Milbury KL, Paul B, Lari A, Fowler C, Montpetit B, Stirling PC (2019) Exonuclease domain mutants of yeast *DIS3* display genome instability. *Nucleus* **10**, 1–12. <https://doi.org/10.1080/19491034.2019.1578600>
- Mitchell P (2014) Exosome substrate targeting: the long and short of it. *Biochem Soc Trans* **42**, 1129–1134. <https://doi.org/10.1042/BST20140088>
- Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M, Tollervey D (1997) The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3→5 Exoribonucleases. *Cell* **91(4)**, 457–66. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80432-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80432-8)
- Mitchell P, Tollervey D (2003) An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol Cell* **11**, 1405–1413. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00190-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00190-4)
- Miura K, Kinouchi M, Ishida K, Fujibuchi W, Naitoh T, Ogawa H, (2010) 5-fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs. *Cancers (Basel)* **2**, 1717–1730. <https://doi.org/10.3390/CANCERS2031717>
- Mojardín L, Botet J, Moreno S, Salas M (2015) Chromosome segregation and organization are targets of 5'-Fluorouracil in eukaryotic cells. *Cell Cycle* **14**, 206–218. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.974425>
- Mojardín L, Botet J, Quintales L, Moreno S, Salas M (2013) New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5'-fluorouracil in eukaryotic cells. *PLoS ONE* **8**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078172>
- Morgan BA, Veal EA (2007) Functions of typical 2-Cys peroxiredoxins in yeast. *Subcell Biochem* **44**, 253–265. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_12
- Morton DJ, Kuiper EG, Jones SK, Leung SW, Corbett AH, Fasken MB (2017) The RNA exosome and RNA exosome-linked disease. *RNA* **24(2)**, 127–142. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00152-1)

- Moser BA, Russell P (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* **3**, 631–636. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00152-1)
- Mukarami H, Goto DB, Toda T, Chen ES, Grewal SI, Martienssen RA, (2007) Ribonuclease Activity of Dis3 Is Required for Mitotic Progression and Provides a Possible Link between Heterochromatin and Kinetochore Function. *PLoS ONE* **2**. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000317>
- Mukherjee K, Gardin J, Futcher B, Leatherwood J (2016) Relative contributions of the structural and catalytic roles of Rrp6 in exosomal degradation of individual mRNAs. *RNA* **22(9)**, 1311-1319. <https://doi.org/10.1261/rna.051490.115>
- Müller JS, Burns DT, Griffin H, Wells GR, Zendah RA, Munro B, i sur. (2020) RNA exosome mutations in pontocerebellar hypoplasia alter ribosome biogenesis and p53 levels. *Life Science Alliance* **3**. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000678>
- Nevers A, Doyen A, Malabat C, Néron B, Kergrohen T, Jacquier A, (2018) Antisense transcriptional interference mediates condition-specific gene repression in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **46**, 6009–6025. <https://doi.org/10.1093/nar/gky342>
- Novačić A, Beauvais V, Oskomić M, Štrbac L, le Dantec A, Rahmouni AR, (2021a) Yeast RNA exosome activity is necessary for maintaining cell wall stability through proper protein glycosylation. *Molecular Biology of the Cell* **32**, 363–375. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-08-0544-T>
- Novačić A, Šupljika N, Bekavac N, Žunar B, Stuparević I (2021b) Interplay of the RNA Exosome Complex and RNA-Binding Protein Ssd1 in Maintaining Cell Wall Stability in Yeast. *Microbiology Spectrum* **9**. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00295-21>
- Nurse P (2017) A journey in science: Cell-Cycle control. *Molecular Medicine* **23**, 112–119. <https://doi.org/10.2119/MOLMED.2016.00189/METRICS>
- Nurse P (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* **100**, 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81684-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81684-0)
- Olsen KJ, Johnson SJ (2021) Mtr4 RNA helicase structures and interactions. *Biological Chemistry* **402**, 605–616. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2020-0329>
- Ollis DL, Brick P, Hamlin R, Xuong NG, Steitz TA (1985) Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* **313(6005)**, 762-766. <https://doi.org/10.1038/313762a0>
- Orban TI, Izaurralde E (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* **11**, 459–469. <https://doi.org/10.1261/RNA.7231505>

