

Mejotička regulacija razine proteina Rrp6 proteolitičkim procesiranjem i nekodirajućom rna u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Štrbac, Lucija

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:159:141394>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Lucija Štrbac

**MEJOTIČKA REGULACIJA
RAZINE PROTEINA Rrp6
PROTEOLITIČKIM
PROCESIRANJEM I
NEKODIRAJUĆOM RNA U
STANICAMA KVASCA
*Saccharomyces cerevisiae***

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 biotehnoških 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 što mi je pod njegovim mentorstvom omogućio izradu diplomskog rada u Laboratoriju za biokemiju.

Posebno se zahvaljujem Ani Novačić, mag. ing. na susretljivosti, prenesenom znanju te uloženom vremenu i trudu prilikom izrade ovog rada. Hvala na neprestanoj inspiraciji i motivaciji za napretkom u znanstvenom području.

Hvala svim članovima Laboratorija za biokemiju.

Dodatno se želim zahvaliti grupi dr. sc. Sandija Orlića s Instituta Ruđer Bošković, za pomoć pri provođenju jednog dijela eksperimentalnog rada.

Također se zahvaljujem svojim prijateljima te obitelji na podršci tijekom cijelog studija.

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

MEJOTIČKA REGULACIJA RAZINE PROTEINA Rrp6 PROTEOLITIČKIM PROCESIRANJEM
I NEKODIRAJUĆOM RNA U STANICAMA KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Lucija Štrbac, univ. bacc. ing. biotechn.
0058211655

Sažetak: RNA egzom je multiproteinski kompleks ključan za kontrolu kvalitete RNA u svim eukariotskim stanicama. Egzoribonukleazna podjedinica RNA egzosoma Rrp6 esencijalna je za mejozu i sporulaciju kvasca *S. cerevisiae*, međutim razina proteina Rrp6 smanjuje se tijekom mejoze. U ovom je radu pokazan proteolitički mehanizam regulacije razine proteina Rrp6 kompleksom koji promovira anafazu/ciklosom (APC/C) i proteasomom. Rezultati su pokazali kako se u uvjetima mejoze razina Rrp6 stabilizira u mutantu kvasca u kojem je onemogućeno vezanje APC/C na Rrp6 te u uvjetima rasta u kojima je proteasom inhibiran. Također, degradacija Rrp6 tijekom mejoze dovodi do stabilizacije nekodirajućih RNA transkripata (MUT) kojima su uloge slabo istražene, zbog čega je razmotrena i potencijalna regulatorna uloga *antisense* transkripta s lokusa *RRP6*, *MUT1312*, u regulaciji ekspresije Rrp6. Ovim radom istražen je i fiziološki značaj degradacije Rrp6 tijekom mejoze, pri čemu je pokazano da zadržavanje visoke razine proteina Rrp6 tijekom mejoze ima negativan učinak na tijek sporulacije.

Ključne riječi: RNA egzom, Rrp6, mejoza i sporulacija, APC/C, nekodirajuća RNA

Rad sadrži: 77 stranica, 22 slike, 6 tablica, 156 literaturnih 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. prof. dr. sc. Renata Teparić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević (mentor)
3. doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić (član)
4. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjenski član)

Datum obrane: 23. 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

MEIOTIC REGULATION OF Rrp6 PROTEIN LEVEL BY PROTEOLITIC PROCESSING AND
NON-CODING RNA IN YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

Lucija Štrbac, univ. bacc. ing. biotechn.
0058211655

Abstract: The RNA exosome is a multiprotein complex crucial for RNA quality control in all eukaryotic cells. The exoribonuclease subunit of RNA exosome Rrp6 is essential for meiosis and sporulation in the yeast *S. cerevisiae*, however Rrp6 protein level decreases during meiosis. This work demonstrates that Rrp6 level is regulated through targeted proteolysis by the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) and the proteasome. The results show that Rrp6 is stabilized in meiotic conditions when the binding site of APC/C is mutated or when the proteasome is inhibited. As degradation of Rrp6 during meiosis results in stabilization of non-coding RNA transcripts (MUTs) with poorly characterized roles, this work explored the potential role of the antisense *RRP6* transcript, *MUT1312*, in regulation of Rrp6 expression. The physiological significance of Rrp6 degradation was also examined, showing that maintaining high Rrp6 protein levels throughout meiosis had a negative effect on sporulation kinetics.

Keywords: RNA exosome, Rrp6, meiosis and sporulation, APC/C, non-coding RNA

Thesis contains: 77 pages, 22 figures, 6 tables, 156 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. Renata Teparić, PhD, Full professor (president)
2. Igor Stuparević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Marina Svetec Miklenić, PhD, Assistant professor (member)
4. Igor Slivac, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 23rd, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. ŽIVOTNI CIKLUS KVASCA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2.1. Promjena tipa parenja kvasca	5
2.2.2. Mejoza i sporulacija kvasca.....	6
2.3. RNA EGZOSOM	8
2.3.1. Katalitička podjedinica RNA egzosoma Rrp6.....	11
2.3.2. Duge nekodirajuće RNA	12
2.4. UBIKVTIN-PROTEASOM SUSTAV	14
2.4.1. Kompleks koji promovira anafazu/ciklosom (APC/C)	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Kemikalije i enzimi	17
3.1.2. Otopine i puferi.....	17
3.1.2.1. Otopine i puferi za rad s DNA	17
3.1.2.2. Otopine i puferi za izolaciju i pročišćavanje RNA.....	18
3.1.2.3. Otopine i puferi za rad s proteinima.....	18
3.1.3. Hranjive podloge	19
3.1.3.1. Hranjiva podloga za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i>	19
3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.1.4. Plazmidi	20
3.1.5. Sojevi bakterija	20
3.1.6. Sojevi kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.1.7. Primarna i sekundarna antitijela	21
3.1.8. Početnice.....	22
3.2. METODE	22
3.2.1. Računalni alati	22
3.2.1.1. GPS-ARM 1.0.....	22
3.2.1.2. Clustal Omega	23
3.2.1.3. UCSF Chimera 1.16.....	23
3.2.1.4. Missense3D.....	23
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	23
3.2.3. DNA gel elektroforeza.....	24

3.2.4. Određivanje koncentracije DNA i RNA.....	24
3.2.5. Transformacija stanica kvasca LiAc metodom	24
3.2.6. Izolacija i taloženje genomske DNA	25
3.2.7. Izolacija plazmidne DNA iz <i>E.coli</i> (miniprep).....	26
3.2.8. Diploidizacija stanica kvasca.....	26
3.2.9. Test rasta.....	27
3.2.10. Uzgoj za mejozu i sporulaciju kvasca	27
3.2.11. Izolacija ukupnih proteina iz stanica kvasca	27
3.2.12. Kvantifikacija proteina	28
3.2.13. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	28
3.2.14. Imunoblot.....	29
3.2.15. Izolacija ukupne RNA stanica kvasca	30
3.2.16. RNA gel elektroforeza.....	31
3.2.17. RT-qPCR	31
3.2.18. Mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom	32
4. REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1. Proteolitičko procesiranje proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije	35
4.1.1. Određivanje potencijalnih APC/C motiva u proteinskoj sekvenci Rrp6	35
4.1.2. Mutacija Δdb ne narušava stabilnost proteina Rrp6	37
4.1.3. Mutacija Δdb rezultira održanom razinom proteina Rrp6 tijekom cijele mejoze i sporulacije.....	40
4.1.4. Mutacija Δdb ne utječe na razinu proteina Rrp6 prilikom prijelaza s fermentabilnih na respirativne uvjete uzgoja	42
4.2. Utjecaj inhibicije proteasoma na razinu proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije ..	43
4.2.1. Konstrukcija soja SK1 <i>pdr5 a/a</i>	44
4.2.2. Inhibicija proteasoma rezultira održanom razinom Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije.....	47
4.3. Uloga nekodirajuće RNA <i>MUT1312</i> u regulaciji razine proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije	48
4.3.1. Konstrukcija soja SK1 <i>MUT1312 a/a</i>	51
4.3.2. U soju SK1 <i>MUT1312 a/a</i> ne dolazi do uspješnog blokiranja transkripcije <i>MUT1312</i>	52
4.4. Utjecaj prekomjerne ekspresije Rrp6 na tijek mejoze i sporulacije	55
5. ZAKLJUČCI.....	61
6. LITERATURA.....	62

1. UVOD

RNA egzozom je evolucijski očuvan multiproteinski ribonukleazni kompleks esencijalan za 3'→5' procesiranje, degradaciju i kontrolu kvalitete RNA. RNA egzozom se u jezgri sastoji od 9 strukturnih podjedinica te dvije katalitičke podjedinice, Dis3 i Rrp6. Egzoribonukleaza Rrp6 uključena je u procesiranje 3' krajeva snRNA, snoRNA i pre-rRNA, degradaciju kriptičnih nestabilnih transkripata (CUT) te kontrolu kvalitete tRNA i pre-mRNA (Januszyk i Lima, 2014). RNA egzozom kvasca te njegovi homologe u drugim organizmima kontinuirano se istražuju tijekom posljednja dva desetljeća, međutim, uloge egzozoma nisu u potpunosti razjašnjene. Zadnjih desetak godina intenzivno se istražuje uloga RNA egzozoma u mejozi i gametogenezi. Obzirom na širok niz supstrata, ali i uloge u brojnim staničnim procesima, aktivnost egzozoma i njegovih katalitičkih podjedinica u mejozi visoko je regulirana. Prethodno je pokazano da u stanicama kvasca *S. cerevisiae* razina proteina Rrp6 pada tijekom mejoze, ali mehanizam regulacije još nije razjašnjen (Lardenois i sur., 2011). Slično regulaciji razine proteina u mitozu, regulacija razine proteina bitnih za mejozu odvija se proteolizom posredovanom ubikvitinom, odnosno kompleksom koji promovira anafazu/ciklosom (APC/C) i proteasomom (Cooper i Strich, 2000). Cilj ovog rada bio je ispitati mehanizam mejotičke regulacije proteina Rrp6 proteolitičkim procesiranjem, specifično, APC/C kompleksom i proteasomom. U tu svrhu, bioinformatičkom, fenotipskom te imunoblot analizom ispitana je razina Rrp6 u mejotičkim uvjetima rasta u mutantu kvasca u kojem je onemogućeno vezanje APC/C kompleksa na Rrp6 te u uvjetima u kojima je proteasom inhibiran. Nadalje, tijekom mejoze pad razine proteina Rrp6 dovodi do stabilizacije klase nekodirajućih RNA transkripata nazvanih mejotički neanotirani transkripti (MUT) (Lardenois i sur., 2011). Budući da je poznato da nekodirajuća RNA predstavlja jedan od brojnih staničnih mehanizama regulacije ekspresije gena (Bhat i sur., 2016), u ovom je radu istražena potencijalna uloga *antisense* transkripta s lokusa *RRP6*, *MUT1312*, u regulaciji ekspresije Rrp6 tijekom mejoze. Kako bi se ispitala uloga *MUT1312*, provedena je konstrukcija mutanta u kojemu je blokirana transkripcija *MUT1312*. Finalno, ispitan je utjecaj prekomjerne ekspresije Rrp6 na tijek mejoze, kako bi se dobio uvid u fiziološki značaj regulacije ekspresije ove egzoribonukleaze u mejozi i sporulaciji.

