

Uloga katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6 u održavanju vijabilnosti stanica i stabilnosti stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri povišenoj temperaturi

Oskomić, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:744572>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Marina Oskomić

7517/BT

Uloga katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6 u održavanju vijabilnosti stanica i stabilnosti stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri povišenoj temperaturi

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju**

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Uloga katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6 u održavanju vijabilnosti stanica i stabilnosti stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri povišenoj temperaturi

Marina Oskomić, 0058211879

Sažetak: Eukariotski RNA egzosom esencijalan je i evolucijski očuvan proteinski kompleks koji procesira i degradira molekule RNA. Sastoji se od jezgre, sastavljene od devet strukturnih podjedinica, te dvije katalitičke podjedinice koje imaju 3'→5' egzoribonukleaznu aktivnost, Dis3 i Rrp6. Za razliku od Dis3, podjedinica Rrp6 nije esencijalna za vijabilnost stanica, ali delecija gena koji kodira za Rrp6 rezultira sporijim rastom i temperaturnom osjetljivošću. Rezultati ovog rada pokazali su da je defekt u rastu mutanta *rrp6* pri povišenoj temperaturi posljedica oslabljene stanične stijenke, što dovodi do puknuća stanica u hipoosmolarnom okruženju. Sukladno tome, letalnost i aberantna morfologija ovog mutanta pri povišenoj temperaturi mogu se suprimirati osmotskom stabilizacijom medija. Ovaj rezultat potvrđen je korištenjem tri različite linije sojeva kvasca te uz dva načina osmotske stabilizacije medija. Budući da inaktivacija egzoribonukleazne aktivnosti Rrp6 ne rezultira temperaturnom osjetljivošću, proizlazi da je za održavanje integriteta stanične stijenke pri stresnim uvjetima odgovorna nekatalitička uloga podjedinice Rrp6.

Ključne riječi: kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, RNA egzosom, Rrp6, stanična stijenka

Rad sadrži: 32 stranice, 14 slika, 2 tablice, 53 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr.sc. Igor Stuparević

Pomoć pri izradi: Ana Novačić, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 1. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Role of RNA exosome catalytic subunit Rrp6 in maintaining cell viability and cell wall stability upon heat stress

Marina Oskomić, 0058211879

Abstract: The eukaryotic RNA exosome is an essential and conserved protein complex that processes and degrades RNA molecules. It consists of a 9-subunit structural core and 2 catalytic subunits that provide 3'→5' exoribonuclease activity, Dis3 and Rrp6. Unlike Dis3, Rrp6 is not essential for cell viability, however deletion of the gene encoding Rrp6 results in slower growth and temperature sensitivity. In this work we show that the growth defect of *rrp6* mutant at high temperature arises from a weakened cell wall structure, which leads to cell rupture in the hypoosmolar environment. Accordingly, lethality and aberrant morphology of this mutant at high temperature are suppressed by osmotic stabilization of the medium. This result was validated with three different yeast genetic backgrounds and two ways of osmotic stabilization of growth media. Since inactivation of Rrp6 exoribonuclease activity does not result in temperature sensitivity, this leads to the conclusion that a non-catalytic role of the Rrp6 subunit is responsible for maintaining cell wall integrity under stressful conditions.

Keywords: cell wall, RNA exosome, Rrp6, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 32 pages, 14 figures, 2 tables, 53 references

Original in: Croatian

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

Mentor: assistant prof. Igor Stuparević, PhD

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

Defence date: September 1st 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – opće karakteristike, životni ciklus i primjena.....	2
2.2. Stanična stijenka kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – sastav, struktura i uloga	3
2.3. RNA egzozom.....	5
2.3.1 Katalitička podjedinica RNA egzozoma Rrp6.....	7
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Kemikalije i enzimi	9
3.1.2. Otopine.....	9
3.1.3. Sojevi kvasca, oligonukleotidi	10
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca	11
3.2. Metode	12
3.2.1. Test rasta („plate assay“)	12
3.2.2. Izolacija i taloženje genomske DNA	12
3.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	13
3.2.4. Gel elektroforeza DNA.....	13
3.2.5. Mjerenje aktivnosti enzima alkalne fosfataze u hranjivoj podlozi.....	13
3.2.6. Mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Utjecaj osmotske stabilizacije medija na vijabilnost, morfologiju i integritet stanica mutanata <i>rrp6</i> i <i>rrp6-Y361A</i> iz BMA41 linije sojeva tijekom uzgoja pri povišenoj temperaturi	15
4.2. Utjecaj osmotske stabilizacije medija na vijabilnost i morfologiju stanica mutanata <i>rrp6</i> iz drugih linija sojeva tijekom uzgoja na povišenoj temperaturi	20
4.2.1. Provjera genotipa stanica mutanta <i>rrp6</i> iz BY4741 linije sojeva.....	20
4.2.2. Ispitivanje vijabilnosti i morfologije stanica mutanta BY4741- <i>rrp6</i> i JHY222- <i>rrp6</i> linije sojeva.....	22
4.3. Utjecaj hiperosmolarnosti medija na vijabilnost stanica mutanata <i>rrp6</i> i <i>rrp6-Y361A</i> iz BMA41 linije sojeva tijekom uzgoja pri povišenoj temperaturi	23
4.4. Utjecaj osmotske stabilizacije medija na vijabilnost stanica mutanata <i>rrp6</i> i <i>rrp6-Y361A</i> iz BMA41 linije sojeva tijekom uzgoja pri sniženoj temperaturi	24
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. POPIS LITERATURE	28

1. UVOD

Metabolizam RNA obuhvaća procese poput sinteze, procesiranja i degradacije, koji imaju ključnu ulogu u regulaciji razina staničnih RNA. U većini slučajeva, modifikacije RNA molekula posredovane su aktivnostima RNA egzosoma (Lingaraju i sur., 2020). Ovaj proteinski kompleks lokaliziran je u jezgri i citoplazmi stanice, gdje degradira i procesira skoro sve vrste RNA molekula i stoga ima glavnu ulogu u kontroli kvalitete RNA supstrata (Doma i Parker, 2007). Veliki broj spoznaja o strukturi i funkciji RNA egzosoma proizašli su iz istraživanja na stanicama kvasca *S. cerevisiae*, koji se često koristi kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima, zbog kratkog generacijskog vremena, jednostavnog laboratorijskog uzgoja te činjenice da mu je cjelokupan genom sekvenciran (Dujon, 1996). Svi eukariotski egzosomi sadrže centralnu jezgru sastavljenu od devet proteinskih podjedinica, koja ima strukturnu i regulatornu ulogu (Schmid i Jensen, 2008). Katalitičku aktivnost RNA egzosoma osiguravaju dvije katalitičke podjedinice: Dis3, koja posjeduje egzo- i endoribonukleazne aktivnosti, te Rrp6, koja posjeduje samo egzoribonukleaznu aktivnost (Dziembowski i sur., 2007). Podjedinice jezgre RNA egzosoma te katalitička podjedinica Dis3 esencijalne su za vijabilnost stanica kvasca (Mitchell i sur., 1997), dok je delecija gena koji kodira za podjedinicu Rrp6 vijabilna, no uzrokuje sporiji rast i temperaturnu osjetljivost (Allmang i sur., 1999b). Međutim, zanimljivo je da podjedinica Rrp6 ima nekatalitičku ulogu u održavanju vijabilnosti tijekom stresa uzrokovanog povišenom temperaturom, budući da inaktivacija katalitičke aktivnosti Rrp6 ne rezultira temperaturnom osjetljivošću (Phillips i Butler, 2003). Potencijalni razlog zbog kojeg stanice kvasca kojima nedostaje protein Rrp6 nisu vijabilne prilikom uzgoja na povišenoj temperaturi je kompromitirana stabilnost stanične stijenke, budući da je stanična stijenka vanjski dio stanice koji joj uvjetuje oblik te osigurava fizičku zaštitu i osmotsku stabilnost. Cilj ovog rada bio je ispitati vijabilnost, integritet i morfologiju stanica kojima nedostaje protein Rrp6 ili njegova katalitička aktivnost, pri povišenoj temperaturi, kako bi se dobio uvid u stabilnost stanične stijenke ovih mutanata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* – opće karakteristike, životni ciklus i primjena

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanični eukariotski, nepatogeni organizam koji pripada carstvu gljiva. Veličine je 5 do 10 mikrometara u promjeru i ima okrugli do ovalni oblik. Stanice kvasca postoje u tri stanična oblika od kojih svaki ima prepoznatljivu i važnu ulogu u životnom ciklusu. Stanice haploidnog oblika mogu biti dva tipa parenja (**a** i **α**), dok su stanice diploidnog oblika **a/α** tipa parenja. Tip parenja određen je informacijom kodiranim lokusom *MAT* na III. kromosomu: ako se u tom lokusu nalazi sekvenca *MATa* kvasac je **a** tipa parenja, a ako se u tom lokusu nalazi sekvenca *MATα*, kvasac je **α** tipa parenja (Tamarin, 1999). Haploidni oblik stanica sadrži 16 kromosoma, a diploidni 32. U povoljnim uvjetima, koji uključuju dovoljno kisika, nutrijenata te optimalnu temperaturu rasta, haploidni i diploidni oblik kvasca podliježu mitotičkoj diobi, odnosno pupanju. Tijekom mitoze svih 16 kromosoma haploida i 32 kromosoma diploida se replicira i razdijeli između stanice majke i kćeri. Stanica kćer izdvaja se kao pup iz stanice majke. Stanica kćer manja je od stanice majke i mora se povećati prije početka inicijacije replikacije kromosoma. Pod uvjetima nedostatka hranjivih tvari, prvenstveno izvora ugljika ili dušika, diploidne stanice mogu ući u proces mejoze. Na taj način nastaju 4 haploidne spore koje prokljuju u 2 **a** i 2 **α** stanice. U slučaju fuzije navedenih tipova haploidnih stanica nastaje **a/α** diploid koji sadrži dvije kopije svakog kromosoma (Herskowitz, 1988). Proučavanjem mejoze i mitoze, koji su bitni dijelovi životnog ciklusa kvasca, dobivaju se relevantna saznanja primjenjiva i na stanice viših eukariota. Mnogi kvaščevi geni homologni su genima viših eukariota (Fabrizio i sur., 2001). Trenutna razumijevanja mnogih molekularnih mehanizama u stanicama eukariota temelje se na istraživanjima kvasca *S. cerevisiae*. Osim molekularnih mehanizama, kvasac kao modelni organizam služi za proučavanje staničnih struktura i njihovih funkcija. Bio je važan za identifikaciju različitih proteina koji reguliraju stanični ciklus te kataliziraju DNA replikaciju i transkripciju (Lodish i sur., 1986). Kao modelni organizam koristi se, prvenstveno, zato što mu je cijeli genom sekvenciran (Dujon, 1996). Jednostavan životni ciklus, kratko generacijsko vrijeme, ekonomičan uzgoj i laka genetička manipulacija neke su od poželjnih karakteristika kvasca *S. cerevisiae* koja dodatno doprinose njegovom korištenju kao modelnog organizma. Osim u znanstvenim disciplinama, *S. cerevisiae* kao GRAS (generally regarded as safe) organizam, koristi se i u industrijskoj proizvodnji. Mogućnost fermentacije šećera u alkohole

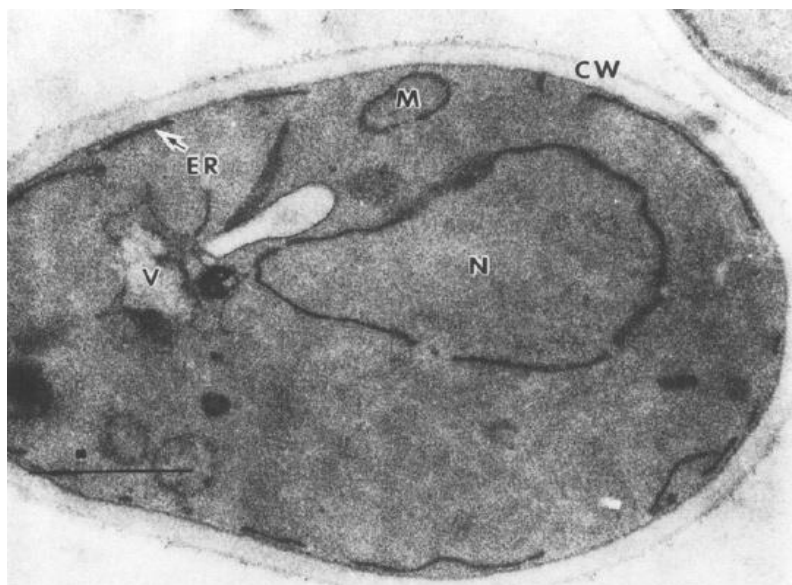
osigurala mu je primjenu u industriji hrane i pića, farmaceutskoj industriji i biotehnologiji (Sherman, 2002). Još jedan važan razlog korištenja *S. cerevisiae* u biotehnologiji je njegova pogodnost za genetske modifikacije putem tehnologija rekombinantne DNA, koje su postale učinkovitije dostupnošću cjelokupnog slijeda genoma.