Orr-Weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6354–6358. <https://doi.org/10.1073/PNAS.78.10.6354>

Pâques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 349–404. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.349-404.1999>

Parker WB, Chi Cheng Y (1990) Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther.* **48(3)**, 381-95. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90056-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90056-8)

Patton JR (1993) Ribonucleoprotein particle assembly and modification of U2 small nuclear RNA containing 5-fluorouridine. *Biochemistry* **32**, 8939–8944. <https://doi.org/10.1021/BI00085A027>

Pérez P, Ribas JC (2017) Fission Yeast Cell Wall Analysis. *Cold Spring Harb Protoc* **2017(11)**. <https://doi.org/10.1101/pdb.top079897>

Phillips S, Butler JS (2003) Contribution of domain structure to the RNA 3' end processing and degradation functions of the nuclear exosome subunit Rrp6p. *RNA* **9**, 1098–1107. <https://doi.org/10.1261/RNA.5560903>

Richard P, Ogami K, Chen Y, Feng S, Moresco JJ, Yates JR, (2018) NRDE-2, the human homolog of fission yeast Nrl1, prevents DNA damage accumulation in human cells. *RNA Biology* **15**, 868–876. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1467180>

Rose MG, Farrell MP, Schmitz JC (2002) Thymidylate synthase: a critical target for cancer chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer* **1**, 220–229. <https://doi.org/10.3816/CCC.2002.N.003>

Rydell-Törmänen K, Johnson JR (2019) The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease. *Methods Mol Biol* **1940**, 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9086-3_1

Sabatinos SA, Mastro TL, Green MD, Forsburg SL (2013) A mammalian-like DNA damage response of fission yeast to nucleoside analogs. *Genetics* **193**, 143–157. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.112.145730/-/DC1>

Samuelsson T (1991) Interactions of transfer RNA pseudouridine synthases with RNAs substituted with fluorouracil. *Nucleic Acids Res* **19**, 6139–6144. <https://doi.org/10.1093/NAR/19.22.6139>

San Paolo S, Vanacova S, Schenk L, Scherrer T, Blank D, Keller W, (2009) Distinct roles of non-canonical poly(A) polymerases in RNA metabolism. *PLoS Genetics* **5**. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000555>

Santi D v., Hardy LW (1987) Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-) methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* **26**, 8599–8606. <https://doi.org/10.1021/BI00400A016>

Santos A, Wernersson R, Jensen LJ (2015) Cyclebase 3.0: a multi-organism database on cell-cycle regulation and phenotypes. *Nucleic Acids Res* **43**, 1140–1144. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU1092>

Schaeffer D, Tsanova B, Barbas A, Reis FP, Dastidar EG, Sanchez-Rotunno M (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nature Structural and Molecular Biology* **16**, 56–62. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1528>

Schilders G, van Dijk E, Pruijn GJM (2007) C1D and hMtr4p associate with the human exosome subunit PM/ScI-100 and are involved in pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Research* **35**, 2564–2572. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM082>

Schmid M, Jensen TH (2018) Controlling nuclear RNA levels. *Nature Reviews Genetics* **19**, 518–529. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0013-2>

Schmid M, Poulsen MB, Olszewski P, Pelechano V, Saguez C, Gupta I (2012) Rrp6p controls mRNA poly(A) tail length and its decoration with poly(A) binding proteins. *Mol Cell* **47**, 267–280. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.05.005>

Schmidt K, Xu Z, Mathews DH, Butler JS (2012) Air proteins control differential TRAMP substrate specificity for nuclear RNA surveillance. *RNA* **18(10)**, 1934–1945. <https://doi.org/10.1261/rna.033431.112>

Schmidt K, Butler JS (2013) Nuclear RNA surveillance: role of TRAMP in controlling exosome specificity. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 217–231. <https://doi.org/10.1002/WRNA.1155>

Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**, 3091–3092. <https://doi.org/10.1093/NAR/18.10.3091>