2. TEORIJSKI DIO

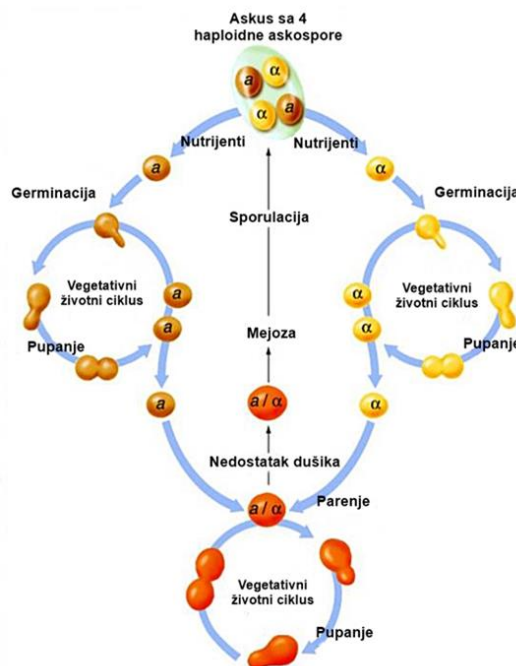
2.1. KVASAC *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanična gljiva ovalnog oblika, a zbog svoje je industrijske primjene najpoznatija pod nazivima pivski i pekarski kvasac. Znanstveni nazivi *Saccharomyces* te *cerevisiae* proizlaze iz kvašćeve mogućnosti fermentacije šećera za proizvodnju etanola i ugljikovog dioksida (Mortimer, 2000). Osim u pivarstvu, proizvodnji vina i pekarskih proizvoda (Parapouli i sur., 2020), kvasac se koristi i kao modelni organizam za istraživanje stanične i molekularne biologije eukariota. Genom *S. cerevisiae* kodira za oko 5800 proteina, a njegovo sekvenciranje 1996. godine (Goffeau i sur., 1996) dodatno je potaknulo korištenje stanica kvasca u znanstvenim istraživanjima. U posljednja dva desetljeća postao je model za većinu molekularno-genetičkih istraživanja jer su osnovni stanični mehanizmi, poput replikacije (Nieduszynski i sur., 2006), rekombinacije (Tsai i sur., 2010), stanične diobe (Hartwell, 2004) i metabolizma (Petranovic i sur., 2010), evolucijski očuvani između kvasca i drugih eukariota, uključujući i sisavce (Burgess i sur., 2017). Evolucijska očuvanost gena kvasca pokazana je za oko 1000 gena povezanih s ljudskim bolestima, poput genetičkih poremećaja, raka pa čak i s neurodegenerativnim bolestima, kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest, zbog čega je uloga istraživanja na stanicama kvasca u otkrivanju uzroka pojave ovih bolesti iznimno važna (Heinicke i sur., 2007). Velika prednost koja je izdvojila kvasac kao jedan od najčešće korištenih modelnih organizama je jednostavnost modifikacije gena. Razvoj metode transformacije DNA učinio je kvasac posebno pristupačnim za provođenje metoda genetičkog inženjerstva. Za razliku od većine drugih eukariotskih organizama, integrativna rekombinacija transformirajuće DNA u kvascu odvija se primarno putem homologne rekombinacije (Orr-Weaver i sur., 1981). Egzogeni DNA stoga se može usmjeriti na specifična mjesta u genomu. Takvom manipulacijom gena induciraju se fenotipske promjene kojima se može dobiti uvid u mehanizme različitih staničnih procesa, što je značajno pridonijelo razumijevanju funkcija određenih gena i proteina *in vivo*. Kvasac se pokazao i kao izvrstan model za ekspresiju rekombinantnih proteina (Çelik i Çalik, 2012). Za razliku od *E. coli*, u stanicama kvasca aktivno je nekoliko mehanizama posttranslacijske modifikacije potrebnih za pravilnu ekspresiju određenih humanih proteina. Značaj kvasca u proizvodnji rekombinantnih proteina pokazuje primjer da su prvo odobreno rekombinantno ljudsko cjepivo, cjepivo za hepatitis B (McAleer i sur., 1984), kao i velik broj biofarmaceutika i terapeutika, proizvedeni u *S. cerevisiae* (Wang i sur., 2017). Nepatogenost, kratko generacijsko

vrijeme te jeftin i jednostavan uzgoj u laboratoriju, također su prednosti koje kvasac čine jednim od fundamentalnih modelnih organizama.

2.2. ŽIVOTNI CIKLUS KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

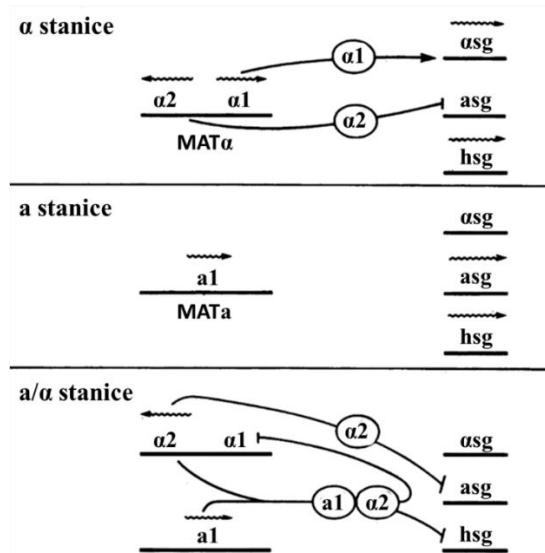
Stanice kvasca mogu postojati kao jedna od tri različite vrste specijaliziranih stanica: haploidne **a** ili α te diploidne **a/ α** . Izmjene diploidne i haploidne faze karakteristične su za životni ciklus kvasca (slika 1). U optimalnim uvjetima rasta, odnosno na vlažnim površinama koje su bogate šećerima, aminokiselinama i drugim topivim hranjivim tvarima, haploidne i diploidne stanice kvasca dijele se nespolno, odnosno mitozom, svakih 90 minuta. Vegetativna dioba karakteristično se događa stvaranjem pupa, koji se povećava kako stanica majka prolazi faze staničnog ciklusa (Mitchison, 1958). Stanični ciklus sastoji se od interfaze (G1, S, G2) i mitoze (M). Tijekom S faze dolazi do duplikacije kromosoma, a nakon anafaze mitoze, kada je genetički materijal odvojen između stanice majke i stanice kćeri, dolazi do diobe jezgre (Hartwell, 1974). Zatim slijedi citokineza, kojom se odvaja genetički identična stanica kći (Bhavsar-Jog i Bi, 2017).



Slika 1. Životni ciklus kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Haploidne stanice razmnožavaju se nespolno pupanjem, a spolno parenjem. Parenjem haploidnih stanica suprotnog tipa parenja nastaju diploidne stanice, koje u povoljnim uvjetima pupaju, a u nepovoljnim, kao što je

nedostatak dušika, ulaze u mejozu i sporuliraju. Ponovnom uspostavom povoljnih uvjeta, spore germiniraju u dvije **a** i dvije α stanice (prilagođeno prema Nasr, 2012)

Osim zbog nedostatka hranjivih tvari, stanični ciklus se kod haploidnih stanica može zaustaviti i zbog bliske prisutnosti druge stanice kvasca suprotnog tipa parenja (Buckingham i sur., 1973). Bliska udaljenost inicira spolno razmnožavanje, odnosno parenje i nastanak diploidne stanice. Kako bi se **a** i α haploidne stanice međusobno prepoznale i kako bi započeo proces fuzije, potrebna je sinteza odgovarajućih receptora i feromona. Receptori se nalaze na površini stanica i prepoznaju peptidne signalne molekule, odnosno feromone. Upravo su feromoni nužni za sinkronizaciju staničnog ciklusa stanica koje će fuzionirati, jer zaustavljaju ciklus u G1 fazi, odnosno prije sinteze DNA. Time je omogućeno da haploidna stanica prije fuzije sadrži samo jednu kopiju svih 16 kromosoma, kako bi nakon fuzije s drugim haploidom dala diploidnu stanicu s 32 kromosoma. Skup gena koji je potreban za sintezu receptora i feromona određen je lokusom tipa parenja (slika 2). Lokus tipa parenja (engl. *mating-type locus*, *MAT*) je glavni regulatorni lokus koji upravlja specijalizacijom stanica (Strathern i sur., 1981). Kod α stanica, *MAT α* kodira za aktivator transkripcije $\alpha 1$ (Sprague i sur., 1983), koji aktivira transkripciju α -specifičnih gena, čime nastaje receptor za **a** feromone (**a** receptor) (Hagen i sur., 1986) i feromon α faktor (Kurjan i Herskowitz, 1982). Osim aktivatora, *MAT α* kodira i za represor transkripcije $\alpha 2$ koji reprimira transkripciju **a**-specifičnih gena, pa time i sintezu receptora i faktora karakterističnih za **a** stanice (slika 2) (Wilson i Herskowitz, 1984). S druge strane, **a** stanice proizvode svoj α receptor (Blumer i sur., 1988) i **a** faktor (Michaelis i Herskowitz, 1988) jer kod njih ne dolazi do ekspresije represora $\alpha 2$. No, *MAT α* kodira za dva polipeptida, **a1**, koji ima važnu ulogu u **a**/ α diploidnim stanicama, i **a2**, čija je uloga nepoznata (slika 2) (Astell i sur., 1981). Nakon vezanja feromona na odgovarajuće receptore, stanice se izdužuju u smjeru svog partnera procesom koji se naziva *shmooing*, nakon čega slijede fuzija stanica i kariogamija. Novonastali diploid ne može se dalje pariti, ali se može podijeliti mitotičkom diobom, čime nastaju nove diploidne stanice. Ukoliko se nađe u stresnim uvjetima, diploidna stanica sporulira, odnosno formira četiri haploidne spore unutar strukture koja se zove askus. U ponovno uspostavljenim povoljnim uvjetima spore germiniraju u dvije **a** i dvije α stanice (slika 1) (Neiman, 2011).



Slika 2. Regulacija ekspresije gena specifičnih za tip parenja kvasca. Lokus tipa parenja (*MATa* ili *MAT α*) kodira za regulatorne proteine (**a1** ili $\alpha 1$ i $\alpha 2$) koji djeluju kao transkripcijski faktori za setove gena čija je ekspresija specifična za tip stanice (*asg*, α -specifični geni; **asg**, **a**-specifični geni; i *hsg*, geni specifični za haploide). Valovite strelice označavaju smjer transkripcije. Strelice označavaju aktivaciju transkripcije gena, a linije s tupim krajevima ukazuju na represiju transkripcije (prilagođeno prema Herskowitz, 1988).