2.2. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* – sastav, struktura i uloga

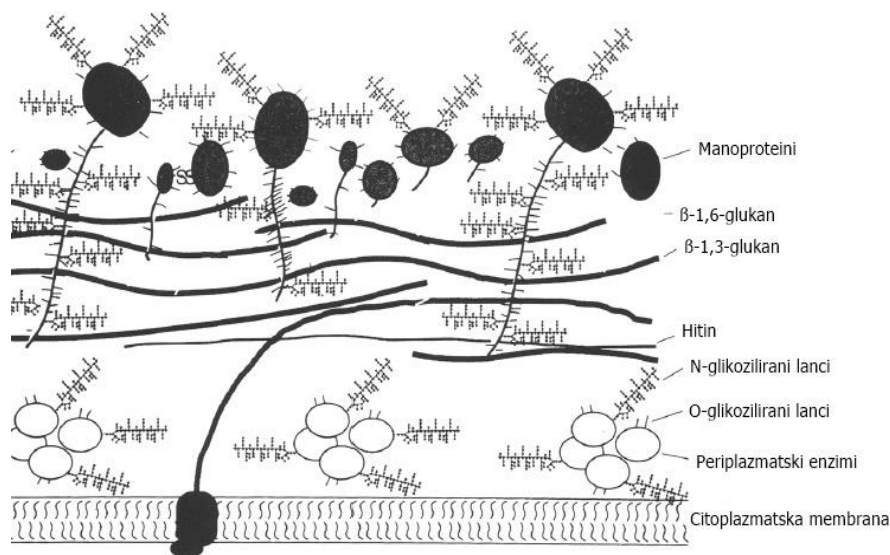
Stanična stijenka je ekstracelularni dio stanice koji stanici osigurava čvrstoću i oblik te štiti citoplazmatsku membranu i citosol te stanične organele unutar nje. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* potrebna je za održavanje oblika stanice i komunikaciju s okolinom, što je neophodno prilikom stvaranja pupova, odnosno diobe stanica. Struktura stanične stijenke stalno se mijenja kako bi se prilagodila različitim procesima u stanici (Cid, 1995). Stanična ekspanzija tijekom vegetativne proliferacije, feromonima inducirana morfogeneza prilikom parenja te filamentacija u stresnim uvjetima neki su od događaja u kojima stanična stijenka ima ključnu ulogu (Harold, 2002). Stanična stijenka osigurava stanici i osmotsku stabilnost, budući da predstavlja selektivnu barijeru kroz koju različite molekule ulaze i izlaze. Stanice kvasca održavaju unutarstaničnu osmolarnost i mogu podnijeti visoki osmotski tlak zahvaljujući čvrstoći stanične stijenke (Klis i sur., 2006). Koncentracija otopljenih tvari u citosolu veća je nego u mediju izvan stanice. Voda i otopljene tvari izvan stanice, u svrhu izjednačavanja koncentracijskog gradijenta, ulaze u stanicu, ali se nastali pritisak jednoliko raspoređuje po površini stanične stijenke.

Stanična stijenka može činiti i do 30% suhe tvari stanice kvasca (Aguilar-Uscanga i François, 2003). Građu stanične stijenke čine polisaharidni polimeri glukan i hitin te manoproteini. Elektronska mikrofografija pokazuje njenu dvoslojnu strukturu (Slika 1), (Osumi, 1998) pri čemu se na unutarnji sloj izgrađen od umreženih polisaharida nadograđuje zaštitni vanjski sloj od manoproteina (Slika 2). Unutarnji sloj izgrađen od β -1,3-glukana i β -1,6-glukana odgovoran je za mehaničku i osmotsku stabilnost zahvaljujući prvenstveno helikalnoj strukturi lanaca β -1,3-glukana (Mrša, 1993). Glukanski unutarnji sloj sastoji se od dva dijela: vlaknastog unutarnjeg i amorfnog vanjskog sloja. Unutarnji vlaknasti sloj izgrađuje β -1,3-glukan zajedno s hitinom. Molekule β -1,3-glukana građene su od oko 1500 glukoznih jedinica međusobno povezanih β -1,3-glikozidnom vezom, a samo 50-ak glukoznih ostataka uključeno je u grananje putem β -1,6-glikozidne veze. Nereducirajući krajevi β -1,3-glukana mogu funkcionirati kao mjesta kovalentnog vezanja s reducirajućim krajevima hitina (Kollar i sur., 1995). S vanjske

strane β -1,3-glukanske mreže nalazi se amorfni sloj vodotopljivog razgranatog polimera β -1,6-glukana. β -1,6-glukan se kovalentno veže na β -1,3-glukan, hitin i manoproteine te tako povezuje sve komponente stanične stijenke te utječe na njenu strukturu i stabilnost. Vanjski sloj, sastavljen od mreže glikoziliranih manoproteina, određuje površinska svojstva stijenke poput poroznosti i ujedno djeluje kao zaštita glukanskog sloja od stranih enzima koji razgrađuju stijenku (De Nobel i Barnett, 1990). Manoproteini su glikozilirani proteini s visokim sadržajem manoze. Ugljikohidratni lanci manoze kovalentno se vežu na proteine u procesu postsintetske glikozilacije. Postoje različiti tipovi glikozilacije kojima manoproteini podliježu: N-glikozilacija asparaginskih ostataka, O-glikozilacija treoninskih ili serinskih ostataka te dodatak glikozil-fosfatidilinozitolnog (GPI) sidra na C-kraju proteina (Herscovics i Orlean, 1993). Rane korake glikozilacije kataliziraju enzimi kodirani esencijalnim genima. Svi oblici glikozilacija neophodni su za rast stanica kvasca te poremećaji u navedenim procesima imaju letalan učinak za stanicu (Tanner i Lehle, 1987). Hitin je linearni polimer β -1,4-N-acetilglukozamina koji čini samo mali postotak (1%) težine suhe tvari stanične stijenke. Linearni lanci se formiranjem vodikovih veza udružuju u mikrofibrile. Rezultat toga je nastajanje strukture koja pridonosi otpornosti pri istezanju stanične stijenke. U kvascu *S. cerevisiae*, hitin se nalazi uglavnom u ožiljcima koji zaostaju nakon pupanja, budući da hitin gradi primarni septum (Shaw i sur., 1991). Polarizirani stanični rast javlja se prilikom pupanja, parenja i filamentoznog rasta te zahtijeva intenzivnu sintezu i ugradnju hitina u staničnu stijenku (Bi i Park, 2012).



Slika 1. Elektronska mikrografija stanice kvasca *S. cerevisiae*, prikaz organela i stanične stijenke. V (vacuole) – vakuola, N (nucleus) – jezgra, M (mitochondria) – mitohondrij, ER (endoplasmic reticulum) - endoplazmatski retikulum, CW (cell wall) – stanična stijenka. Slika preuzeta iz Osumi, 1998.



Slika 2. Skica građe stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Slika preuzeta iz Osumi, 1998.

2.3. RNA egzomom

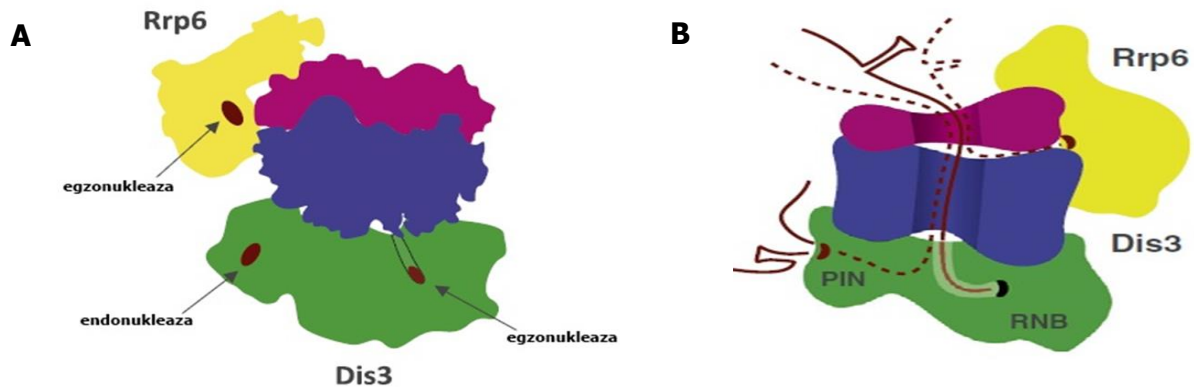
Eukariotske stanice koriste brojne mehanizme za modifikaciju RNA molekula koji su važni za oblikovanje transkriptoma (Doma i Parker, 2007). Veliki dio modifikacija RNA molekula posredovan je proteinskim kompleksom RNA egzomomom, a većina onoga što se danas zna o egzomomu proučavano je u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (Sloan i sur., 2012). To je proteinski kompleks evolucijski očuvan od arheja do viših eukariota koji svojom nukleaznom aktivnošću procesira te degradira veliki broj različitih RNA molekula u jezgri i citoplazmi. Eukariotski RNA egzomom sastoji se od više podjedinica koje su uključene u kontrolu kvalitete, procesiranje i degradaciju RNA supstrata. Funkcija egzosoma u citoplazmi vezana je uz procesiranje mRNA, a u jezgri uz modificiranje rRNA prekursora te skupine malih molekula RNA, kao na primjer male nuklearne i nukleolarne RNA (snRNA/snoRNA, small nuclear/nucleolar RNA) (Gudipati i sur., 2012). Također, egzomom u jezgri sudjeluje u procesu degradiranja aberantnih tRNA, mRNA te „kriptičnih“ nestabilnih transkriptata (CUTs, *Cryptic Unstable Transcripts*), to jest nekodirajućih RNA (Camblong i sur., 2009).

Svi eukariotski egzosomi sadrže katalitički inaktivnu središnju strukturu sastavljenu od 9 proteinskih podjedinica - Exo9, tzv. jezgru (engl. *core*) egzosoma (Büttner i sur., 2005). Sve Exo9 podjedinice prisutne su u jezgrinim i citoplazmatskim egzosomima, štoviše svaka podjedinica neophodna je za vijabilnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Allmang i sur., 1999). Središnji kanal prstenaste Exo9 strukture dovoljno je širok za prolazak samo

jednolančanih RNA molekula (*ssRNA*, *single stranded RNA*), nema ribonukleaznu aktivnost te navodi ssRNA do katalitičke podjedinice egzosoma Dis3. Exo9 jezgra povezuje se s dvije različite ribonukleazne katalitičke podjedinice. U kvascu *S. cerevisiae*, Exo9 stupa u interakcije s katalitičkom podjedinicom Dis3 (poznatom i kao Rrp44), zajedno tvoreći egzosomski kompleks od 10 podjedinica – Exo10^{Dis3}. U jezgri, Exo10^{Dis3} dodatno se povezuje s katalitičkom podjedinicom Rrp6 te njenim kofaktorom, RNA-vezajućim proteinom Rrp47 (poznat i kao C1D u višim eukariotima), čime nastaje kompleks od 12 podjedinica – Exo12^{Dis3/Rrp6/C1D} (Feigenbutz i sur., 2013). Katalitička podjedinica Dis3 ima endoribonukleaznu i 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost, dok Rrp6 ima samo 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost. Domena Dis3 koja ima endonukleazno aktivno mjesto je N-terminalna PIN domena (N-terminal PIIus-forming N-terminus), dok 3' - 5' egzoribonukleazno aktivno mjesto ima RNB domena (Bonneau i sur., 2009). Kristalne strukture egzosomskih RNA kompleksa pokazuju da se Dis3 i Rrp6 nalaze na suprotnim krajevima egzosoma (Slika **3A**). Egzoribonukleazna domena podjedinice Rrp6 nalazi se s vanjske strane jezgre Exo9, a za razliku od toga, egzoribonukleazna domena podjedinice Dis3 okrenuta je prema unutrašnjem kanalu jezgre egzosoma (Wasmuth i Lima, 2017).