Schneider C, Leung E, Brown J, Tollervey D (2009) The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Research* **37**, 1127–1140. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN1020>

Schuch B, Feigenbutz M, Makino DL, Falk S, Basquin C, Mitchell P (2014) The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *The EMBO Journal* **33**, 2829–2846. <https://doi.org/10.15252/embj.201488757>

Schuller JM, Falk S, Fromm L, Hurt E, Conti E (2018) Structure of the nuclear exosome captured on a maturing preribosome. *Science* **360**, 219–222. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR5428/SUPPL_FILE/AAR5428_SCHULLER_SM.PDF

Sethy C, Kundu CN (2021) 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **137**. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111285>

Sherman F (2002) Getting Started with Yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3-41. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94004-v](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94004-v)

Silverstein RA, de Valdivia EG, Visa N (2011) The incorporation of 5-fluorouracil into RNA affects the ribonucleolytic activity of the exosome subunit Rrp6. *Molecular Cancer Research* **9**, 332–340. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0084>

Sipiczki M (2000) Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* **1**. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-2-reviews1011>

Sloan KE, Schneider C, Watkins NJ (2012) Comparison of the yeast and human nuclear exosome complexes. *Biochemical Society Transactions* **40**, 850–855. <https://doi.org/10.1042/BST20120061>

Spingola M, Grate L, Haussler D, Manuel A (1999) Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **5**, 221–234. <https://doi.org/10.1017/S1355838299981682>

Srinivas US, Dyczkowski J, Beißbarth T, Gaedcke J, Mansour WY, Borgmann K, i sur. (2015) 5-Fluorouracil sensitizes colorectal tumor cells towards double stranded DNA breaks by interfering with homologous recombination repair. *Oncotarget* **6**, 12574-12586. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3728>

Staals RHJ, Pruijn GJM (2010) The Human Exosome and Disease. U: Jensen, T.H. (ured.) *RNA Exosome. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 702 izd., Springer, New York, NY, str. 132-142. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7841-7_11

Ståhlberg A, Elbing K, Andrade-Garda JM, Sjögren B, Forootan A, Kubista M (2008) Multiway real-time PCR gene expression profiling in yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transcriptional response of ADH-genes to glucose stimuli. *BMC Genomics* **9**. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-170>

Stead JA, Costello JL, Livingstone MJ, Mitchell P (2007) The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor Rrp47p, a nucleic acid-binding protein. *Nucleic Acids Research* **35**, 5556–5567. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm614>

Stuparevic I, Mosrin-Huaman C, Hervouet-Coste N, Remenaric M, Rahmouni AR (2013) Cotranscriptional recruitment of RNA exosome cofactors Rrp47p and Mpp6p and two distinct Trf-Air-Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complexes assists the exonuclease Rrp6p in the targeting and degradation of an aberrant messenger ribonucleoprotein particle (mRNP) in yeast. *J Biol Chem* **288**, 31816–31829. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.491290>

Stuparević I, Novačić A, Rahmouni AR, Fernandez A, Lamb N, Primig M (2021) Regulation of the conserved 3'-5' exoribonuclease EXOSC10/Rrp6 during cell division, development and cancer. *Biological Reviews* **96**, 1092–1113. <https://doi.org/10.1111/brv.12693>