2.2.1. Promjena tipa parenja kvasca

U sredini desnog kraka kromosoma III kvasca *S. cerevisiae* nalazi se *MAT* lokus koji nosi genetičku informaciju o tipu parenja stanice. Dva alela, *MATa* i *MAT α* , razlikuju se u 700 parova baza. Parenjem **a** i α stanice nastaje diploidna stanica koja je heterozigot za *MAT* lokus (*MATa/MAT α*). Kromosom III također nosi dodatnu kopiju svakog *MAT* alela na dva dodatna lokusa: lokus *HMRa*, smješten blizu kraja desnog kraka kromosoma koji sadrži alel *MATa*, i lokus *HML α* , smješten blizu kraja lijevog kraka kromosoma koji sadrži alel *MAT α* (Herskowitz, 1988). Ove kopije *MAT* lokusa potrebne su za promjenu tipa parenja, a, za razliku od *MAT* lokusa, nalaze se u regijama heterokromatina i stoga su transkripcijski utišane. Promjenu tipa parenja inducira endonukleaza HO (engl. *homothallic switching endonuclease*) koja uvodi dvolančani lom u *MAT* lokus (Kostriken i sur., 1983). Budući da dvolančani lom DNA može biti letalan, u stanicama kvasca popravljaju se homolognom rekombinacijom. Popravak je popraćen konverzijom gena prema donorskim, neoštećenim kopijama *MAT* lokusa, što dovodi do promjene informacija u oštećenom *MAT* lokusu. Specifično, *MATa* se popravljaju prema *HML α* , a *MAT α* prema *HMRa*. Za popravak *MATa* zaslužan je rekombinacijski

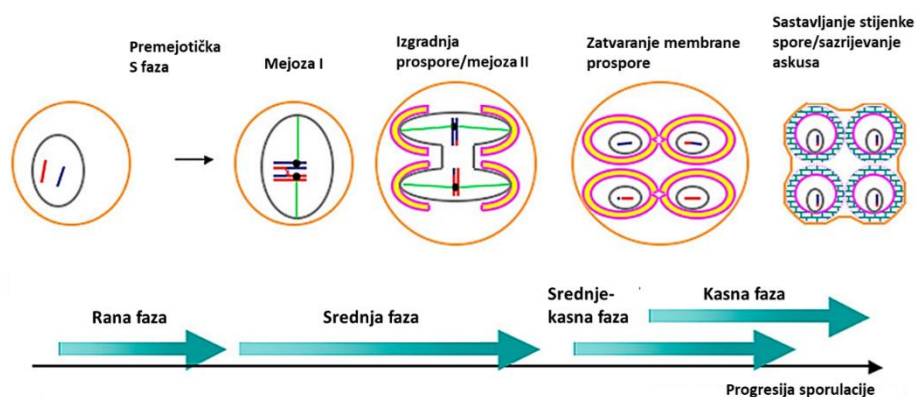
pojačivač (engl. *recombination enhancer*, RE) na lijevom kraku kromosoma III koji potiče korištenje regije *HMLa* kao donorske. S druge strane, da bi se *MAT α* popravio prema *HMRa*, cijela lijeva ruka kromosoma mora biti heterokromatizirana, pa tako i RE lokus (Haber, 2012). Na taj način, *MAT α* nakon popravka postaje *MATa*, i obrnuto. Promjena tipa parenja te transkripcija gena *HO* ograničena je na stanicu majku jer se mRNA Ash1, negativnog regulatora gena *HO*, asimetrično lokalizira u stanice kćeri tijekom mitoze (Jansen i sur., 1996). Represija transkripcije gena *HO* sprječava promjenu tipa parenja stanice kćeri i time omogućuje parenje sa njenom stanicom majkom koja može mijenjati tip parenja. Promjena tipa parenja kod stanice majke uobičajena je jer osigurava spontanu diploidizaciju, odnosno mogućnost generiranja kompatibilnog partnera za parenje (Harari i sur., 2018). Stanice kvasca koje mogu mijenjati tip parenja nazivaju se homotaličnim stanicama, te se većinom kao takve nalaze u prirodi. *S. cerevisiae* najčešće se proučava u laboratoriju u haploidnom stanju, zbog olakšane genetičke manipulacije. Međutim, haploidni sojevi izolirani iz prirode brzo mijenjaju tip parenja iz **a** u α i obrnuto, zbog čega je teško održavati čistu haploidnu kulturu, budući da se stanice suprotnog tipa parenja brzo pare i tvore diploide. Laboratorijske kulture zato u pravilu nose mutaciju koja blokira promjenu tipa parenja, odnosno imaju mutaciju u genu koji kodira za endonukleazu HO, pa se takvi sojevi mogu uzgajati kao čiste i stabilne kulture.

2.2.2. Mejoza i sporulacija kvasca

U uvjetima uzgoja uz nedostatak izvora dušika i fermentabilnog izvora ugljika, kao što je glukoza, kod diploidnih stanica kvasca *S. cerevisiae* zaustavlja se proliferacija i pokreće gametogeneza, odnosno sporulacija. Kod kvasca je sporulacija proces u kojemu iz jedne diploidne stanice, mejotičkim diobama i dodatnim morfološkim promjenama, nastaju četiri haploidne spore unutar strukture koja se zove askus. Osim nedostatka dušika i fermentabilnog izvora ugljika, za ulazak u sporulaciju potrebna je i prisutnost nefermentabilnog izvora ugljika, kao što je acetat (Freese i sur., 1982). Acetat se metabolizira respiracijom, a potreban je kao jedan od signala za inicijaciju sporulacije, ali i kao izvor ugljika koji osigurava energiju za različite procese, zbog čega je neophodan tijekom cijele mejoze (Otterstedt i sur., 2004). Dakle, inicijaciju sporulacije kvasca kontroliraju prvenstveno nutritivni uvjeti. Također, proces sporulacije moguć je samo kod diploidnih stanica koje eksprimiraju i *MATa* i *MAT α* alele. Takve stanice kvasca ne proizvode niti jedan tip receptora i niti jednu vrstu feromona parenja. Ključnu ulogu u omogućavanju ovih svojstava ima protein $\alpha 2$ koji kod *MATa/MAT α* stanica inhibira sintezu **a**-specifičnih gena, kao što to čini i u α stanicama (slika 2) (Strathern i sur.,

1981). Osim toga, interakcijom $\alpha 2$ s $\alpha 1$ produktom *MATa* nastaje regulatorni heterodimer $\alpha 1\text{-}\alpha 2$, koji reprimira transkripciju gena specifičnih za α stanice (Goutte i Johnson, 1988). Prisutnost $\alpha 1\text{-}\alpha 2$ također daje signal koji ukazuje da je parenje bilo uspješno, tako da se reprimira transkripcija gena specifičnih za haploide i omogućava ekspresija gena važnih za sporulaciju (slika 2). Jedan od primjera je represija gena *RME1* (engl. *regulator of meiosis*), čija je ekspresija specifična za haploide jer kodira za inhibitor mejoze (Rine i sur., 1981).

Genetički i okolišni signali aktiviraju kaskadu regulatornih proteina, što rezultira koordiniranim i uzastopnim promjenama u ekspresiji više od 1000 gena uključenih u različite procese sporulacije (Primig i sur., 2000). Članovi svake klase sporulacijskih gena imaju zajedničke regulatorne sekvence unutar svojih promotora i kontrolirani su istim faktorima transkripcije (Piekarska i sur., 2010). To određuje njihovu koekspresiju i osigurava ispravan redoslijed aktivacije transkripcije pojedinih skupina gena. Dakle, vrijeme ekspresije određenog gena usko je povezano s njegovom funkcijom. Prema tome, faze i geni sporulacije dijele se na rane, srednje i kasne (slika 3).



Slika 3. Morfološke i genetičke faze sporulacije. Ranu fazu karakterizira premejotička S faza te prvi dio mejoze I, sparivanje i rekombinacija homolognih kromosoma. Ostale faze MI te MII uz formiranje, proširenje i zatvaranje prospore odvijaju se za vrijeme srednje faze te na prijelazu iz srednje u kasnu. Kasnu fazu karakterizira formiranje stijenke spore te sazrijevanje askusa (prilagođeno prema Neiman, 2011).

Za ulaz i pravilno odvijanje rane faze potrebne su brojne regulatorne promjene, što uključuje i promjene u odvijanju staničnog ciklusa. Zaobilazi se uobičajena mitotička kontrola, što sprječava prijelaz u mitotičku S fazu te omogućuje ulaz u premejotičku S fazu (Dirick i sur., 1998). Tijekom premejotičke S faze, koja prethodi mejozi I, odvija se replikacija DNA.

Rana faza uključuje i promjene u modifikaciji i procesiranju mRNA koje su nužne za pravilnu ekspresiju ranih gena ključnih za pravilno sparivanje i rekombinaciju homolognih kromosoma u profazi mejoze I (Engebrecht i Roeder, 1990). Nakon rekombinacije, stanice u srednjoj fazi prolaze kroz dva kruga nuklearne diobe, na kraju mejoze I i mejoze II (MI i MII), što dovodi do stvaranja četiri haploidne jezgre koje se zatim izdvajaju u stanice kćeri (Roeder, 1995). To zahtijeva niz promjena u staničnoj citoplazmi, poput modifikacije polarnog tijela diobenog vretena (engl. *spindle pole body*, SPB), potrebne za formiranje membrane prospore. Membrana se proširuje s karakterističnom zakrivljenošću i u odgovarajućem smjeru kako bi mogla zahvatiti jezgru kćeri koja se nalazi uz nju. Zatvaranje membrane prospore karakterizira prijelaz u kasnu fazu, tijekom koje se prospore razvijaju u zrele spore. Glavna karakteristika ove faze je formiranje debelog omotača ili stijenke, koja je prepoznatljivo obilježje spora i pruža zaštitu od različitih okolišnih stresora (Coluccio i sur., 2004). Novoformirane vegetativne stanične stijenke, poput onih koje okružuju pup, mogu se formirati proširenjem postojeće stanične stijenke. Nasuprot tome, za stijenku spora ne postoji već postojeća struktura koja bi djelovala kao predložak. Stanična stijenka vegetativne stanice kvasca sastoji se od unutarnjeg sloja s glukanimima i hitinom te vanjskog sloja s manoproteinima (Klis i sur., 2002), dok unutarnji sloj stijenke spore čine manoproteini, a vanjski glukani (Kreger-Van Rij, 1978). Također, stijenka spore dodatno sadrži ditirozinski sloj i hitozan, koji su ključni za specifična svojstva spora (Briza i sur., 1988). Regeneracija organela te modifikacije histona, koje utječu na stupanj kondenzacije kromatina (Krishnamoorthy i sur., 2006), također su dio procesa sporulacije. Sporulacija je završena kada izvorna stanična stijenka obuhvati spore i time da zreli tetraedarski askus.