Svih 10 gena koji kodiraju za podjedinice Exo10^{Dis3} neophodni su za vijabilnost kvasca (Mitchell i sur., 1997). Mutacije koje narušavaju endoribonukleaznu aktivnost podjedinice Dis3 rezultiraju fenotipskim obilježjima poput sporijeg rasta i nepotpunog procesiranja RNA supstrata. Za razliku od toga, mutacija koja inaktivira katalitičku aktivnost egzoribonukleazne domene pokazuje izraženiji defekt rasta te temperaturnu osjetljivost i potpuni izostanak nukleazne aktivnosti (Schneider i sur., 2007; Chlebowski i sur., 2013). Pojedino aktivno mjesto dovoljno je za vijabilnost stanica, ali istodobna inaktivacija katalitičkih mjesta egzo- ili endoribonukleazne podjedinice Dis3 rezultira letalnošću (Schaeffer i sur., 2009). Iako Rrp6 nije esencijalan, mutant *rrp6* pokazuje sporiji rast i temperaturnu osjetljivost stanica, kao i defekte u procesiranju RNA (Briggs i sur., 1998). Pojedinačni katalitički inaktivni mutanti egzoribonukleaznih podjedinica Dis3 i Rrp6 su vijabilni, ali pokazuju u kombinaciji sintetsku letalnost, što ukazuje na to da ove proteinske podjedinice dijele zajedničke supstrate (Slika **3B**) (Gudipati i sur., 2012). Usprkos funkcionalnom preklapanju, Dis3 i Rrp6 podjedinice sadrže različita mjesta potrebna za vezanje regulatornih faktora ili prepoznavanje različitih supstrata. Sukladno tome, određene reakcije degradiranja i procesiranja RNA u potpunosti ovise samo o jednoj od tih nukleaza (Allmang i sur., 1999a), što je u skladu s biokemijskim i strukturnim studijama koje pokazuju njihove vrlo različite mehanizme djelovanja (Midtgaard i sur., 2006; Lorentzen i sur., 2008). Dok Dis3 degradira strukturirane i nestrukturirane RNA supstrate, Rrp6

djeluje distributivno, preferirajući nestrukturirane supstrate. Djelovanjem obje nukleaze povećava se spektar različitih supstrata RNA egzosoma.



Slika 3. Shematski prikaz eukariotskog RNA egzosoma. Jezgra Exo9 sadrži donji hekasmerni prsten (plavo) s 6 podjedinica, a gornji sloj predstavlja „kapu“ s 3 RNA-vezajuće podjedinice. Ribonukleazne podjedinice Rrp6 (žuto) i Dis3 (zeleno) sadrže egzo- i endoribonukleazna aktivna mjesta. Pozicija Dis3 je ekstrapolirana iz kristalne strukture Dis3p–Rrp41p–Rrp45p trimera kvasca *S. cerevisiae*, a pozicija Rrp6 je dobivena cryo-EM rekonstrukcijom egzosoma *L. terantola* (**A**). Presjek egzosomskog kompleksa i različiti slučajevi prolaska RNA supstrata do katalitičkih podjedinica egzosoma (**B**). Slike preuzete iz Chelbowski i sur., 2013.

2.3.1 Katalitička podjedinica RNA egzosoma Rrp6

Rrp6 (Rrp6, *ribosomal RNA processing*) je polipeptid molekulske mase oko 100 kDa iz obitelji egzonukleaznih RNaza D. Takav tip egzonukleaza karakterizira DEDD motiv u aktivnom mjestu katalitičke domene, odnosno 4 visoko očuvana aminokiselinska ostatka (3 aspartatna i 1 glutamatni) potrebna za razgradnju nukleinskih kiselina u 3' - 5' smjeru hidrolitičkim reakcijskim mehanizmom. Pri tome su dva dvovalentna metalna iona uključena u aktivaciju molekule vode, koja nukleofilno napada fosfodietersku vezu u supstratu (Steitz i Steitz, 1993). U ljudskom i kvaščevom proteinu Rrp6 nalazi se DEDD-Y motiv koji dodatno sadrži tirozinski ostatak bitan za katalizu (Midtgaard i sur., 2006). Rrp6 postoji u jezgri kvasca i ljudi (također poznat kao Exosc10 i PM / Scl100kDa auto-antigen kod ljudi), ali je prisutan i u citoplazmi ljudskih stanica (De Almeida i sur., 2010). U kvascu *Saccharomyces cerevisiae* Rrp6 obuhvaća 733 aminokiselinska ostatka s različitim funkcionalnim domenama. Središnja HRDC (Helicase RNase D C-terminal domain) domena i EXO domena, koja sadrži 3' - 5' egzoribonukleazno aktivno mjesto, zajedno čine katalitički modul (CAT). Rrp6 također sadrži N-terminalnu

PMC2NT domenu te C-terminalnu domenu (CTD) potrebnu za vezanje s egzozomom (Januszyk i Lima, 2014). PMC2NT domena posreduje interakciji Rrp6 podjedinice s proteinskim kofaktorom Rrp47. Glavna funkcija Rrp47 je da omogućuje normalnu razinu ekspresije Rrp6 proteina te njegovu stabilnost (Feigenbutz i sur., 2013). Razina proteina Rrp6 značajno je smanjena u stanicama mutanta *rrp47* tijekom rasta na minimalnoj podlozi, što ukazuje da Rrp47 osigurava adekvatnu razinu ekspresije Rrp6 (Feigenbutz et al., 2013; Stuparevic et al., 2013). EXO domena sadrži prethodno opisani DEDD-Y aminokiselinski motiv. Uvođenjem Y361A točkaste mutacije u domeni EXO, pri čemu je tirozinski ostatak zamijenjen alaninskim, dobije se katalitički inaktivan protein Rrp6 (*rrp6-cat*). Za razliku od mutanta *rrp6*, katalitički mutant *rrp6-cat* pokazuje osjetljivost na hladnoću te, jednako kao i mutant *rrp6*, sporiji rast u usporedbi s divljim tipom pri svim temperaturama (Mukherjee i sur., 2016). Čak i katalitički inaktivni Rrp6 omogućuje degradaciju RNA putem Dis3 podjedinice *in vitro* (Wasmuth i Lima, 2012), što upućuje na nekatalitičku ulogu Rrp6 pri aktivaciji RNA egzosoma. Rrp6 može regulirati katalitičku aktivnost Dis3 zato što se Rrp6 povezuje s vrhom egzosoma (5' cap), gdje RNA molekule ulaze, te potencijalno regulira prolazak RNA kroz jezgru egzosoma do aktivnog mjesta Dis3 (Makino i sur., 2015).

Rrp6 u jezgri kvasca djeluje kao egzozonukleaza potrebna za procesiranje 3' krajeva 5.8S pre-rRNA te različitih vrsta snRNA i snoRNA. HRDC domena ima kritičnu ulogu u toj funkciji Rrp6, zato što mutacije u toj regiji (Δ HRDC) reduciraju sposobnost enzima u procesiranju 3' krajeva pre-5.8 rRNA i pre-snoRNA te se Northern blot analizom može potvrditi akumulacija tih nezrelih RNA molekula (Phillips i Butler, 2003). C-terminalna domena (CTD) Rrp6 podjedinice veže RNA i aktivira nuklearni RNA egzozom. CTD domena Rrp6 podjedinice sastoji se od dva različita modula: regije za povezivanje s egzozomom (EAR, *Exosome Associating Region*) te regije sastavljene od zadnjih 100 ostataka Rrp6 poznate pod nazivom „laso“ koja služi za vezanje, interakciju i aktivaciju egzosoma pri degradaciji RNA. Stanice koje imaju mutiran Rrp6 laso pokazuju slabiju temperaturnu osjetljivost pri rastu na 37°C na minimalnoj podlozi, za razliku od uzgoja na kompletnoj podlozi gdje im je defekt u rastu puno izraženiji. Deletant za EAR regiju Rrp6 podjedinice uzgojen pri 37°C pokazuje temperaturno-osjetljivi fenotip sličan soju *rrp6*, dok mutant za laso regiju Rrp6 pri toj temperaturi raste poput stanica divljeg tipa (Wasmuth i Lima, 2017), što upućuje da je upravo interakcija proteina Rrp6 s RNA egzozomom nužna za vijabilnost stanica pri povišenoj temperaturi. Sve funkcionalne domene egzozonukleazne podjedinice Rrp6 potrebne su za uspješnu distinkciju RNA supstrata predviđenih za 3' - 5' procesiranje i degradaciju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

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

Agar: Liofilchem (Conyers, SAD)

Adenin, aminokiseline, agaroz, etidij bromid, Calcoflour White, *p*-nitrofenilfosfat: Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Kvaščev ekstrakt: Biolife (Milano, Italija)

Pepton: Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, SAD)

Taq DNA polimeraza, deoksiribonukleotidi, standardi za DNA elektroforezu (1kb): New England Biolabs (SAD)

Glukoza: Gram Mol (Zagreb, Hrvatska)

YNB: Difco (SAD)

Sve ostale kemikalije krutog agregatnog stanja koje su korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od proizvođača Acros Organics, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD), dok su kiseline i alkoholi nabavljeni od proizvođača Carlo Erba (Milano, Italija).

3.1.2. Otopine

Za izolaciju genomske DNA kvasca:

Pufer za razbijanje stanica

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1%-tni SDS, 2%-tni Triton X-100, 0,1 M NaCl

Otopina fenola/kloroforma 1:1

Otopina RNaze A

5 g/L ribonukleaze A otapa se u 5 mM Tris-HCl (pH = 7,5), otopina se prokuha 10 minuta radi inaktivacije moguće prisutne deoksiribonukleaze, a nakon hlađenja čuva se na -20 °C

Za mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze:

0.1 M Tris-HCl pufer (pH=8.8)

0.1 M Tris, pH se podešava dodatkom HCl-a

20 mM otopina *p*-nitrofenilfosfata

7,425 g/L *p*-nitrofenilfosfata otapa se u 0,1 M Tris-HCl puferu (pH=8.8), priprema se na dan mjerenja, između mjerenja čuva se na +4 °C

1 M NaOH

3.1.3. Sojevi kvasca, oligonukleotidi

3.1.3.1. Sojevi kvasca

Tablica 1. 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
BMA41 <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
BMA41 <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
BY4741 wt (divlji tip)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann i sur., 1998
BY4741 <i>rrp6</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rrp6::KanMX4</i>	Laboratorij za biokemiju, PBF
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
JHY222 <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

3.1.3.2. Oligonukleotidi

Tablica 2. Oligonukleotidi (početnice) korišteni u ovom radu.

OPIS	SLIJED NUKLEOTIDA 5'→3'	VELIČINA UMNOŽENOG FRAGMENTA DNA
Provjera delecije gena <i>RRP6</i>	RRP6_fwd: CCCAAAAATATGAGGGCATCGG RRP6_rev: AAAATGGTGTGCATGGGGGA	S genomskom DNA divljeg tipa: 2434 bp S genomskom DNA mutanta <i>rrp6</i> : 1716 bp

3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca

Za uzgoj sojeva kvasca *S. cerevisiae* korištene su YPD i YNB hranjive podloge. U tekuće hranjive podloge, nakon sterilizacije autoklaviranjem, dodaje se sterilizirana otopina glukoze do finalne koncentracije 20 g/L. U krute hranjive podloge, prije sterilizacije, uz otopinu glukoze dodaje se i agar, koncentracije 16 g/L.