- Teste MA, Duquenne M, François JM, Parrou JL (2009) Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol*. **10**(99). <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-99>
- Tomecki R, Drazkowska K, Kucinski I, Stodus K, Szczesny RJ, Gruchota J, (2014) Multiple myeloma-associated hDIS3 mutations cause perturbations in cellular RNA metabolism and suggest hDIS3 PIN domain as a potential drug target. *Nucleic Acids Res* **42**, 1270–1290. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2010.121>
- Tomecki R, Kristiansen MS, Lykke-Andersen S, Chlebowski A, Larsen KM, Szczesny RJ, (2010) The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J* **29**, 2342–2357. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2010.121>
- Toone WM, Kuge S, Samuels M, Morgan BA, Toda T, Jones N (1998) Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev* **12**, 1453–1463. <https://doi.org/10.1101/GAD.12.10.1453>
- Tuite MF (2019) Yeast models of neurodegenerative diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* **168**, 351–379. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2019.07.001>
- Vaňáčová Š, Wolf J, Martin G, Blank D, Dettwiler S, Friedlein A, (2005) A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol* **3**, 0986–0997. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0030189>
- Vasiljeva L, Buratowski S (2006) Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Mol Cell* **21**, 239–248. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.11.028>
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SIS, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**, 1833–1837. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1074973>
- Vosshall LB (2007) Into the mind of a fly. *Nature* **450**, 193–197. <https://doi.org/10.1038/nature06335>
- Wang C, Liu Y, DeMario SM, Mandric I, Gonzalez-Figueroa C, Chanfreau GF (2020) Rrp6 Moonlights in an RNA Exosome-Independent Manner to Promote Cell Survival and Gene Expression during Stress. *Cell Reports* **31**, 107754. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107754>
- Wang X, Jia H, Jankowsky E, Anderson JT (2008) Degradation of hypomodified tRNA(iMet) in vivo involves RNA-dependent ATPase activity of the DExH helicase Mtr4p. *RNA* **14**, 107–116. <https://doi.org/10.1261/RNA.808608>
- Wasmuth E, Januszyk K, Lima CD (2014) Structure of an Rrp6-RNA exosome complex bound to poly(A) RNA. *Nature* **511**, 435–439. <https://doi.org/10.1038/NATURE13406>

Wasmuth E, Lima CD (2017) The Rrp6 C-terminal domain binds RNA and activates the nuclear RNA exosome. *Nucleic Acids Research* **45**, 846–860. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1152>

Wasmuth E, Lima CD (2012) Exo- and endoribonucleolytic activities of yeast cytoplasmic and nuclear RNA exosomes are dependent on the noncatalytic core and central channel. *Molecular Cell* **48**, 133–144. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.07.012>

Weick EM, Puno MR, Januszyk K, Zinder JC, DiMattia MA, Lima CD (2018) Helicase-Dependent RNA Decay Illuminated by a Cryo-EM Structure of a Human Nuclear RNA Exosome-MTR4 Complex. *Cell* **173**, 1663–1677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.041>

Win TZ, Draper S, Read RL, Pearce J, Norbury CJ, Wang S-W (2006) Requirement of Fission Yeast Cid14 in Polyadenylation of rRNAs. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 1710–1721. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.5.1710-1721.2006>

Wixon J (2002) Featured Organism: *Schizosaccharomyces pombe*, the fission yeast. *Comparative and Functional Genomics* **3**, 194–204. <https://doi.org/10.1002/CFG.92>

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, i sur. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871–880. <https://doi.org/10.1038/NATURE724>

Wyers F, Rougemaille M, Badis G, Rousselle JC, Dufour ME, Boulay J, i sur. (2005a) Cryptic Pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* **121**, 725–737. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.030>

Xie B, Becker E, Stuparevic I, Wery M, Szachnowski U, Morillon A, i sur. (2019) The anti-cancer drug 5-fluorouracil affects cell cycle regulators and potential regulatory long non-coding RNAs in yeast The anti-cancer drug 5-fluorouracil affects cell cycle regulators and potential regulatory long non-coding RNAs in yeast. *RNA Biology* **16(6)**, 727–741. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1581596>

Zhao X, Yu YT (2007) Incorporation of 5-fluorouracil into U2 snRNA blocks pseudouridylation and pre-mRNA splicing in vivo. *Nucleic Acids Research* **35**, 550–558. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL1084>

Zhou BBS, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433–439. <https://doi.org/10.1038/35044005>

Zinder JC, Lima CD (2017) Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev.* **31(2)**, 88–100. <https://doi.org/10.1101/gad.294769>

Zinder JC, Wasmuth E v., Lima CD (2016) Nuclear RNA Exosome at 3.1 Å Reveals Substrate Specificities, RNA Paths, and Allosteric Inhibition of Rrp44/Dis3. *Mol Cell* **64**, 734–745. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.09.038>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, MARINA OSKOMIĆ, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marina Oskomić

Vlastoručni potpis