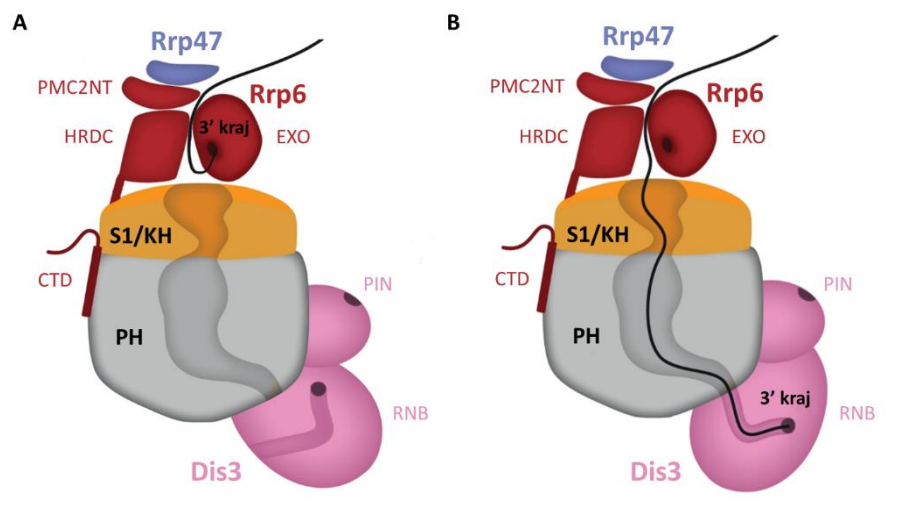
2.3. RNA EGZOSOM

Regulacija ekspresije gena uključuje širok raspon mehanizama koji osigurava pojačanu ili smanjenu sintezu potrebnih genskih produkata, odnosno RNA i proteina. Kako bi stanica pod utjecajem određenih razvojnih i okolišnih signala prilagodila stanični odgovor na razini transkriptoma, potrebni su posttranskripcijski mehanizmi regulacije, poput procesiranja, kontrole kvalitete i razgradnje RNA. Naime, kao i kod drugih bioloških procesa eukariota, koraci obrade RNA skloni su pogreškama i mogu rezultirati sintezom nefunkcionalnih i potencijalno toksičnih RNA, zbog čega je razgradnja istih nužna. Postoje dva puta razgradnje RNA, 5'→3' te, prevalentniji, 3'→5' egzoribonukleazni put (Gagliardi i Dziembowski, 2018; Andrade i sur., 2009). Degradacija RNA u 3'→5' smjeru evolucijski je očuvan proces u svim

organizmima, a obitelji enzima koja kataliziraju degradaciju dijele mehanističke i strukturne sličnosti. Kod eukariota, 3'→5' degradacija u citoplazmi i jezgri katalizirana je esencijalnim kompleksom RNA egzozomom. Egzozom je prvotno identificiran i okarakteriziran u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, a evolucijski sličan kompleks pronađen je u carstvu *Archaea* (Lorentzen i sur., 2005). Homolozi proteina egzozoma kvasca prisutni su i kod ljudi (Allmang i sur., 1999a). RNA egzozom ima ulogu obrade staničnih RNA u svim fazama, od sinteze i sazrijevanja do njihove razgradnje. Stoga, egzozom sudjeluje u kontroli kvalitete RNA, čime sprječava potencijalne štetne učinke uzrokovane nakupljanjem neispravno procesiranih RNA tijekom sazrijevanja funkcionalnih transkripata iz njihovih prekursora (Houseley i sur., 2006). Važna funkcija egzozoma je i uklanjanje nestabilnih molekula RNA koje nastaju kriptičnom transkripcijom. Kriptični nestabilni transkripti (engl. *cryptic unstable transcripts*, CUTs) u kvascu, promotorski uzvodni transkripti (engl. *promoter upstream transcripts*, PROMPTs) kod ljudi, uzvodna *antisense* RNA kod miševa (engl. *upstream antisense RNA*, uaRNA), pojačivačka RNA kod sisavaca (engl. *enhancer RNA*, eRNA), duge nekodirajuće RNA (engl. *long non-coding RNA*, lncRNA) te ponavljajući elementi poput rDNA i centromera, također su izvori nestabilnih transkripata i time supstrati RNA egzozoma (Pefanis i sur., 2015; Flynn i sur., 2011; Wlotzka i sur., 2011; Preker i sur., 2008; Houseley i sur., 2007; Wyers i sur., 2005). RNA egzozom sudjeluje i u sazrijevanju RNA, pri čemu skraćivanjem 3' kraja prekursorskih RNA formira zreli 3' kraj. Egzozom na taj način procesira gotovo sve stanične RNA u jezgri, kao što su ribosomalna RNA (rRNA), mala nuklearna RNA (snRNA), mala nukleolarna RNA (snoRNA) i transportna RNA (tRNA) (Zinder i Lima, 2017). Egzozom je prisutan i u citoplazmi, gdje je njegova funkcija vezana za procesiranje i degradaciju glasničke RNA (mRNA) (Hilleren i sur., 2001). Nadalje, egzozom ima ulogu u terminaciji transkripcije, promjeni razreda antitijela B limfocita, sprječavanju dvolančanog loma razrješavanjem struktura DNA/RNA hibrida, tzv. R-petlji, te u popravku oštećenja DNA (Fox i Mosley, 2017; Laffleur i sur., 2017; Gavalda i sur., 2013; Erdemir i sur., 2002). Obzirom na sve navedene funkcije, nije iznenađujuće da je RNA egzozom iznimno bitan za održavanje homeostaze stanice. Sukladno tome, deregulacija egzozoma dovodi do akumulacije neobrađenih RNA supstrata u citoplazmi, što aktivira antivirusne obrambene mehanizme koji mogu potaknuti razvitak autoimunih bolesti (Eckard i sur., 2014). Također, mutacije u različitim podjedinicama egzozoma kod ljudi povezani su sa sindromima poput pigmentoznog retinitisa, gubitka sluha, blage intelektualne invalidnosti (Di Donato i sur., 2016) te neurodegenerativnim poremećajima poput pontocerebelarne hipoplazije i spinalne mišićne atrofije (Wan i sur., 2012), a pronađene su i kod pacijenata s multiplim mijelomom, neoplazmom B limfocita (Weißbach i sur., 2015).

RNA egzozom evolucijski je očuvani ribonukleazni kompleks sastavljen od strukturnih i katalitičkih podjedinica. Strukturne podjedinice čine jezgru, odnosno središnji kanal egzozoma koji je sastavljen od devet esencijalnih proteina (EXO-9): šest proteina s PH domenom (engl. *ribonuclease PH-like domains*) (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 i Mtr3) i tri proteina koji sadrže S1/KH (engl. *S1/K homology*) RNA-vezujuću domenu (Rrp4, Rrp40 i Csl4) koji tvore kapu egzozoma (slika 4) (Shen i Kiledjian, 2006). Središnji kanal egzozoma ima prstenastu strukturu analognu bakterijskoj 3'→5' egzozonukleazi PNP (engl. *polynucleotide phosphorylase*) (Raijmakers i sur., 2002). Za razliku od fosforolitičke aktivnosti jezgre RNaze arhealnog egzozoma i bakterijske PNPaze, s kojima egzozom eukariota dijeli strukturnu i funkcionalnu sličnost, aktivnost egzozoma eukariota je hidrolitička i ovisi o povezanosti katalitičkih podjedinica sa strukturom jezgre. Jezgra egzozoma kod stanica kvasca i ljudi katalitički je inaktivna, ali esencijalna i strukturno potrebna za usmjeravanje RNA supstrata do ribonukleaza Dis3 i Rrp6 (engl. *ribosomal RNA processing 6*) (slika 4) (Bonneau i sur., 2009). Dis3 se sastoji od pet domena: dvije *cold-shock* domene (CSD1 i CSD2), egzozonukleazne RNB domene, C-terminalne S1 domene i N-terminalne endonukleazne PIN domene (slika 4). Na N-kraju Dis3 nalazi se i CR3 motiv (kratke domene s tri očuvana Cys ostatka) koji posreduje u interakciji između Dis3 i EXO-9 i time modulira njegovu enzimsku aktivnost (Schaeffer i sur., 2009). Sastav katalitičkih podjedinica RNA egzozoma varira prema staničnoj lokalizaciji. Dis3 i Exo9 nalaze se i u jezgri i u citoplazmi (EXO-10). Nasuprot tome, egzozonukleazna 3'→5' podjedinica Rrp6 kvasca ograničena je na jezgru (EXO-11) i često se zbog toga koristi kao marker za aktivnost egzozoma u jezgri i jezgri. Dakle, RNA egzozom usmjeren je na ciljanje različitih RNA supstrata u kontekstu njihovih odgovarajućih staničnih odjeljaka. Katalitičke podjedinice egzozoma nalaze se na suprotnim krajevima EXO-9. Dis3 vezan je za dno EXO-9, a Rrp6 nalazi se na vrhu S1/KH, blizu mjesta gdje RNA ulazi u središnji kanal (slika 4). Središnji kanal dovoljno je širok (8–10 Å) za prolazak jednolančanih, ali ne i dvolančanih RNA, zbog čega se RNA supstrati prije ulaska u kanal moraju odmotati i provući prema katalitičkim podjedinicama. Dok Dis3 razgrađuje RNA koje ili prolaze kroz cijeli središnji kanal ili ga zaobilaze i izravno mu pristupaju, Rrp6 razgrađuje RNA koje ulaze u prsten S1/KH kape, a zatim prolaze kroz kapu kako bi dosegle aktivno mjesto Rrp6 (slika 4) (Zinder i sur., 2016; Liu i sur., 2014). Također, pokazano je da Rrp6 alosterički stimulira aktivnost Dis3 kod kvasca, vjerojatno izravnim vezanjem RNA kao i širenjem kanala Exo9 (Wasmuth i sur., 2014). Četiri dodatna kofaktora, TRAMP (engl. *Trf4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation complex*) kompleks, Rrp47 (C1D kod ljudi), Mpp6 i SKI kompleks, potrebni su za postizanje maksimalne aktivnosti egzozoma *in vivo* (Hardwick i Luisi, 2013; Halbach i

sur., 2013). Uz helikazu Mtr4, TRAMP kompleks sadrži poli-A polimerazu (Trf4 ili Trf5) koja osigurava interakciju RNA s Mtr4 te RNA-vezujući protein, Air1 ili Air2 (Lacava i sur., 2005). Helikaza Ski2 ulazi u interakciju s Ski8 i Ski3 tvoreći citoplazmatski SKI kompleks potreban za degradaciju i kontrolu mRNA (Synowsky i Heck, 2007). Rrp47 stupa u interakciju s Rrp6 kako bi osigurao stabilnost Rrp6 te tvorio platformu za vezanje Mtr4 (Schuch i sur., 2014). Mpp6 je kofaktor koji se veže na podjedinicu Rrp40 i time pojačava aktivnost Mtr4 (Wasmuth i sur., 2017).