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) hranjiva podloga

Krute YPD podloge korištene su za test rasta (engl. „plate assay“). Sastav im je: pepton 20 g/L, kvaščev ekstrakt 10 g/L i adenin 0.1 g/L. Za osmotsku stabilizaciju hranjive podloge dodan je 1 M sorbitol ili 1 M saharoza. Za induciranje osmotskog stresa u podlogu je dodan 1.5 M sorbitol.

YNB (Yeast Nitrogen Base) hranjiva podloga

Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze provedeno je u tekućoj YNB podlozi (Yeast Nitrogen Base) 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.

Drop out: adenin 3 g/L alanin 2 g/L arginin 2 g/L asparagin 2 g/L asparaginska kiselina 2 g/L cistein 2 g/L glutamin 2 g/L glutaminska kiselina 2 g/L glicin 2 g/L inozitol 2 g/L izoleucin 2 g/L lizin 4 g/L metionin 2 g/L *p*-aminobenzojeva kiselina 0,2 g/L fenilalanin 2 g/L prolin 2 g/L serin 2 g/L treonin 2 g/L tirozin 2 g/L valin 2 g/L.

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 agensima te pri različitim temperaturama. Stanice kvasca uzgojene su u tekućoj YPD podlozi na 30°C do logaritamske faze rasta, zatim je spektrofotometrijski određena gustoća kulture (OD_{600}/mL) te je gustoća kulture 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 YPD podlogu sa ili bez odgovarajućeg agensa. Podloge su inkubirane pri 30°C ili 37°C tijekom 3 dana i fotografirane Uvidoc HD6 kamerom. U slučaju inkubacije podloga pri 14°C, fotografirane su nakon 10 dana.

3.2.2. Izolacija i taloženje genomske DNA

Stanice kvasca uzgajane su na rotacijskoj tresilici u 10 mL YPD podloge na 30°C do stacionarne faze rasta ($OD_{600} \sim 6 \text{ OD}/\text{mL}$). Cijeli volumen suspenzije centrifugiran je (6'/6000 rpm) i talog stanica resuspendiran je u 1 mL sterilne vode, te prebačen u Eppendorf epruvetu. Nakon centrifugiranja (1.5'/11000 rpm) talog je resuspendiran u 200 μL pufera za razbijanje stanica. Dodano je 200 μL otopine fenola i kloroforma (1:1) i otprilike 300 μL staklenih kuglica, zatim je suspenzija vorteksirana na najvećoj brzini 4 minute. Dodano je 200 μL TE pufera. Nakon centrifugiranja (5'/13000 rpm) je oko 400 μL gornje vodene faze, koja je sadržavala DNA, pažljivo otpipetirano u novu Eppendorf epruvetu. Dodano je 2,5x volumena hladnog 96%-tnog etanola u svrhu taloženja DNA te je ostavljeno na -20°C 15 minuta. Talog DNA otopljen je u 400 μL TE pufera i dodano je 5 μL RNaze A. Suspenzija je inkubirana u termobloku na 37°C, 30 minuta. Suspenziji su dodani otopina NaCl-a do koncentracije 0,2 M pa 2,5x volumena hladnog 96%-tnog etanola, u svrhu taloženja DNA pa je sve promiješano naglim okretanjem Eppendorf epruvete. Sve je ostavljeno na -20 °C preko noći. Suspenzija je centrifugirana (10'/11000 rpm) pri +4°C, supernatant je odbačen, a talog ispran s 0.5 ml 70%-tnog hladnog etanola. Nakon centrifugiranja (2'/11000 rpm) pri +4°C ponovno je odbačen supernatant. Talog, osušen na zraku 15 minuta uz plamen otvorenog plamenika, otopljen je u 500 μL TE pufera u termobloku pri 45°C.

3.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda za umnožavanje specifičnih sekvenci DNA. U ovom radu korištena je u analitičke svrhe s ciljem provjere delecije gena *RRP6*. Reakcijska smjesa od 50 µL sadržavala je: 1 µL genomske DNA izolirane iz odgovarajućeg soja – BY4741 divljeg tipa (ishodni soj) ili BY4741 *rrp6*, 1 µL 10 mM otopine svakog od 4 dNTP-a, 2.5 µL 10 µM otopine svake od početnica *forward* (CCCAAAAATATGAGGGCATCGG) i *reverse* (AAAATGGTGTGCATGGGGGA), 1 µL Taq polimeraze, 5 µL 10x Taq reakcijskog pufera i 37 µL sterilne vode. Reakcija se odvijala prema programu: 4' 95°C // 30x (30'' 95°C/ 30'' 59°C/ 2.5' 72°C) // 7' 72°C

3.2.4. Gel elektroforeza DNA

Gel elektroforeza je analitička i preparativna metodom kojom se vrši separacija fragmenata DNA pomoću migracije kroz kruti nosač u električnom polju. U ovom radu korištena je horizontalna elektroforeza DNA u 0,8% agaroznom gelu pripremljenom otapanjem agaroze u 1x TAE puferu puferu pri naponu 90 V. Uzorci za elektroforezu pomiješani su s bojom za nanošenje uzoraka te injektirani u jažice gela uronjenog u TAE pufer u kadici za elektroforezu. Nakon elektroforeze gel je namakan u otopini etidijevog bromida 15 minuta. DNA u gelu vizualizirana je pomoću uređaja Uvidoc HD6 uz UV svjetlo.

3.2.5. Mjerenje aktivnosti enzima alkalne fosfataze u hranjivoj podlozi

Sojevi kvasca uzgajani su tekućoj YNB hranjivoj podlozi na rotacijskog tresilici na 30°C do logaritamske faze rasta. Odgovarajući volumen suspenzije je centrifugiran (5'/3000 rpm), te su stanice resuspendirane u tekućoj YNB hranjivoj podlozi na koncentraciju 0.3 OD/mL i inkubirane na rotacijskoj tresilici na 37°C tijekom 48 sata. Uzet je volumen podloge za mjerenje OD₆₀₀ vrijednosti suspenzije stanica. Također, alikvot suspenzije stanica je centrifugiran (90''/11000 rpm) i pripremljene su dvije tehničke paralele svakog uzorka pipetiranjem 0.5 mL supernatanta (hranjive podloge) u epruvete. Epruveta sa slijepom probom sadržavala je po 0.25 mL hranjive podloge bilo koja 2 soja. U međuvremenu je pripremljena 20 mM otopina *p*-nitrofenilfosfata u Tris-HCl puferu (pH 8.8). Uzorci i supstrat inkubirani su 5 minuta u vodenoj kupelji pri 30°C, nakon čega je reakcija započeta dodatkom 0.5 mL otopine supstrata u svaku

od dvije paralele. Nakon 45 minuta, reakcija je zaustavljena dodatkom 0.5 mL 1 M otopine natrijeva hidroksida, istim redoslijedom kojim se dodavao i supstrat, čime se denaturira enzim. Slijepa proba sadržavala je sve komponente reakcije, ali je NaOH dodan prije supstrata pa je enzimska reakcija odmah zaustavljena, kako bi dobivena količina produkta u slijepoj probi bila rezultat isključivo spontanog raspada supstrata. Uzorci su bili korišteni za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije produkta (*p*-nitrofenol) koji u lužnatome daje žuto obojenje. Apsorbancija uzorka pri 420 nm proporcionalna je koncentraciji produkta, a aktivnost enzima računa se prema formuli:

$$\text{Aktivnost alkalne fosfataze} = \frac{A_{420} \times 10000}{\text{OD}_{600} \text{ suspenzije stanica} \times t \text{ reakcije (min)} \times (V \text{ uzorka} / V \text{ reakcijske smjese)}}$$

3.2.6. Mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom

Metoda za mikroskopiranje uključivala je korištenje boje Calcofluor White koja se kao nespecifični fluorokrom veže na hitin stanične stijenke kvasca. Na predmetnicu je dodana voda i ezom je resuspendiran kvasac te je dodan jednak volumen boje Calcofluor White (1 mg/mL). Predmetnica je prekrivena pokrovnicom te je dodana kap imerzijskog ulja i sve je vizualizirano fluorescentnim optičkim mikroskopom Olympus BX51 uz povećanje 100x/1.4 N.A. Budući da su prikladne valne duljine za ekscitaciju boje 300-440 nm, korišten je DAPI filter.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Eukariotski RNA egzozom esencijalni je RNazni kompleks sastavljen od 12 različitih podjedinica, čija uloga je procesiranje, kontrola kvalitete te degradiranje RNA molekula (Schmid i Jensen, 2008). Supstrate RNA egzozoma u jezgri i citoplazmi čini širok spektar RNA molekula, od pre-rRNA, tRNA, mRNA do sn/sno RNA te niza nekodirajućih RNA (Sloan i sur., 2012). Rrp6 je jedna od dvije katalitičke podjedinice RNA egzozoma kvasca *S. cerevisiae* koja ima 3' - 5' egzoribonukleaznu aktivnost. Podjedinica Rrp6 ima ključnu ulogu u jezgri stanice kvasca, gdje sudjeluje u degradaciji i formiranju 3'-kraja RNA molekula (Callahan i Butler, 2008). Rrp6 je jedina neesencijalna podjedinica RNA egzozoma, no stanice mutanta *rrp6* pokazuju temperaturno-osjetljivi fenotip (Allmang i sur., 1999b). Razlog temperaturne osjetljivosti mutanta *rrp6* nije poznat, ali zanimljivo je da stanice katalitičkih mutanata *rrp6*

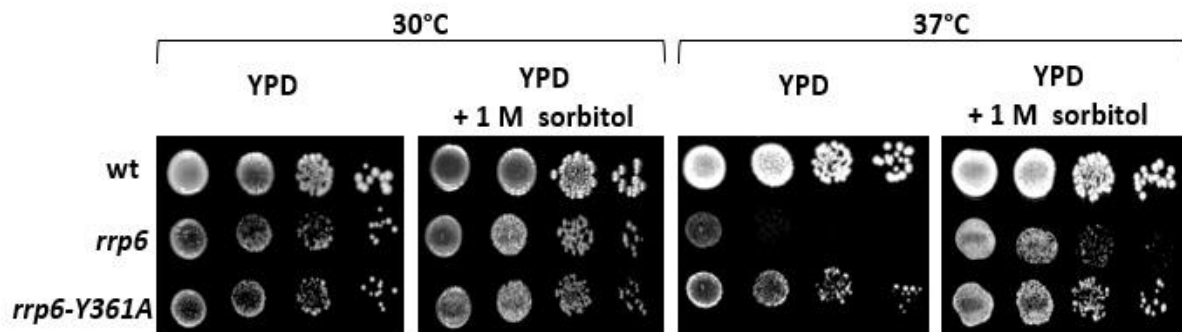
pokazuju značajno bolji rast pri povišenoj temperaturi od stanica mutanta *rrp6* (Phillips i Butler, 2003), što upućuje na nekatalitičku ulogu Rrp6 u osiguravanju vijabilnosti stanica pri povišenoj temperaturi.

Nedavno je pokazano da su stanice mutanta *rrp6* preosjetljive na agense koji oštećuju staničnu stijenk, poput boja Congo Red i Calcofluor White (neobjavljeni rezultati Laboratorija za biokemiju). Stanična stijenk kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kao vanjski omotač stanice, diktira morfološke karakteristike poput oblika i čvrstoće, a uloga stijenke značajna je tijekom rasta, diobe i stresnih uvjeta u kojima se stanica može naći tijekom svog životnog ciklusa (Cid, 1995). Stanična stijenk kompleksne je strukture, građene od polisaharida glukana i hitina te proteina. Cilj ovog rada bio je ispitati je li narušen integritet stanične stijenke mutanta *rrp6* uzrok prethodno utvrđene temperaturne osjetljivosti. U tu svrhu je ispitan utjecaj osmotske stabilizacije medija za uzgoj na rast temperaturno-osjetljivog mutanta *rrp6* pri povišenoj temperaturi. Narušavanje integriteta stanične stijenke razlog je zašto stanice pucaju te umiru u hipoosmolarnom okruženju, a osmotski stabilizator doprinosi stabilizaciji medija stvarajući uvjete u kojima mutanti s narušenim integritetom stijenke mogu preživjeti.