Slika 4. Struktura RNA egzozoma i shema prolaska RNA do katalitičkih podjedinica Rrp6 (A) i Dis3 (B) kvasca *S. cerevisiae*. EXO-11 se sastoji od tri proteina koji čine kapu egzozoma (S1 i/ili KH domena), šest proteina koji imaju homologiju s PH domenom bakterijske RNaze te dvije katalitičke podjedinice, Dis3 i Rrp6. Dis3 sadrži PIN, RNB, CSD1, CSD2 i S1 domenu, a Rrp6 PMC2NT, HRDC, EXO i CTD domenu. N-terminalna PMC2NT domena veže kofaktor Rrp47 (prilagođeno prema Makino i sur., 2015).

2.3.1. Katalitička podjedinica RNA egzozoma Rrp6

Rrp6 je 3'→5' egzoribonukleazna katalitička podjedinica RNA egzozoma koja sudjeluje u procesiranju, razgradnji i kontroli kvalitete širokog spektra staničnih RNA. Rrp6 je uključen u procesiranje 3' kraja snRNA, snoRNA i pre-rRNA, degradaciju kriptičnih nestabilnih transkripata te kontrolu kvalitete tRNA i pre-mRNA u jezgri (Wyers i sur., 2005; Allmang i sur., 1999b). Kod *S. cerevisiae* postoji indikacija da Rrp6 može imati funkcije neovisne o egzozomu (Graham i sur., 2009). U nekim drugim organizmima, uključujući tripanosome (*Trypanosoma brucei*), biljke (*Arabidopsis thaliana*), mušice (*Drosophila melanogaster*) i ljude, Rrp6 je otkriven u citoplazmi, iako biološke implikacije ovih otkrića

nisu u potpunosti opisane (Lange i sur., 2008; Haile i sur., 2007; Graham i sur., 2006; Lejeune i sur., 2003). U *S. cerevisiae*, delecija gena *rrp6* uzrokuje fenotip sporog rasta na 30 °C i izrazito slab rast na 37 °C (Briggs i sur., 1998). Međutim, delecija bilo kojeg drugog gena koji kodira za podjedinicu egzosoma rezultira stanicama koje nisu vijabilne, zbog čega su mutanti *rrp6* iznimno korisni za proučavanje posljedica nedostatka funkcije jezgrenog egzosoma. Istraživanja s mutantima *rrp6* otkrile su stabilizaciju transkripata koje sintetizira RNA polimeraza II transkribiranih iz gotovo svakog dijela genoma. Pokazano je da je degradacija nekodirajućih RNA od strane Rrp6 posebno važna za regulaciju transkripcije određenih gena. Sukladno tome, Rrp6 te druge egzosomske podjedinice potrebne su za pravilno odvijanje staničnog ciklusa, mejoze i stanične diferencijacije (Frenk i sur., 2014; Lardenois i sur., 2011). Rrp6 pripada RNaza D obitelji egzoribonukleaza DEDD (sadrži četiri očuvana kisela ostatka), koje koriste mehanizam iona dva metala za hidrolizu RNA (Midtgaard i sur., 2006). Kod kvasca *S. cerevisiae*, 733 aminokiselinska ostatka Rrp6 čine četiri domene: N-terminalnu PMC2NT (engl. *polycystin 2 N-terminal*), HRDC (engl. *helicase RNaseD C-terminal*), CTD (engl. *C-terminal domain*) i EXO (engl. *3'→5' exonuclease*) domenu (slika 4). N-terminalna PMC2NT domena veže kofaktor, Rrp47, koji je neophodan za stabilnost Rrp6 *in vivo* i pomaže u privlačenju TRAMP kompleksa (Stead i sur., 2007). Centralna regija Rrp6 uključuje HRDC i EXO domenu koje zajedno čine katalitički modul (CAT). EXO domena ima katalitičko DEDD 3'→5' aktivno mjesto. C-terminalna domena uglavnom se sastoji od sekvenci s niskom kompleksnosti te nije strukturirana kada nije povezana s egzosomom. Međutim, interakcijom s Csl4, Rrp43 i Mtr3, aminokiseline CTD na pozicijama 518-616 strukturiraju se i tvore EAR domenu (engl. *exosome associating region*) (Makino i sur., 2015). Zadnjih 100 aminokiselinskih ostataka C-terminusa sadrže nuklearni lokalizacijski signal (engl. *nuclear localization signal*, NLS) zaslužan za lokalizaciju Rrp6 u jezgri kvasca. C-terminus Rrp6 ima ulogu i u privlačenju RNA, te se naziva tzv. RNA omčom (engl. *lasso*) (Phillips i Butler, 2003).

2.3.2. Duge nekodirajuće RNA

Napredak tehnologija sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) i bioinformatičkih metoda u posljednjih 20 godina doveo je do otkrića novih klasa transkripata koje mogu imati regulatorne uloge (Strich, 2011). Nekodirajuća RNA zbog toga više se ne smatra prvenstveno *junk* RNA proizvedenom aberantnom transkripcijom DNA. Nedavna istraživanja nekodirajućih regija proširila su znanje o regulaciji transkripcije gena te njihovim produktima, odnosno malim (engl. *small non-coding RNA*, sncRNA) i dugim

nekodirajućim RNA (engl. *long non-coding RNA*, lncRNA). Male ncRNA su u rasponu duljine od 17 do približno 200 nt, dok lncRNA karakterizira duljina veća od 200 nt. Molekule lncRNA imaju kompleksnije regulatorne funkcije u brojnim biološkim procesima, poput proliferacije, diferencijacije, starenja i kontrole oštećenja DNA. Duge nekodirajuće RNA relevantne su za mnoge fiziološke i patofiziološke procese kroz njihovu kontrolu temeljnih molekularnih funkcija (Oo i sur., 2022). lncRNA dijele značajke s mRNA, poput transkripcije RNA polimerazom II, regulacije epigenetskim oznakama, procesiranja dodavanjem kape na 5' kraj i poli-A na 3' kraj (Statello i sur., 2021). Međutim, lncRNA nemaju ORF-ove (engl. *open reading frame*) i zbog toga pripadaju nekodirajućim transkriptima. lncRNA mogu se naći i u citosolu, ali većina je lokalizirana u jezgri. Za razliku od mRNA, mnoge lncRNA relativno su slabo eksprimirane, slabije evolucijski očuvane i visoko specifične za tip stanice ili tkivo (Statello i sur., 2021). lncRNA mogu se klasificirati na različite načine, a prema mjestu njihove transkripcije u odnosu na susjedne kodirajuće regije, dijele se na *sense*, *antisense*, bidirekionalne i intergenske (Mishra i Kanduri, 2019). Transkripcija lncRNA kvasca odvija se uglavnom s bidirekcionalnih promotora (Xu i sur., 2009). Međutim, akumulacija lncRNA najčešće je zaustavljena ranom terminacijom nestabilne *antisense* transkripcije i njihovom degradacijom (Schulz i sur., 2013; Tisseur i sur., 2011; Neil i sur., 2009). Nadalje, postoje brojni primjeri stabilizacije (i destabilizacije) klasa transkripta lncRNA pod određenim uvjetima, kao što su mejoza, respiracija ili sporulacija, različiti izvori i razine ugljika te osmotski stres (Nadal-Ribelles i sur., 2015; Werven i sur., 2013; Lardenois i sur., 2011; Gelfand i sur., 2011). Dakle, regulatorne lncRNA eksprimiraju se u određenim razvojnim fazama ili kao odgovor na nutritivne ili okolišne promjene (Hung i Chang, 2010).

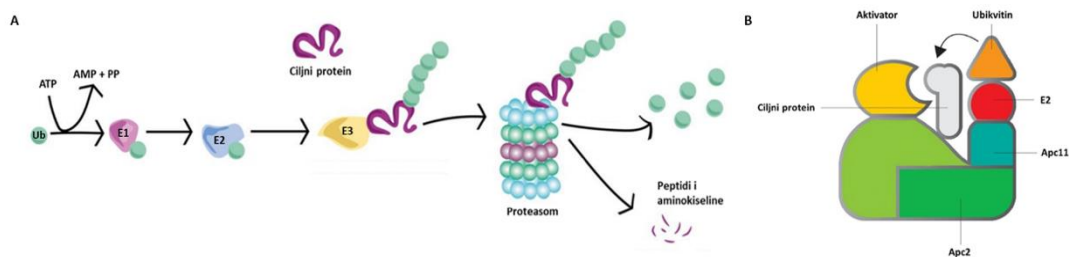
Otkriće različitih nekodirajućih RNA koje su stabilizirane u odsutnosti Rps6 kvasca *S. cerevisiae* znatno je povećalo broj supstrata za koje se zna da su procesirani ili razgrađeni egzozomom jezgre. Posljedično, ove ncRNA nazvane su kriptični nestabilni transkripti (engl. *cryptic unstable transcripts*, CUTs). Za razliku od CUT transkripata koji se brzo razgrađuju egzozomom, postoje i SUT transkripti (engl. *stable unannotated transcripts*, SUTs), koji su relativno stabilni u vegetativnim stanicama kvasca. Prema tome, identificiranje ncRNA uključuje istraživanje stabiliziranih ili akumuliranih RNA u mutantima s defektom u putu razgradnje RNA. Na taj način, pokazana je prisutnost različitih lncRNA poput Xrn1-osjetljivih nestabilnih transkripata (engl. *Xrn-sensitive unstable transcripts*, XUTs). XUT transkripti mogu utjecati na strukturu kromatina promotorskih regija kako bi reprimirali ekspresiju *sense* RNA (van Dijk i sur., 2011). Nekodirajući transkripti nisu prisutni samo tijekom vegetativnog

rasta, već i tijekom mejotičkog. Naime, mejotički neanotirani transkripti (engl. *meiotic unannotated transcripts*, MUTs) nakupljaju se tijekom mejoze *S. cerevisiae* (Lardenois i sur., 2011). Većinu MUT transkripata tijekom vegetativnog rasta razgrađuje komponenta egzosoma Rrp6, sugerirajući da su podklasa CUT ncRNA čija razina u stanici ovisi o aktivnosti Rrp6. Neki MUT transkripti transkribiraju se u *antisense* smjeru u odnosu na pripadajuće kodirajuće gene, što implicira da mogu regulirati transkripciju *sense* gena tijekom mejoze (Frenk i sur., 2014; Lardenois i sur., 2011). Tijekom vegetativnog rasta, Rrp6 je odgovoran i za degradaciju SUT transkripata specifičnih za respiraciju i sporulaciju (rsSUTs). Osim toga, klasa ncRNA nazvana Nrd1-neterminiranim transkriptima (engl. *Nrd1-unterminated transcripts*, NUTs) identificirana je u mutantima za RNA-vezujući protein Nrd1. Nrd1 djeluje kao kofaktor RNA egzosoma u degradaciji NUT transkripata ranom terminacijom transkripcije u sklopu NNS kompleksa (Schulz i sur., 2013).

2.4. UBIKVTIN-PROTEASOM SUSTAV

Održavanje ispravnih razina proteina u stanici te pravilno odvijanje staničnog ciklusa zahtijevaju koordiniranu sintezu i razgradnju regulatornih proteina. Razgradnja proteina odvija se putem proteasomskog puta ovisnog o ubikvitinu (engl. *ubiquitin-proteasome system*, UPS), koji je evolucijski očuvan od kvasca do ljudi. Poremećaji u funkcionalnosti UPS-a imaju značajan utjecaj na homeostazu stanice, budući da UPS osigurava učinkovito i specifično uklanjanje određenog proteina u određenoj vremenskoj točki. Sukladno tome, poremećaji u razgradnji proteina kod ljudi povezani su s brojnim neurodegenerativnim i metaboličkim poremećajima (Lansbury i Lashuel, 2006). UPS se sastoji od nekoliko komponenti, od kojih je ključan evolucijski očuvani protein ubikvitin (Ub). Ubikvitin je uključen u mehanizam ciljane degradacije oštećenih ili nestabilnih proteina u stanici (Pickart, 2001). Proces degradacije započinje označavanjem proteina ubikvitinom. Modifikacija proteina s ubikvitinom je reverzibilna, budući da se Ub-konjugati mogu odvojiti od supstrata djelovanjem proteaza. Također, velika raznolikost modifikacija ubikvitina, uključujući mono- i poliubikvitilaciju, određuju stabilnost, lokalizaciju i/ili funkciju supstratnih proteina (Weissman, 2001). Ubikvitin modificira protein tako da se izopeptidnom vezom povezuju C-terminalni kraj ubikvitina i lizinska (Lys) ϵ -amino skupina proteina supstrata. Kako bi se omogućilo njegovo vezanje na proteine, C-terminus ubikvitina najprije mora biti aktiviran enzimom za aktivaciju ubikvitina (E1). Aktivirani ubikvitin zatim u reakciji transesterifikacije tvori tioester s enzimom koji konjugira ubikvitin (E2) kako bi se omogućila reakcija ubikvitin-proteinske ligaze (E3) (slika

5A). E3 katalizira stvaranje izopeptidne veze između ubikvitina i supstrata (Smalle i Vierstra, 2004). Postoji više izoforma E2 i E3 proteina, a upravo mnoge varijante i njihove kombinacije omogućuju specifičnost ubikvitinacije supstrata (Hochstrasser, 1996). Nakon konjugacije, ubikvitin-protein degradiran je ATP-ovisnim multienzimskim kompleksom proteasomom, pri čemu se ubikvitin oslobađa (slika 5A). Proteasomi su ključne proteaze stanice koje sudjeluju u razgradnji kratkoživućih i regulatornih proteina, važni su za diferencijaciju stanica, prilagodbu promjenama u okolišu te kontrolu staničnog ciklusa (Hilt i Wolf, 1995). Najbolje proučen proteasomski kompleks uključen u razgradnju proteina obilježenih ubikvitinom je 26S proteasomski kompleks. Simetrična struktura kompleksa sastoji se od jezgre s katalitičkom aktivnosti i 20S proteasomskog kompleksa, koji je s obje strane okružen regulatornim 19S proteasomskim kompleksima (19S-20S-19S) (Beck i sur., 2012). Regulatorni 19S kompleksi prepoznaju poliubikvitirane lance supstrata, što dovodi do razmatanja polipeptidnog lanca supstrata i njegove translokacije do jezgre proteasoma, gdje će biti razgrađen.



Slika 5. Mehanizam djelovanja ubikvitin-proteasom sustava (UPS). **A)** Enzim koji aktivira ubikvitin (E1) aktivira ubikvitin (Ub) reakcijom ovisnom o ATP-u. Aktivirani Ub prenosi se na enzim koji konjugira ubikvitin (E2), a zatim na ciljni protein pomoću E3 ubikvitin ligaze. Nakon nekoliko ciklusa ubikvitinacije, proteasom prepoznaje poliubikvitinirani protein i razgrađuje ga na male peptide i aminokiseline (prilagođeno prema Bachiller i sur., 2020). **B)** Struktura E3 ubikvitin ligaze APC/C s katalitičkim podjedinicama Apc11 i Apc2 te vezanim aktivatorom, konjugatom E2-ubikvitin i ciljnim proteinom (prilagođeno prema Morgan, 2007).

2.4.1. Kompleks koji promovira anafazu/ciklosom (APC/C)

Kompleks koji promovira anafazu/ciklosom (engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*, APC/C) jedan je od brojnih ubikvitin-proteinskih ligaza (E3). APC/C je ključan za regulaciju mitoze i mejoze. Kod većine eukariota, pa tako i u kvascu, APC/C sastoji se od 13 različitih podjedinica, od kojih je većina visoko evolucijski očuvana i esencijalna za

aktivnost. APC/C u svojoj jezgri sadrži Apc2 i Apc11 koja veže E2 (slika 5B) (Barford, 2011). Ubikvitinacija putem APC/C kompleksa kontrolirana je aktivatorima koji se vežu na jezgru APC/C-a u različitim fazama staničnog ciklusa. Pokazano je da ove podjedinice promiču aktivnost kompleksa usmjeravajući ga na odgovarajući skup supstrata (Ostapenko i sur., 2012). Posebno su važna dva aktivatora, Cdc20 (engl. *cell division cycle*, Cdc) i Cdh1 (engl. *cadherin*, Cdh). Cdc20 aktivira APC/C na prijelazu iz metafaze u anafazu kako bi omogućio segregaciju sestrinskih kromatida i time izlazak iz mitoze. Cdh1 zatim aktivira APC/C u kasnoj mitozu i ranoj G1 fazi kako bi održao degradaciju ciklina do ulaska u sljedeći stanični ciklus (Pesin i Orr-Weaver, 2008). Dakle, tijekom mitotičke stanične diobe, Cdc20 i Cdh1 potrebni su i za aktivaciju APC/C i za odabir supstrata. Međutim, iako se znatno manje zna o tome kako je regulirana aktivnost APC/C tijekom mejotičkih dioba, pokazano je kako je potreban za pravilno odvijanje obje (Harper i sur., 2002). Na početku mejoze, APC/C sudjeluje u degradaciji Ume6, što inducira premejotičku S fazu (Mallory i sur., 2007). Nadalje, kod kvasca je tijekom mejoze prisutan i treći aktivator APC/C kompleksa, Amal (engl. *activator of meiotic APC/C*, Ama). APC/C^{Amal} odgovoran je za degradaciju Cdc20, što omogućuje pravilan izlaz iz mejoze II (Tan i sur., 2011). Također, budući da postmejotičke stanice mogu biti u stanju mirovanja tijekom duljeg vremenskog razdoblja, degradacija sva tri APC/C aktivatora štiti od preuranjenog ponovnog ulaska u mitozu (Cooper i Strich, 2011).

Supstrati APC/C-a sadrže sekvence aminokiselina, odnosno motive, koji su potrebni za njihovu ubikvitinaciju. Najčešći motiv je destruktivna kutija (*destruction box*, D-box), degenerirani motiv koji uključuje neku verziju sekvence RXXLXXXXN (u kojoj je R arginin, X je bilo koja aminokiselina, L je leucin, a N asparagin). Drugi važan motiv je KEN-kutija (KEN-box) (KENXXXN, u kojoj je K lizin, a E glutamat) (Burton i Solomon, 2001). Većina APC/C meta sadrži jedan ili oba ova motiva, a mutacije u tim motivima mogu inhibirati degradaciju proteina *in vivo*. Cdc20 i Cdh1 vežu se izravno na nekoliko APC/C supstrata, a u većini slučajeva ovo vezanje ovisi o D-box ili KEN-box motivima u ciljnom proteinu. Jezgra APC/C-a, neovisno o podjedinicama aktivatora, također prepoznaje D-box motiv i pridonosi vezanju supstrata (Da Fonseca i sur., 2011). Moguće je da ova raznolikost veznih mjesta omogućuje enzimu da veže supstrat u različitim orijentacijama dopuštajući procesivnu ubikvitinaciju više lizina na ciljnom proteinu i samom ubikvitinu (Bansal i Tiwari, 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije i enzimi

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

- Histidin, uracil, leucin, triptofan, lizin, arginin: Acros Organics (Geel, Belgija)
- Adenin, agaroz, akrilamid, aktinomicin D, amonijev persulfat, β-merkaptioetanol, DAPI, litijev acetat, MG132, SDS: Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Kvaščeva dušična baza bez aminokiselina (YNB), pepton: Difco (SAD)
- Agar, kvaščev ekstrakt: Biolife Italiana (Milano, Italija)
- D (+) glukoza bezvodna: Lach-Ner (Neratovice, Češka)
- 5-FOA: Zymo Research (Freiburg, Njemačka)
- Triton X-100, polietilenglikol (PEG) 4000: Fluka Chemie GmbH (Buchs, Švicarska)
- StainIN Red – boja za nukleinske kiseline: highQu (Kraichtal, Njemačka)
- DNaza I bez RNaza, 1 kb DNA ladder, migracijsko bojilo za nukleinske kiseline: New England Biolabs (Ipswich, SAD)
- Ampicilin: Carl Roth (Karlsruhe, Njemačka)
- RNAza A, higromicin: Roche (Basel, Švicarska)
- 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)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED): Fisher Scientific (Hampton, SAD)
- Clarity Western ECL Substrate - otopine za razvijanje imunoblota: Bio-Rad Laboratories (Hercules, SAD)
- WesternSure Pen: LI-COR Biosciences (Lincoln, SAD)

3.1.2. Otopine i puferi

3.1.2.1. Otopine i puferi za rad s DNA

- TE pufer (pH = 7,4): 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH se prilagođava dodatkom NaOH
- 0,1 M i 1 M litijev acetat
- 50 %-tna otopina polietilenglikola (PEG)

- Otopina fenol/kloroform (1:1)

3.1.2.2. Otopine i puferi za izolaciju i pročišćavanje RNA

- AE pufer: 50 mM natrijev acetat pH 5,3; 10 mM EDTA pH 8,0; deionizirana voda tretirana dietilpirokarbonatom (DEPC)
- 10 % SDS
- Otopina fenol/kloroform (5:1) pH 4,5
- Otopina fenol/kloroforma/izoamilni-alkohol (25:24:1) pH 6,7
- 10x pufer za DNazu (pH 7,6): 100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂
- 1x TAE pufer, priprema se razrjeđenjem 50x TAE pufera (pH = 8,5): 2 M Tris, 1 M ledena octena kiselina, 50 mM EDTA
- 1 %-tni agarozni gel za RNA elektroforezu: priprema se zagrijavanjem određene mase agaroze u 1x TAE puferu