4.1. Utjecaj osmotske stabilizacije medija na vijabilnost, morfologiju i integritet stanica mutanata *rrp6* i *rrp6-Y361A* iz BMA41 linije sojeva tijekom uzgoja pri povišenoj temperaturi

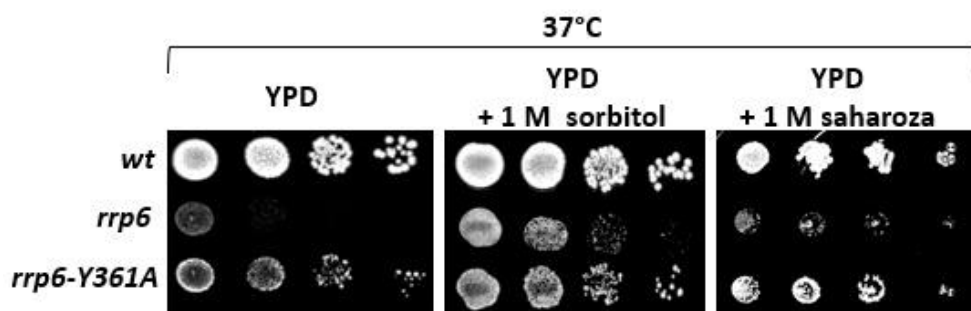
U svrhu ispitivanja vijabilnosti stanica kvasca uzgojenih u različitim uvjetima, proveden je test rasta (engl. „plate assay“). Test rasta omogućuje identifikaciju stanica koje se mogu dijeliti pri određenim uvjetima, a metoda je semi-kvantitativna te se zasniva na uspoređivanju rasta mutanata sa kontrolnim stanicama divljeg tipa (Kwolek-Mirek i Zadragec, 2014). Ispitan je rast stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* divljeg tipa (wild type, wt) iz BMA41 linije sojeva te izogenih mutanata *rrp6* i *rrp6-Y361A* na YPD podlozi sa i bez osmotskog stabilizatora (1 M sorbitol) 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). Nakon 3 dana nije vidljiva razlika u rastu između sojeva prilikom uzgoja na 30°C (Slika 4). Međutim, nakon uzgoja na 37°C bez dodatka sorbitola uočljiv je defekt u rastu mutanta *rrp6*, čime je potvrđena prije spomenuta temperaturna osjetljivost, odnosno nemogućnost rasta ovog mutanta pri povišenoj temperaturi, dok stanice divljeg tipa i mutanta *rrp6-Y361A* očekivano pokazuju normalan rast

(Slika 4). Kada je u podlogu dodan 1 M sorbitol kao osmotski stabilizator, omogućen je rast mutanta *rrp6* pri 37°C.



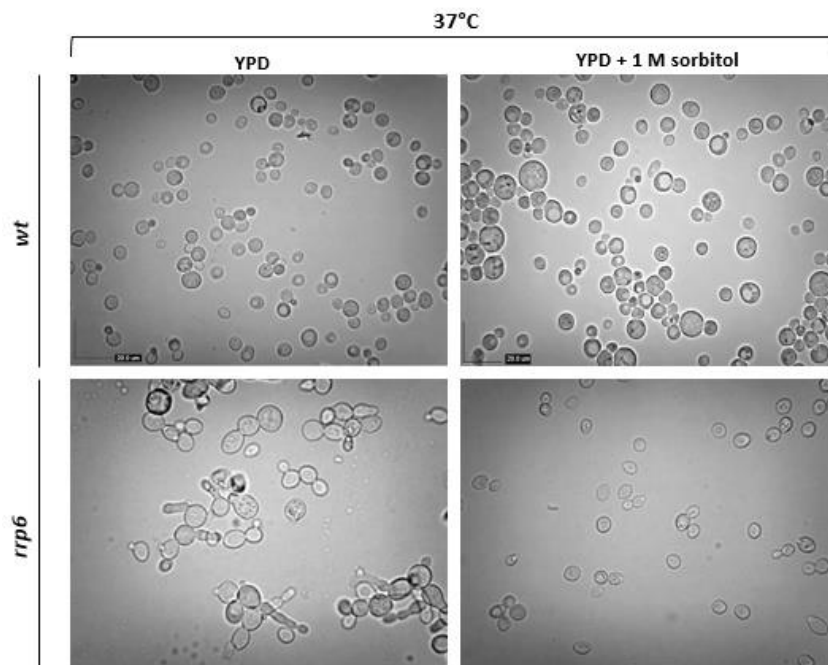
Slika 4. Vijabilnost stanica kvasca analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa BMA41 te izogenih mutanata *rrp6* i *rrp6-Y361A* uzgojene su u YPD podlozi do logaritamske faze rasta na 30°C te su decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena na 30°C i 37°C. Pri obje temperature u medij je dodan 1 M sorbitol. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta.

Kako bi se provjerilo je li za spašavanje rasta mutanta *rrp6* pri 37°C odgovorna osmotska stabilizacija medija ili specifično dodatak sorbitola, testiran je i drugi osmotski stabilizator, 1 M saharoza. Dodatkom saharoze također je suprimiran defekt u rastu mutanta *rrp6* pri 37°C (Slika 5), čime je pokazano da je za spašavanje fenotipa odgovorna osmotska stabilizacija koja nije svojstvena samo sorbitolu.



Slika 5. Vijabilnost stanica kvasca analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa BMA41 te izogenih mutanata *rrp6* i *rrp6-361A* uzgojene su u YPD podlozi do logaritamske faze rasta na 30°C te su decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena na 37°C. Pri toj temperaturi uspoređen je rast stanica u podlozi bez osmotskog stabilizatora i s različitim osmotskim stabilizatorima: 1 M sorbitolom i 1 M saharozom. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta.

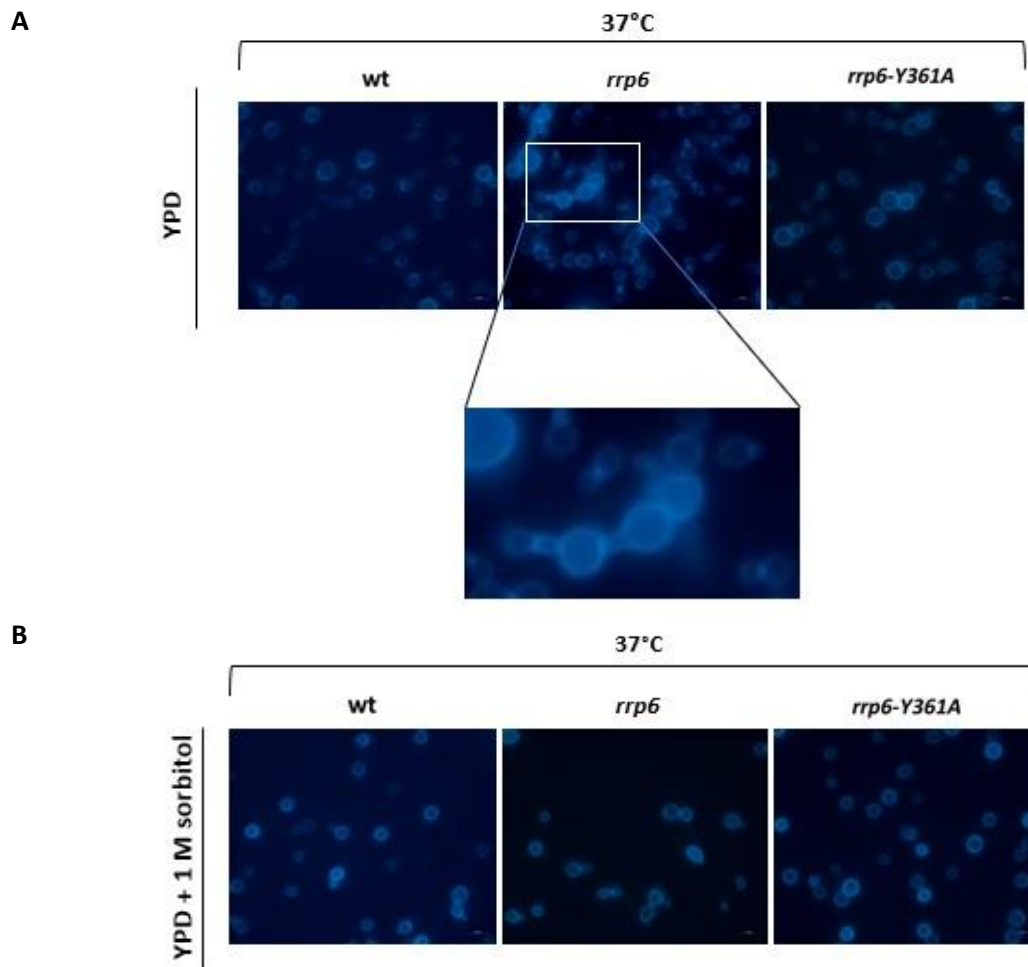
Spašavanje defekta u rastu temperaturno-osjetljivog mutanta *rrp6* pomoću osmotske stabilizacije medija upućuje na destabilizaciju stanične stijenke. U prilog tome govore i morfološke promjene u izgledu stanica, koje se mogu uočiti mikroskopiranjem. Stanice mutanta *rrp6* uzgojene na povišenoj temperaturi bez sorbitola povećane su, deformirane i izdužene u odnosu na stanice divljeg tipa (Slika 6). Asimetrični oblik i veliki volumen stanica indicira na veću propusnost ovih stanica za vodu, zbog narušavanja integriteta stanične stijenke. Također, pri povišenoj temperaturi stanice mutanta *rrp6* tvore nizove od nekoliko stanica, što sugerira na potencijalni defekt prilikom njihovog dijeljenja (Ufano i sur., 2004). Abnormalna morfologija mutanta *rrp6* uočljiva kod uzgoja stanica u mediju bez sorbitola, potpuno je izostala kod stanica uzgojenih u osmotski stabiliziranom mediju unatoč povišenoj temperaturi (Slika 6).



Slika 6. Morfologija stanica divljeg tipa i mutanta *rrp6* iz BMA41 linije sojeva uzgojenih pri 37°C u YPD podlozi bez i sa osmotskim stabilizatorom sorbitolom. Stanice su vizualizirane svjetlosnim mikroskopom opremljenim s Dino-Lite digitalnom kamerom nakon 3 dana rasta.

Aberantni fenotip stanica mutanta *rrp6* uzgojenih pri povišenoj temperaturi primijećen je i prilikom vizualizacije fluorescentnim mikroskopom nakon bojanja Calcofluor White bojom. Boja Calcofluor White veže se na hitin, koji je lokaliziran prvenstveno u pupovima i ožiljcima nastalim na stanicama prilikom odvajanja (Rasconi i sur., 2009). Bojanje stanica intenzivnije je na mjestima odvajanja stanica, to jest na septumu između pupa i stanice majke (Slika 7A).

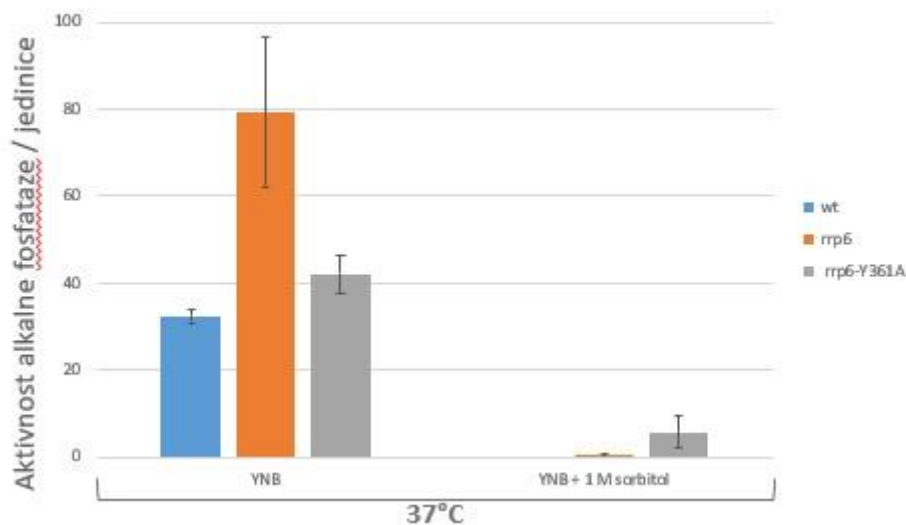
Time je pokazano da je rast stanica mutanta *rrp6* u nizovima doista posljedica defekta u odvajanju stanica nakon diobe. Za razliku od mutanta *rrp6*, stanice divljeg tipa i katalitičkog mutanta *rrp6-Y361A* zadržavaju karakterističan sferičan oblik. Kao što je prethodno utvrđeno, dodatkom 1 M sorbitola u hranjivu podlogu moguće je postići izotonične uvjete rasta te stanice mutanta *rrp6* uzgojene u takvoj podlozi zadržavaju oblik stanica divljeg tipa i katalitičkog mutanta, unatoč povišenoj temperaturi (Slika **7B**).



Slika 7. Morfologija stanica kvasca iz BMA41 linije sojeva. Sojevi divljeg tipa, mutanta *rrp6* i katalitičkog mutanta *rrp6-Y361A* uzgojeni su pri 37°C u YPD podlozi bez (**A**) i sa 1 M sorbitolom (**B**). Stanice su obojane Calcofluor White bojom i vizualizirane fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51 nakon 3 dana rasta.

Prethodni eksperiment s testom rasta indicira da su stanice mutanta *rrp6* temperaturno-osjetljive zato što dolazi do njihovog pucanja, tj. lize, prilikom uzgoja u

hiposmolarnom mediju. Mjerenjem aktivnosti alkalne fosfataze, inače unutarstaničnog enzima, u mediju nakon uzgoja stanica može se kvantitativno dobiti uvid u razinu lize stanica (Molina i sur., 1998). Stanice divljeg tipa (wt), mutanta *rrp6* i katalitičkog mutanta *rrp6-Y361A* uzgojene su u tekućoj YNB podlozi pri 30°C do logaritamske faze rasta te su precijepljene u istovjetnu podlogu sa i bez dodatka sorbitola kao osmotskog stabilizatora te je aktivnost alkalne fosfataze u mediju izmjerena nakon 3 dana inkubacije na 37°C (Vidi materijale i metode).



Slika 8. Pucanje stanica praćeno je mjerenjem aktivnosti enzima alkalne fosfataze sa stanicama divljeg tipa, mutanta *rrp6* i katalitičkog *rrp6-Y361A* mutanta iz BMA41 linije sojeva. Stanice su uzgojene u tekućoj YNB podlozi tijekom jednog dana na 30°C zatim su precijepljene u istovjetnu podlogu bez i sa sorbitolom te su inkubirane 3 dana na 37°C. Aktivnost alkalne fosfataze izmjerena je u mediju za uzgoj nakon izdvajanja stanica. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Uzgojem u podlozi bez sorbitola na 37°C, eksperimentalni podaci pokazali su da dolazi do barem djelomične lize stanica sva 3 soja, koja se praktički u potpunosti suprimira osmotskom stabilizacijom (Slika 8). Također, usporedbom sojeva vidljivo je da mutanta *rrp6* obilježava najveći stupanj lize stanica, budući da je u mediju u kojem su uzgojene stanice tog mutanta izmjerena otprilike dvostruko veća razina aktivnosti alkalne fosfataze u odnosu na stanice divljeg tipa i katalitičkog mutanta (Slika 8). Pretpostavka je da stanice mutanta *rrp6* imaju defekt u staničnoj stijenci te ih odsutstvom osmotskog stabilizatora njihovo

hiposmolarno okruženje čini podložnijima za ulazak vode. Pretjeranim ulaskom vode kroz staničnu stijenku, čiji je integritet narušen, povećava se volumen stanica te one pucaju. Nasuprot tome, stanice koje su rasle u podlozi sa sorbitolom nisu sklone pucanju kao stanice u podlozi bez osmotske stabilizacije. Dakle, osmotska stabilizacija medija u potpunosti može suprimirati defekt u integritetu stanične stijenke koji dovodi do lize stanica.

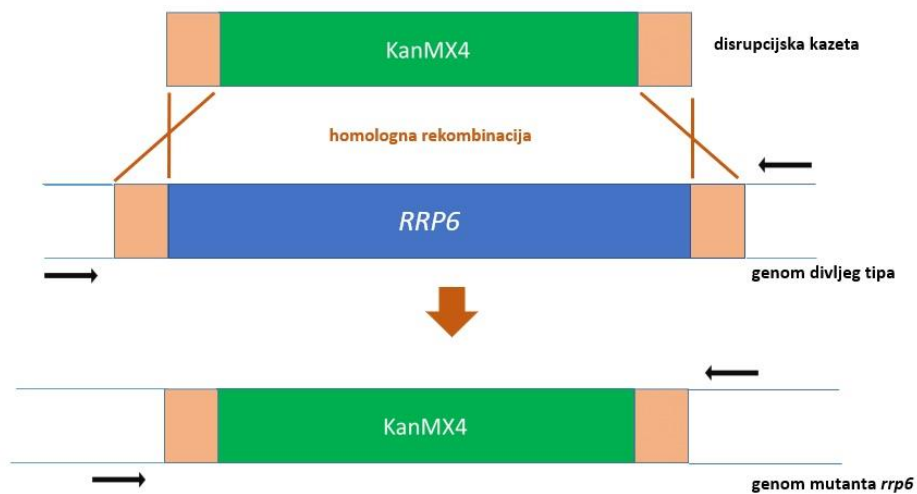
4.2. Utjecaj osmotske stabilizacije medija na vijabilnost i morfologiju stanica mutanata *rrp6* iz drugih linija sojeva tijekom uzgoja na povišenoj temperaturi

Premda je pokazano da se osmotskom stabilizacijom medija može spasiti rast mutanta *rrp6* iz BMA41 linije sojeva, bilo je potrebno provjeriti može li se isti efekt uočiti i u drugim linijama sojeva. Također, obzirom na rezultate testova rasta i morfologije BMA41 linije sojeva, bilo je potrebno ispitati vijabilnost i morfologiju mutanta *rrp6* u drugim linijama sojeva. U tu svrhu korištena je linija haploidnog soja BY4741, te linija diploidnog soja JHY222. Stanice mutanta BY4741-*rrp6* najprije su bile podvrgnute genotipizaciji. Vijabilnost u obje linije sojeva ispitana je testovima rasta, a morfologija stanica mikroskopiranjem svjetlosnim mikroskopom.

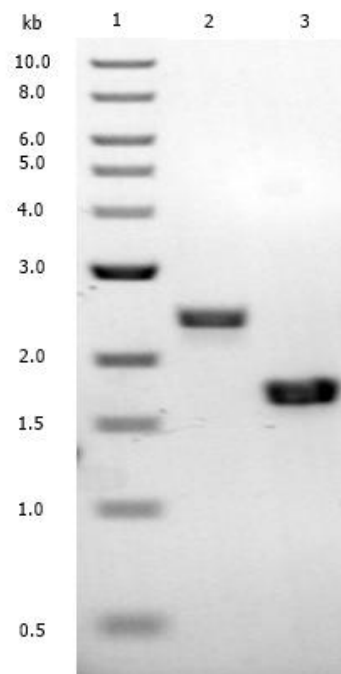
4.2.1. Provjera genotipa stanica mutanta *rrp6* iz BY4741 linije sojeva

Za stanice mutanta *rrp6* iz BY4741 linije sojeva koje su prethodno konstruirane u laboratoriju, prije provođenja testa rasta bilo je potrebno provjeriti genotip. Izolirana je genomska DNA iz stanica divljeg tipa i mutanta *rrp6* te je analitičkom lančanom reakcijom polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) umnožen lokus gena *RRP6*. Konstrukcija mutanta *rrp6* prikazana je na skici (Slika 9) koja pokazuje ugrađivanje disrupcijske kazete *rrp6::KanMX4* u genom divljeg tipa, pri čemu dolazi do homologne rekombinacije, odnosno zamjene gena *RRP6* marker genom KanMX4. Kod provjere genotipa, PCR-om se iz genomske DNA umnaža gen *RRP6*, pri čemu su korištene početnice koje se hibridiziraju uzvodno i nizvodno od gena *RRP6*, odnosno gena KanMX4 kod mutanta *rrp6* (crne strelice na Slici 9). Na taj način prilikom korištenja genomske DNA mutanta *rrp6* kao kalupa dolazi do umnažanja kraćeg fragmenta nego u slučaju genomske DNA divljeg tipa, jer se na tom lokusu u genomu mutanta nalazi marker gen KanMX4 koji je kraći od gena *RRP6*. Produkti PCR-a analizirani su gel elektroforezom DNA te su vidljive dvije vrpce koje po duljini odgovaraju očekivanim

fragmentima umnoženim iz genoma divljeg tipa i mutanta *rrp6*, što je potvrda uspješnosti konstrukcija mutanta *rrp6* u BY4741 liniji sojeva (Slika 10).



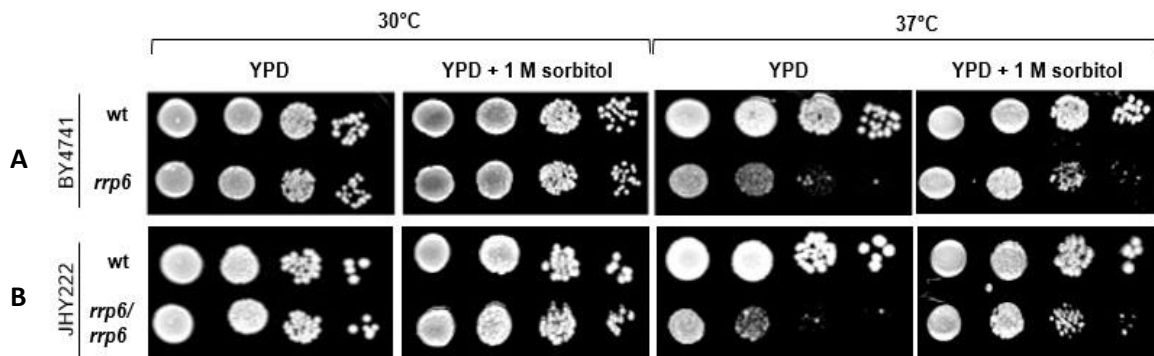
Slika 9. Shematski prikaz homologne rekombinacije s ciljem zamjene gena *RRP6* s disrupcijskom kazetom *rrp6::KanMX4*. Početnice korištene za genotipizaciju prikazane su crnim strelicama.



Slika 10. Provjera uspješnosti umetanja disrupcijske kazete KanMX4 u genom divljeg tipa (wt) BY4741 metodom PCR. 1. standardi (NEB 1 kb DNA Ladder), 2. fragment DNA umnožen s genomsom DNA divljeg tipa, 3. fragment DNA umnožen s genomsom DNA mutanta *rrp6*.