3.1.2.3. Otopine i puferi za rad s proteinima

- NaOH 0,2 M
- Laemmli pufer: 0,06 M Tris-HCl pH 6,8; 5 % glicerol, 2 % SDS, 2 % β-merkaptoetanol, 0,0025 % bromfenolplavo
- PEG - 4000 0,5 g/mL
- 1x pufer za SDS elektroforezu priprema se razrjeđenjem 10x pufera: 25 mM Tris, 192 mM glicin i 0,1 % SDS
- Puferi za pripremu gela za SDS elektroforezu: gel za razdvajanje (pH = 8,8): 1,5 M Tris-HCl pufer, gel za sabijanje (pH = 6,8): 1 M Tris-HCl pufer, destilirana voda
- Akrilamid/bisakrilamid: 30 % akrilamid, 8 % bisakrilamid
- 10 % APS
- 10 % gel za razdvajanje: 1,25 mL pufera za razdvajanje (pH 8,8), 1,25 mL akrilamida, 1,25 mL destilirane vode, 2,5 μL TEMED-a, 19 μL amonij-persulfata (APS),
- 4,5 % gel za sabijanje: 1,065 mL pufera za sabijanje (pH 6,8), 0,15 mL akrilamida, 1,25 μL TEMED-a, 11,25 μL amonij-persulfata (APS)
- Towbin pufer za transfer: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % (v/v) metanol (pH 8,3), destilirana voda
- 1x TBST pufer: 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1 % Tween-20, destilirana voda
- Otopina za blokiranje membrane: 5 % obrano mlijeko u prahu u 1x TBST puferu

3.1.3. Hranjive podloge

3.1.3.1. Hranjiva podloga za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

LB +Amp (engl. *lysogeny broth*) – hranjiva podloga za uzgoj bakterija s rezistencijom na antibiotik ampicilin. Sastav tekuće hranjive podloge: baktotripton 10 g/L, kvašćev ekstrakt 5 g/L, NaCl 5 g/L, 100 µg/mL antibiotika ampicilina. Nakon pripreme, podloga se sterilizira u autoklavu, a sterilni *stock* ampicilina dodaje se nakon hlađenja.

3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

YPD (engl. *yeast extract peptone dextrose*) – bogata hranjiva podloga za uzgoj kvasca. Sastav krute hranjive podloge: pepton 20 g/L, kvašćev ekstrakt 10 g/L, adenin 0,1 g/L, agar 16 g/L, glukoza 20 g/L. Tekuće hranjive podloge imaju isti sastav izuzev agara te se nakon sterilizacije podloge u autoklavu sterilizirana glukoza dodaje do finalne koncentracije 20 g/L. Za pripremu krute hranjive YPD podloge s higromicinom, nakon autoklaviranja se u sterilni medij dodaje antibiotik higromicin B u finalnoj koncentraciji 300 µg/mL. Pripremljena YPD podloga s higromicinom koristila se za selekciju stanica kvasca transformiranih hph kasetom.

YNB (engl. *yeast nitrogen base*) – kemijski definirana hranjiva podloga za uzgoj kvasca. Sastav krute hranjive podloge: YNB prah 6,7 g/L, smjesa aminokiselina i dušičnih baza (engl. *dropout*) 2 g/L, glukoza 20 g/L, agar 16 g/L, triptofan, uracil i histidin 0,8 g/L te leucin 160 mg/L. Tekuće hranjive podloge imaju isti sastav izuzev agara te se nakon sterilizacije podloge autoklaviranjem sterilizirana glukoza dodaje do finalne koncentracije 20 g/L. Selektivne YNB-Ura podloge pripremaju se na isti način izuzev dodavanja uracila. Za izbacivanje pH₀ iz transformiranih stanica kvasca proveden je uzgoj na krutoj YNB podlozi u koju se nakon sterilizacije autoklaviranjem dodaje 1 mg/mL 5-FOA (engl. *5-fluoro-orotic acid*).

Dropout: 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.

YPA (engl. *yeast extract peptone acetate*) – hranjiva podloga za pretsporulacijski uzgoj kvasca. Sastav tekuće hranjive podloge: kvašćev ekstrakt 5 g/L, pepton 10 g/L, kalijev acetat 10 g/L, YNB 6,70 g/L. Nakon sterilizacije autoklaviranjem u podlogu se dodaje 0,5 M sterilni kalijev ftalat (50 mL na 500 mL YPA) čiji je pH prethodno potrebno prilagoditi na 5,5 pomoću 5 M KOH.

SPII (engl. *sporulation media*) – tekuća kemijski definirana podloga za uzgoj kvasca u sporulacijskim uvjetima. Sastav hranjive podloge: kalijev acetat 20 g/L, histidin, uracil, lizin i arginin 0,05 g/L, leucin 0,2 g/L. Prije sterilizacije autoklaviranjem podloga se prilagođava na pH 7.

SPO (engl. *sporulation media*) – kruta kemijski definirana podloga za uzgoj kvasca u sporulacijskim uvjetima. Sastav podloge: kalijev acetat 10 g/L, agar 20 g/L, histidin, uracil, lizin, arginin 0,05 g/L, leucin 0,2 g/L. Nakon pripreme, podloga se sterilizira autoklaviranjem. SPO podloga korištena je u svrhu provjere sporulacije konstruiranih diploida.

3.1.4. Plazmidi

U ovome radu korišten je plazmid pHO s kojeg se eksprimira gen *HO* potreban za diploidizaciju stanica kvasca (iz Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama, PBF). Plazmid sadrži funkcionalan gen *HO*, gen koji kodira za protein koji daje rezistenciju na ampicilin (*Amp^R*) u svrhu selekcije transformiranih bakterija *E.coli*, te marker gen *URA3* potreban za selekciju transformiranih stanica kvasca *S. cerevisiae*.

3.1.5. Sojevi bakterija

Korištene su komercijalno dostupne kompetentne stanice bakterije *E. coli*, soj DH5 α (Subcloning EfficiencyTM DH5 α TM Competent Cells) (genotip: F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻*) [pHO; *HO*, *URA3*, *Amp^R*]. Ishodni soj DH5 α (Invitrogen, SAD) prethodno je transformiran plazmidom pHO (Laboratorij za biokemiju, PBF).

3.1.6. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Tablica 1. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* korišteni u ovom radu

SOJ		GENOTIP	IZVOR
SK1	wt a	<i>MATa ura3 lys2 ho::LYS2 leu2 trp1</i>	Istraživačka grupa M. Primiga, IRSET Inserm
	wt a/α	<i>MATa/MATα ura3/ura3 lys2/lys2 ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 trp1/trp1</i>	Ovaj rad
	wt a/α	<i>MATa/MATα 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>rrp6Δdb a/α (MPY647)</i>	<i>MATa/MATα ho::LYS2/ho::LYS2 ura3/ura3 lys2/lys2 leu2::hisG/leu2::hisG arg4-Nsp/arg4-Bgl his4x::LEU2-URA3/his4B::LEU2 rrp6Δdb/rrp6Δdb</i>	Istraživačka grupa M. Primiga, IRSET Inserm
	<i>pdr5</i>	<i>MATa ura3 lys2 ho::LYS2 leu2 trp1 pdr5::hph</i>	Ovaj rad
	<i>pdr5 a/α</i>	<i>MATa/MATα ura3/ura3 lys2/lys2 ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 trp1/trp1 pdr5::hph/pdr5::hph</i>	Ovaj rad
	<i>MUTblock</i>	<i>MATa ura3 lys2 ho::LYS2 leu2 trp1 MUTblock::hph</i>	Ovaj rad
	<i>MUTblock a/α</i>	<i>MATa/MATα ura3/ura3 lys2/lys2 ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 trp1/trp1 MUTblock::hph/MUTblock::hph</i>	Ovaj rad
	<i>TEF1-RRP6 a/α (MPY721)</i>	<i>MATa/MATα 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>	Istraživačka grupa M. Primiga, IRSET Inserm
JHY222	wt	<i>MATa/MATα HAP1/HAP1 MKT1(D30G)/MKT1(D30G)RME1(INS308A)/RME1(INS308A) TAO3(E1493Q)/TAO3(E1493Q)</i>	Lardenois i sur., 2011
	<i>rrp6Δ a/α</i>	<i>MATa/MATα HAP1/HAP1 MKT1(D30G)/MKT1(D30G)RME1(INS308A)/RME1(INS308A) TAO3(E1493Q)/TAO3(E1493Q) rrp6::KanMX4/rrp6::KanMX4</i>	Lardenois i sur., 2011

3.1.7. Primarna i sekundarna antitijela

Tablica 2. Primarna i sekundarna antitijela korištena u ovom radu

	Antitijelo	Kataloški broj	Izvor	Razrjeđenje
primarno antitijelo	Anti-Rrp6 poliklonsko iz zeca	/	Istraživačka grupa M. Primiga, IRSET Inserm	1:3000
	Anti-Pgk1 monoklonsko iz miša	ab113687	Abcam, UK	1:5000
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

3.1.8. Početnice

Tablica 3. Popis početnica korištenih u ovom radu

Naziv	Sekvenca 5'-3'	Duljina produkta [pb]	Svrha
PDR5_ORF	fwd: ATACCACAGACCCCGAAGGA	wt: 1711	genotipizacija SK1 <i>pdr5</i> i SK1 wt
	rev: AACCTTCACCAGCAACACCA	pdr5: /	
PDR5_hph	fwd: ATGTCTCCGCGGAAGCTTTC	wt: /	
	rev: CAGGACATATCCACGCCCTC	pdr5: 894	
MUT1312block_hph_1	fwd: TAACCCAGTCACTACCC	wt: /	genotipizacija SK1 <i>MUT1312block</i>
	rev: AGGGTATTCTGGGCCTCCAT	MUT1312block: 1789	
MUT1312block_hph_2	fwd: AGTAATGGACCAAGGGCAGC	wt: 423	
	rev: TTCCTGACACCGTCCATTCG	MUT1312block: 2373	
MUT1312_hph	fwd: AAAAGAGGAGGCCTGCCGCAAAG GTAAGAATCTGTCATTTAAAAGTGAAC GATCATTCAAGAGATCCCG	2042	umnažanje hph disrupcijske kazete za blokiranje transkripcije <i>MUT1312block</i>
	rev: ATGAAAATTACCATAATTTATAAATA AAAAAATACGCTTGTTTTACATAATACC GCCTTGAGTGAGCTG		
RRP6/MUT1312	fwd: CGAGACCAAAGCAGACGGAA	126	RT-qPCR
	rev: TTAGTGACAGGCTTGCTCG		
ACT1	fwd: AGTTGCCCCAGAAGAACACC	139	
	rev: GGACAAAACGGCTTGATGG		

3.2. METODE

3.2.1. Računalni alati

3.2.1.1. GPS-ARM 1.0

GPS-ARM (engl. *group-based prediction system-APC/C recognition motif*) je program koji u proteinskim sekvencama predviđa broj i poziciju potencijalnih D-box i KEN-box motiva APC/C kompleksa (The Cuckoo Workgroup, 2011). Algoritam programa bazira se na postojećoj bazi podataka koja sadrži eksperimentalno identificirane D-box i KEN-box motive u proteinima različitih organizama. Za ulaznu informaciju, u program se unosi proteinska sekvenca u FASTA formatu. U ovome radu, GPS-ARM korišten je u svrhu identifikacije

motiva APC/C kompleksa u proteinskoj sekvenci Rrp6 kvasca *S. cerevisiae* s parametrom *threshold* (prag) postavljenim na *all*.