4.2.2. Ispitivanje vijabilnosti i morfologije stanica mutanta BY4741-*rrp6* i JHY222-*rrp6* linije sojeva

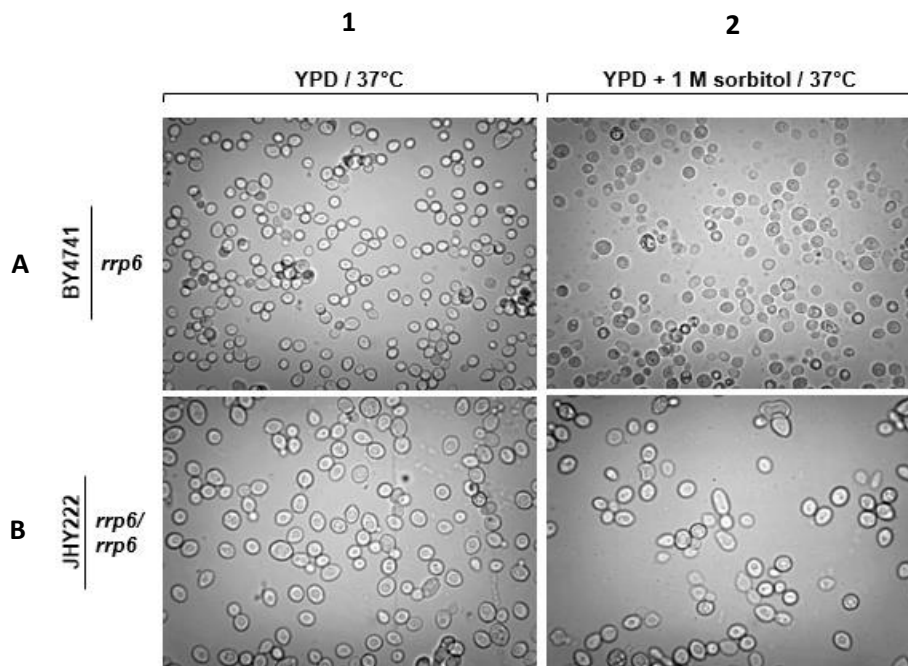
Rast stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 i JHY222 linija sojeva ispitan je, kao u prethodnom eksperimentu s BMA41 linijom sojeva, na YPD podlogama bez i u prisustvu osmotskog stabilizatora (1 M sorbitola) za vrijeme uzgoja na 30°C i 37°C. Nakon trodnevne inkubacije na 30°C nije uočljiva razlika u rastu između sojeva divljeg tipa (wild type, wt) i mutanata *rrp6* (Slika 11). Za razliku od mutanta *rrp6* iz BMA41 linije sojeva, isti mutant iz BY4741 i JHY222 linija sojeva pokazuje znatno slabiji defekt u rastu u odnosu na divlji tip pri uzgoju na 37°C. Kao i kod BMA41 linije sojeva, sorbitol kao osmotski stabilizator doprinosi spašavanju rasta mutanta *rrp6* iz BY4741 linije sojeva za vrijeme rasta na 37°C (Slika 11A) te je sličan efekt uočljiv i kod JHY222 linije sojeva (Slika 11B).



Slika 11. Vijabilnost stanica kvasca analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa i mutanata *rrp6* iz BY4741 (A) i JHY222 (B) linija sojeva uzgojene su u YPD podlozi do logaritamske faze rasta na 30°C te su 4 decimalna razrjeđenja takve kulture naciepljena na 30°C i 37°C. Na obje temperature medij je stabiliziran osmotskim stabilizatorom 1 M sorbitolom. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta.

Nakon provjere vijabilnosti bilo je potrebno ispitati morfologiju mutanta *rrp6* iz BY4741 i JHY222 linija sojeva. Mikroskopiranjem svjetlosnim mikroskopom nakon uzgoja na 37°C mutant *rrp6* nije pokazao abnormalnu morfologiju primijećenu kod BMA41 linije sojeva. Stanice su karakterističnog ovalnog oblika i promjera, a klasteri stanica skoro su potpuno izostali (Slika 12). Takva morfologija uočljiva je neovisno o dodatku sorbitola. Time je pokazano da je aberantna morfologija stanica mutanta *rrp6* karakteristična za BMA41 liniju sojeva, koja pokazuje izraženiji defekt u rastu pri povišenoj temperaturi. To indicira na veću destabilizaciju stanične stijenke mutanta *rrp6* u BMA41 liniji sojeva. Poznato je da je linija sojeva BMA41

(generirana iz linije sojeva W303) osjetljivija na agense koji oštećuju staničnu stijenku od stanica drugih linija sojeva već u slučaju stanica divljeg tipa (Trachtulcová i sur., 2003; Schroeder i Ikui, 2019). U skladu s time, temperaturno-osjetljivi fenotip prouzročen defektima stanične stijenke iznimno je izražen u mutantu *rrp6* linije BMA41 u usporedbi sa istovjetnim mutantima iz drugih linija sojeva.

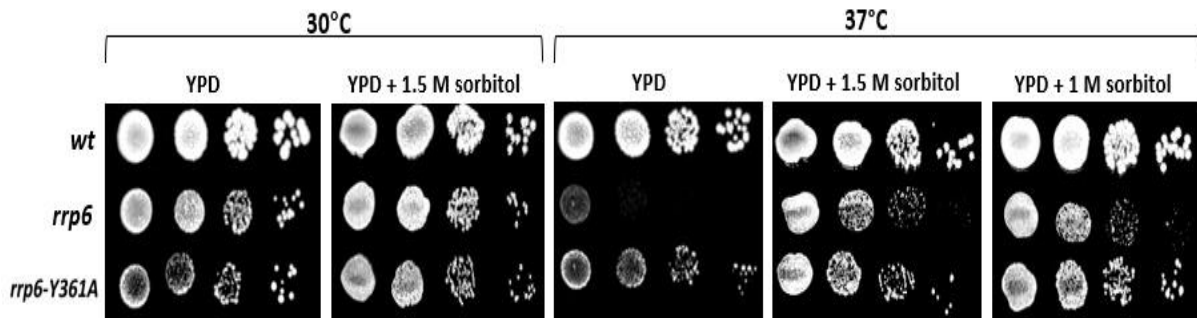


Slika 12. Morfologija stanica BY4741-*rrp6* (A) i JHY222-*rrp6* (B) mutanata uzgojenih pri 37°C u YPD podlozi bez (1) i s osmotskim stabilizatorom sorbitolom (2). Stanice su vizualizirane svjetlosnim mikroskopom opremljenim s Dino-Lite digitalnom kamerom nakon 3 dana rasta.

4.3. Utjecaj hiperosmolarnosti medija na vijabilnost stanica mutanata *rrp6* i *rrp6-Y361A* iz BMA41 linije sojeva tijekom uzgoja pri povišenoj temperaturi

Budući da su se hipoosmolarni uvjeti ispostavili ograničavajućima za rast mutanta *rrp6* pri povišenoj temperaturi, htjeli smo ispitati predstavljaju li i hiperosmolarni uvjeti prepreku rastu tog mutanta. Vijabilnost stanica ispitana je testom rasta. Rast stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* divljeg tipa (wild type, wt) iz BMA41 linije sojeva te izogenih mutanata *rrp6* i *rrp6-Y361A* ispitani su na YPD podlozi s dodanim sorbitolom kao osmotskim stresorom u 1.5 M koncentraciji prilikom uzgoja na 30°C i 37°C tijekom 3 dana. Pri restriktivnoj

temperaturi fenotipski defekt u rastu mutanta *rrp6* popravljiva se 1 M sorbitolom kao osmotskim stabilizatorom. Vidljivo je kako povećana koncentracija sorbitola u ispitanoj koncentraciji koja se tipično za stvaranje hiperosmolarnih uvjeta (1.5 M) ne djeluje kao agens koji će nepovoljno utjecati na rast stanica pri fiziološkoj ili povišenoj temperaturi. Usporedbom rezultata rasta pri obje koncentracije evidentan je poboljšani rast u odnosu na stanica u podlozi bez sorbitola, neovisno o ispitanoj koncentraciji (Slika 13).

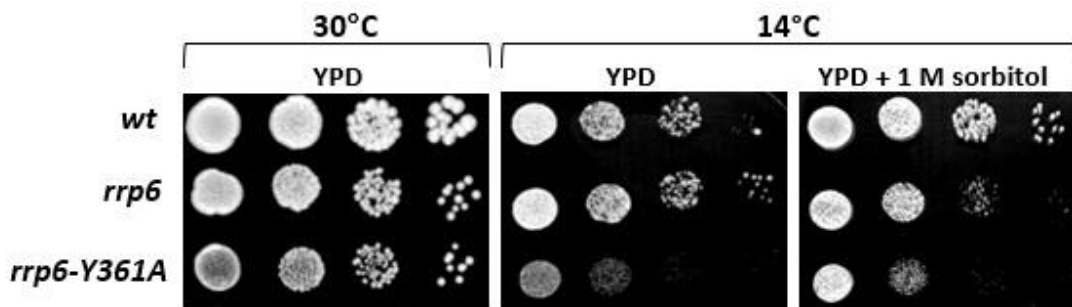


Slika 13. Vijabilnost stanica analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa BMA41 te izogenih mutanta *rrp6* i *rrp6-Y361A* uzgojene su u YPD podlogama do logaritamske faze rasta na 30°C te su 4 decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena 30°C i 37°C. Pri toj temperaturi uspoređen je rast stanica u podlogama bez sorbitola te u podlogama s različitim koncentracijama sorbitola (1.5 M i 1 M). Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta.

4.4. Utjecaj osmotske stabilizacije medija na vijabilnost stanica mutanata *rrp6* i *rrp6-Y361A* iz BMA41 linije sojeva tijekom uzgoja pri sniženoj temperaturi

Za razliku od mutanta *rrp6* kojeg obilježava osjetljivost na povišenu temperaturu, katalitičkog mutanta *rrp6-Y361A* konstruiranog uvođenjem mutacije u egzoribonukleaznoj domeni podjedinice Rrp6 karakterizira osjetljivost na sniženu temperaturu (Mukherjee i sur., 2016). S tim ciljem htjeli smo testom rasta ispitati utjecaj osmotske stabilizacije medija na fenotip stanica kvasca *S.cerevisiae* katalitičkog mutanta *rrp6-Y361A* iz BMA41 linije sojeva pri sniženoj temperaturi. Za uzgoj korištena je YPD podloga sa i bez osmotskog stabilizatora (1 M sorbitol) prilikom uzgoja na 30°C tijekom 3 dana i 14°C tijekom 9 dana. Usporedbom fenotipova pojedinih sojeva tijekom uzgoja na 14°C može se zamijetiti defekt u rastu katalitičkog mutanta u odnosu na divlji tip i mutanta *rrp6* (Slika 14). Na podlozi sa 1 M sorbitolom nije uočljivo spašavanje rasta katalitičkog mutanta *rrp6-Y361A* u odnosu na

kontrolnu ploču s 30°C što navodi na zaključak da osmotska stabilizacija nije dovoljna za supresiju fenotipa kojeg karakterizira osjetljivost na hladnoću. Za razliku od katalitičkog mutanta, stanice divljeg tipa i mutanta *rrp6* ne pokazuju defekt sporijeg rasta na restriktivnoj temperaturi od 14°C, odnosno takav fenotip svojstven je katalitičkom mutantu.



Slika 14. Vijabilnost stanica analizirana testom rasta. Stanice divljeg tipa BMA41 te izogenih mutanta *rrp6* i *rrp6-Y361A* uzgojene su u YPD podlogama do logaritamske faze rasta na 30°C te su 4 decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena 30°C i 14°C. Pri toj temperaturi uspoređen je rast stanica u podlogama bez sorbitola te u podlogama s 1 M koncentracijom sorbitola. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta na 30°C te nakon 9 dana na 14°C.

Ovim radom pokazano je da je katalitička podjedinica RNA egzozoma Rrp6 nužna za održavanje stabilnosti stanične stijenke u kvascu *S. cerevisiae*. Vijabilnost, stanični integritet i morfologija stanica mutanata kojima nedostaje protein Rrp6 ili njegova katalitička aktivnost analizirani su testovima rasta, mikroskopiranjem i mjerenjem aktivnosti enzima alkalne fosfataze u mediju nakon uzgoja pri fiziološkoj i povišenoj temperaturi. Mutant za katalitičku podjedinicu RNA egzozoma Rrp6 (*rrp6-Y361A*) zbog nemogućnosti održavanja osmotskog pritiska podložan je lizi te pokazuje brojne fenotipove vezane uz staničnu stijenku, kao što su ovisnost o osmotskoj stabilizaciji prilikom rasta pri povišenoj temperaturi, aberantna morfologija stanica te defekti prilikom dijeljenja. Spašavanje temperaturno-osjetljivog rasta i aberantne morfologije stanica mutanta *rrp6* omogućeno je osmotskom stabilizacijom medija koja uvjete rasta čini izotoničnima (Slike 4 i 5). Ovo objašnjava kako su nedostaci u strukturi stanične stijenke razlog za temperaturnu osjetljivost tog mutanta. Sukladno pojačanoj destabilizaciji stanične stijenke linije sojeva BMA41, temperaturna osjetljivost mutanta *rrp6* najviše je izražena u liniji sojeva BMA41 u odnosu na ostale ispitane linije sojeva, iako osmotska stabilizacija ima jednak utjecaj na njihov rast (Slika 11). Nadalje, hiperosmolarnost medija ne

utječe značajno na rast stanica mutanta *rrp6* (Slika **13**), za razliku od rasta u hipoosmolarnim uvjetima pri povišenoj temperaturi.

Fenotipovi mutanata *rrp6*, konstruiranog delecijom gena *RRP6*, i *rrp6-Y361A*, katalitičkog mutanta konstruiranog uvođenjem mutacije Y361A u egzoribonukleaznu domenu proteina Rrp6 (Stuparevic i sur., 2013), recipročno su ovisni o temperaturi - katalitičkog mutanta karakterizira osjetljivost na hladnoću (Slika **14**), ali pokazuje normalan rast pri povišenoj temperaturi. Naime, činjenice da katalitički inaktivne inačice proteina Rrp6 komplementiraju osjetljivost na povišenu temperaturu mutanta *rrp6*, te da katalitički mutanti pokazuju osjetljivost na sniženu temperaturu, upućuju na bitnu nekatalitičku ulogu podjedinice Rrp6 (Phillips i Butler, 2003). Potencijalno objašnjenje je da Rrp6 alosterički stimulira aktivnost RNA egzosoma svojom C-terminalnom domenom, te regulira prolazak RNA kroz jezgru egzosoma (Exo9) do aktivnog mjesta Dis3 podjedinice, kao što je prethodno demonstrirano *in vitro* istraživanjima strukture i funkcije RNA egzosoma (Makino i sur., 2015). Takva uloga Rrp6 podjedinice neovisna je o njoj katalitičkoj aktivnosti (Wasmuth i Lima, 2017).

Nedavno objavljeni rad o ulozi katalitičke podjedinice Rrp6 naglasio je njenu važnost u preživljavanju stanica tijekom stresa uzrokovanog povišenom temperaturom (Wang i sur., 2020). Dok je u radu Wang i sur. destabilizacija stanične stijenke bila fenotipski uočena samo prilikom istovremene inaktivacije Rrp6 i Mpk1, komponente CWI (engl. *Cell Wall Integrity*) signalnog puta, u ovome je radu po prvi puta jasno pokazana destabilizacija stanične stijenke mutanta *rrp6*. Iz dobivenih rezultata u ovom radu te u radu Wang i sur. vidljivo je kako Rrp6 ima nekatalitičku ulogu u održavanju stabilnosti stanične stijenke, što podupire činjenica da svi prethodno testirani katalitički mutanti Rrp6 podjedinice rastu normalno na povišenim temperaturama (Phillips i Butler, 2003). Budući da je Rrp6 lokaliziran u jezgri stanice kvasca i ima bitnu ulogu u metabolizmu RNA, njegova uloga u održavanju stabilnosti stanične stijenke vjerojatno je posljedica promjena razina RNA koje kodiraju za proteine bitne za održavanje integriteta stanične stijenke. Potrebna su daljnja istraživanja koja će objasniti molekularnu poveznicu između RNA egzosoma i stabilnosti stanične stijenke i time dati bolji uvid u funkciju i regulaciju ovog evolucijski očuvanog kompleksa pod stresnim uvjetima.

5. ZAKLJUČCI

1. Temperaturna osjetljivost mutanta *rrp6* rezultat je kompromitirane stabilnosti stanične stijenke. Stanice mutanta *rrp6* pucaju u hipoosmolarnim uvjetima pri povišenoj temperaturi.
2. Dodatak osmotskog stabilizatora suprimira defekte u rastu, morfologiji i integritetu stanične stijenke mutanta *rrp6* pri povišenoj temperaturi, što je pokazano korištenjem tri različite linije sojeva kvasca te uz dva načina osmotske stabilizacije medija za uzgoj.
3. Stanice mutanta *rrp6* nisu preosjetljive na hiperosmolarne uvjete.
4. Temperaturna osjetljivost, aberantna morfologija i defekt u separaciji stanica mutanta *rrp6* najviše su izraženi u liniji sojeva BMA41 u odnosu na ostale ispitane linije sojeva.
5. Katalitički mutant podjedinice Rrp6 ne pokazuje osjetljivost na povišenu temperaturu, ali osjetljiv je na hladnoću, te se takav fenotip ne suprimira dodatkom osmotskog stabilizatora.
6. Budući da stanice katalitičkog mutanta Rrp6 ne pokazuju fenotipe koji indiciraju na destabilizaciju stanične stijenke, proizlazi da Rrp6 ima bitnu nekatalitičku ulogu u održavanju stabilnosti stanične stijenke, i time vijabilnosti stanica, pri povišenoj temperaturi.

6. POPIS LITERATURE

- Aguilar-Uscanga, B., François, J.M., (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 268–274.
- Allmang, Christine, Kufel, Joanna, Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., Tollervey, D., Allmang, C, Kufel, J, (1999a) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO Journal* **18(19)**, 5399–5410
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., Mitchell, P., (1999b) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3 → 5 exonucleases. *Genes Dev.* **13**, 2148–2158.
- De Almeida, S.F., 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 Res.* **38**, 8015–8026.
- Bi i Park, (2012) Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* **191**, 347–387.
- 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.
- Briggs, M.W., Burkard, K.T.D., Butler, J.S., (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.
- Büttner, K., Wenig, K., Hopfner, K.P., (2005) Structural framework for the mechanism of archaeal exosomes in RNA processing. *Mol. Cell* **20**, 461–471.
- Callahan, K.P., Butler, J.S., (2008) Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6645–6655.
- Camblong, J., Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., Perocchi, F., Clauder-mu, S., Huber, W., Steinmetz, L.M., Guffanti, E., (2009) Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. **457**.
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T.H., Dziembowski, A., (2013) RNA decay machines: The exosome. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1829**, 552–560.

- Cid, D., (1995) Molecular Basis of Cell Integrity and Morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **59**, 345–386.
- Doma, M.K., Parker, R., (2007) RNA Quality Control in Eukaryotes. *Cell* **131**, 660–668.
- Dujon, (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends in Genetics: TIG* **2(7)**, 263-70
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., Séraphin, B., (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 15–22.
- Fabrizio i sur., (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **292**, 288–290.
- 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**.
- Gudipati, R.K., Xu, Z., Lebreton, A., Séraphin, B., Steinmetz, L.M., Jacquier, A., Libri, D., (2012) Extensive Degradation of RNA Precursors by the Exosome in Wild-Type Cells. *Mol. Cell* **48**, 409–421.
- Harold, F.M., (2002) Force and compliance: rethinking morphogenesis in walled cells. *Fungal Genetics and Biology* **37**, 271–282.
- Herscovics, Orlean, (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* **7**, 540-550.
- Herskowitz, I., (1988) Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* **52**, 536-553
- Klis, F.M., Boorsma, A., Groot, P.W.J. De, (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185–202.
- Kollar i sur., (1995) Architecture of the yeast cell wall. *J. Biol. Chem* **272**, 1170-1178.
- Kwolek-Mirek, M., Zadrag-Tecza, R., (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res.* **14**, 1068–1079.
- Lingaraju, M., Schuller, J.M., Falk, S., Gerlach, P., Bonneau, F., Basquin, J., Benda, C., Conti, E., (2020) To Process or to Decay: A Mechanistic View of the Nuclear RNA Exosome.

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **LXXXIV**, 040295.

Lodish i sur., (1986) *Molecular cell biology*. 8. izd, W. H. Freeman and Company, str. 19 i 21 i 87.

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. *Mol. Cell* **29**, 717–728.

Makino, D.L., 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.

Midtgaard, S.F., Assenholt, J., Thyssen Jonstrup, A., Van, L.B., Heick Jensen, T., Brodersen, D.E., (2006) Structure of the nuclear exosome component Rrp6p reveals an interplay between the active site and the HRDC domain. *PNAS* **103**, 11898–11903.

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**, 457–466.

Molina, M., Martín, H., Sánchez, M., Nombela, C., (1998) 20 MAP Kinase-Mediated Signal Transduction Pathways. *Methods Microbiol.* **26**, 375–393.

Mrša, V., (1993) Cell wall of yeast *s. cerevisiae*. *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev.* **31**, 43-50.

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**, 1311–1319.

De Nobel i Barnett, (1990) Passage of Molecules Through Yeast Cell Walls: a Brief Essay-Review. *Yeast* **7**, 313-323.

Osumi, (1998) The Ultrastructure Structure of Yeast: Cell Wall structure and Formation. *Micron* **29**, 207-233.

Phillips, S., Butler, J.S., (2003) Contribution of domain structure to the RNA 3' end processing and degradation functions of the nuclear exosome subunit Rrp6p. *RNA* **9**, 1098–1107.

Rasconi, S., Jobard, M., Jouve, L., Sime-Ngando, T., (2009) Use of calcofluor white for

- detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2545–2553.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F.P., Dastidar, E.G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C.M., Van Hoof, A., (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 56–62.
- Schmid, M., Jensen, T.H., (2008) The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 501–510.
- Schneider, C., Anderson, J.T., Tollervey, D., (2007) The Exosome Subunit Rrp44 Plays a Direct Role in RNA Substrate Recognition. *Mol. Cell* **27**, 324–331.
- Schroeder, L., Ikui, A.E., (2019) Tryptophan confers resistance to SDS-associated cell membrane stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **14**, 1–16.
- Shaw i sur., (1991) The Function of Chitin Synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *The Journal of Cell Biology* **114**, 111-123.
- Sherman, F., (2002) Getting Started with Yeast. *Methods in Enzymology* **350**, 3-41.
- Sloan, K.E., Schneider, C., Watkins, N.J., (2012) Comparison of the yeast and human nuclear exosome complexes. In *Biochemical Society Transactions* **40**, 850–855.
- Steitz, T.A., Steitz, J.A., (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA (phosphoryl transfer mechanism/ribozyme/group I splicing/spliceosome/group H splicing). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6498-6502.
- Stuparevic, I., Mosrin-Huaman, C., Hervouet-Coste, N., Remenaric, M., Rahmouni, A.R., (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 (mRN. *J. Biol. Chem.* **288**, 31816–31829.
- Tamarin, (1999) Tamarin: Principles of Genetics. 7. izd., The McGraw–Hill Companies, str. 124-125.
- Tanner i Lehle, (1987) Protein glycosylation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* **906**, 81-99.

- Trachtulcová, P., Frýdlová, I., Janatová, I., Dorosh, A., Hašek, J., (2003) The W303 Genetic Background Affects the *iw2Δ* Mutant Phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol. (Praha)*. **48**, 745–753.
- Ufano, S., Pablo, M.E., Calzada, A., del Rey, F., Vázquez de Aldana, C.R., (2004) Swm1p subunit of the APC/cyclosome is required for activation of the daughter-specific gene expression program mediated by Ace2p during growth at high temperature in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **117**, 545–557.
- Wang, C., Liu, Y., DeMario, S.M., Mandric, I., Gonzalez-Figueroa, C., Chanfreau, G.F., (2020) Rrp6 Moonlights in an RNA Exosome-Independent Manner to Promote Cell Survival and Gene Expression during Stress. *Cell Rep.* **31**, 107754.
- Wasmuth, E. V., Lima, C.D., (2012) Exo- and Endoribonucleolytic Activities of Yeast Cytoplasmic and Nuclear RNA Exosomes Are Dependent on the Noncatalytic Core and Central Channel. *Mol. Cell* **48**, 133–144.
- Wasmuth, E. V., Lima, C.D., (2017) The Rrp6 C-terminal domain binds RNA and activates the nuclear RNA exosome. *Nucleic Acids Res.* **45**, 846–860.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marina Oskomić