3.2.1.2. Clustal Omega

Clustal Omega je računalni alat za generiranje višestrukog poravnanja sekvenci koje se unose u obliku nukleotidne ili proteinske sekvence (EMBL-EBI, 2011). U ovome radu, višestrukim poravnanjem proteinskih sekvenci homologa proteina Rrp6 iz 12 različitih organizama, Clustal Omega korišten je za pronalaženje evolucijske očuvanosti D-box motiva APC/C kompleksa. Postavljeni su *default* parametri, pri čemu izlazni format poravnanja sadrži numerirane aminokiselinske ostatke.

3.2.1.3. UCSF Chimera 1.16.

UCSF Chimera je program za interaktivnu vizualizaciju i analizu molekularnih struktura uz proširenja za detaljne analize (RBVI, 2004). U ovome radu, UCSF Chimera korišten je u svrhu provjere utjecaja supstitucije aminokiselinskih ostataka D-box motiva (RHSL) u eksperimentalno identificiranim 3D strukturama proteina Rrp6. Trodimenzionalne strukture proteina Rrp6 kvasca *S. cerevisiae* (2HBJ, 5C0W, 5C0X, 5C0Y) preuzete su iz proteinske baze podataka (engl. *protein data base*, PDB). Odabranim strukturama u RHSL motiv opcijom *Rotamers* uvedena je R325A i L328A supstitucija. Zatim je uz *default* parametre opcijom *Clashes/contacts* provjerena pojava sudara atoma proteina Rrp6.

3.2.1.4. Missense3D

Missense3D je računalni alat koji predviđa strukturne promjene uvedene supstitucijom aminokiselina i primjenjiv je za analizu PDB koordinata i struktura predviđenih prema homologiji (Imperial College London, 2019). Missense3D strukturne promjene uvedene supstitucijom aminokiselina predviđa kao strukturno štetne ili neutralne na temelju 16 strukturnih značajki. Program dopušta provjeru strukture sa supstitucijom isključivo jedne aminokiseline, zbog čega je u ovome radu napravljena zasebna analiza za R325A (AHSL) i L328A (RHSA) supstituciju u proteinskim strukturama Rrp6 kvasca *S. cerevisiae* preuzetih s PDB-a (2HBJ, 5C0W, 5C0X, 5C0Y).

3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR (engl. *polymerase chain reaction*) reakcija provedena je u svrhu umnažanja hph kazete za blokiranje transkripcije nekodirajuće RNA *MUT1312* i genotipizacije mutanata SK1 *pdr5* i *MUT1312block*. Reakcijska smjesa od 50 μ L sadržavala je 5 μ L pufera, 1 μ L 10 mM

otopine sva 4 deoksiribonukleotida, 1 μL izolirane genomske DNA ili 1 μL plazmida kalupa (≈ 100 ng DNA), 1 μL Taq DNA polimeraze, 2,5 μL odgovarajućih 10 μM početnica (*forward* i *reverse*) i 37 μL sterilne vode. Za genotipizaciju genomske DNA korištena su dva seta početnica (Poglavlje 3.1.8.) u svrhu dodatne provjere ugradnje kazete. Reakcija umnažanja odvijala se prema programu: 4' 95 °C/ 30x (30" 95 °C/ 30" 59 °C/ 1'/kb produkta 72 °C)/ 7' 72 °C. Nakon provedenog PCR-a, produkti su analizirani gel elektroforezom.

3.2.3. DNA gel elektroforeza

Korišten je 0,8 % agarozni gel pripremljen otapanjem određene mase agaroze u TAE puferu. Uzorci za elektroforezu pripremaju se miješanjem uzorka DNA s odgovarajućim volumenom TAE pufera i bojom za elektroforezu. Pripremljeni uzorci te DNA standardi 1 kb DNA Ladder nanose se u jažice gela. Elektroforeza se provodila pri 90 V, a gel je nakon elektroforeze bojan u otopini etidij bromida i vizualiziran transiluminatorom uz UV svjetlo (*Uvidoc HD6*). Horizontalna DNA elektroforeza provedena je u svrhu provjere PCR produkata (hph kazeta, genotipizacija) i izolacije pHO.

3.2.4. Određivanje koncentracije DNA i RNA

Koncentracija i čistoća DNA, odnosno izoliranog pHO te koncentracija i čistoća ukupne izolirane RNA te RNA nakon tretmana DNazom I određena je *NanoDrop* spektrofotometrom (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Čistoća uzoraka provjerava se dobivenim A_{260}/A_{230} i A_{260}/A_{280} vrijednostima.

3.2.5. Transformacija stanica kvasca LiAc metodom

Stanice kvasca uzgajaju se do logaritamske faze rasta, nakon čega se centrifugiranjem 5'/3000 okretaja po minuti (engl. *rounds per minute*, rpm) izdvaja 5 OD jedinica stanica. Supernatant se odbacuje, a talog stanica resuspendira u sterilnoj destiliranoj vodi te ponovno centrifugira 5'/3000 rpm. Supernatant se ponovo odbacuje, a talog se resuspendira u 0,7 mL 0,1 M LiAc i prenosi u sterilnu Eppendorf epruvetu, nakon čega slijedi centrifugiranje 1'/8000 rpm. Sav supernatant uklanja se pipetiranjem, a na dobiveni talog stanica navedenim redoslijedom dodaje se: 240 μL 50 %-tnog PEG, 36 μL 1 M LiAc, 25 μL jednolančane DNA koja je prethodno prokuhana te 50 μL smjese plazmida i sterilne destilirane vode. Transformacija s disruptijskom kazetom hph provedena je s 50 μL PCR smjese, a transformacija s kružnim plazmidom pHO provedena je s 5 μL plazmida (41,1 ng DNA) i 45 μL sterilne destilirane vode. Pripremljena transformacijska smjesa vorteksira se dok ne postane

homogena. Transformacijska smjesa zatim se inkubira u termobloku 30 min pri 30 °C, nakon čega slijedi toplinski šok inkubacijom u termobloku 20 min pri 42 °C. Smjesa se zatim centrifugira 15"/8000 rpm. Sav supernatant uklanja se pipetiranjem. Zbog visoke efikasnosti transformacije s kružnim plazmidom (pHO), talog stanica se resuspendira u 1 mL sterilne vode te se 100 µL suspenzija naciepljuje na odgovarajuću krutu selektivnu YNB -Ura podlogu. Uzgoj se provodi na 30 °C do porasta kolonija transformanata (2-5 dana).

U slučaju transformacije kod koje se selekcija temelji na antibiotskoj rezistenciji (disrupcijska kazeta hph), nakon toplinskog šoka i centrifugiranja 15"/8000 rpm, talog stanica resuspendira se u 3 mL neselektivne podloge. Zatim se inkubira na rotacijskoj tresilici pri 30 °C dva do pet sati. Nakon inkubacije, uzgojene stanice centrifugiraju se 5'/3000 rpm. Budući da se kod transformacije s integrativnim fragmentom očekuje niska efikasnost transformacije, stanice se resuspendiraju u 150 µL sterilne vode te se na selektivnu krutu podlogu (YPD + 300 mg/mL higromicina B) naciepljuje cijela smjesa. Uzgoj se provodi na 30 °C do porasta kolonija transformanata (2-5 dana).

3.2.6. Izolacija i taloženje genomske DNA

Stanice kvasca uzgajaju se u 10 mL podloge do stacionarne faze rasta, nakon čega se cijeli volumen centrifugira 5'/3000 rpm. Supernatant se uklanja, a talog se resuspendira u 1 mL destilirane vode te prenosi u sterilnu Eppendorf epruvetu. Suspenzija se centrifugira 1'/13000 rpm, te se nastali talog resuspendira u 200 µL pufera za razbijanje stanica. Zatim se dodaje 300 µL staklenih kuglica. U digestoru se dodaje 200 µL otopine fenol/kloroform (1:1), te snažno vorteksira 4 minute, nakon čega se dodaje 200 µL TE pufera i centrifugira 5'/13000 rpm. U srednjoj fazi zaostaju denaturirani proteini, a u gornjoj se nalazi DNA, zbog čega se gornja faza zatim izdvaja u novu Eppendorf epruvetu i pretaloži dodatkom dva i pol volumena hladnog apsolutnog EtOH. Inkubacija traje najmanje 15 min na -20 °C, nakon čega se DNA pretaloži prema protokolu za taloženje. Centrifugiranje se provodi u centrifugi s hlađenjem 10'/11000 rpm na 4 °C. Supernatant se odbacuje, a dobiveni talog ispiri se s 0,5 mL 70 %-tnog hladnog EtOH, nakon čega slijedi centrifugiranje 2'/11000 rpm na 4 °C. Sav supernatant uklanja se pipetiranjem te se dobiveni talog DNA zatim suši na zraku uz plamenik tijekom 15 minuta. Osušeni talog zatim se otapa u 400 µL TE pufera inkubacijom u termobloku na 45 °C uz povremeno protresanje epruveta. Ukoliko se talog teško otapa, temperatura se povisuje za po 5 °C do maksimalno 60 °C. Nakon otapanja taloga, potrebno je pričekati da se otopina ohladi prije dodatka RNaze A. Za uklanjanje RNA dodaje se 5 µL RNaze A (5 mg/mL) te se otopina

inkubira 15-30 minuta na 37 °C. DNA se zatim pretaloži dodatkom 16 µL 5 M NaCl i 1 mL hladnog apsolutnog EtOH. DNA se dalje pretaloži prema protokolu za taloženje. Na kraju protokola osušeni talog otapa se u 500 µL TE pufera inkubacijom u termobloku pri istim temperaturama.

3.2.7. Izolacija plazmidne DNA iz *E.coli* (miniprep)

Izolacija plazmidne DNA iz uzgojene kulture *E.coli* napravljena je u svrhu izolacije plazmida pHO. Plazmidna DNA izolirana je komercijalno dostupnim kitom *Plasmid DNA purification*, protokolom *NucleoSpin® Plasmid (NoLid)*, proizvođača Macherey-Nagel, Njemačka. Protokol za izolaciju te sve potrebne otopine priloženi su od proizvođača.

3.2.8. Diploidizacija stanica kvasca

Laboratorijski sojevi kvasca najčešće su haploidi koji ne mogu mijenjati tip parenja zbog mutacije u genu koji kodira za endonukleazu HO. U svrhu sporulacijskog uzgoja stanica kvasca, nužna je njihova diploidizacija, zbog čega je u ovom radu provedena transformacija s plazmidom s kojeg se ekspirira gen *HO* (pHO). Transformacijska smjesa nacijepljuje se na krutu selektivnu YNB -Ura podlogu, budući da je ishodni soj auksotrof za uracil, a na plazmidu se nalazi marker gen *URA3*. Porasle kolonije precjepljuju se na YNB podlogu u svrhu neselektivnog rasta kod kojeg se očekuje spontani gubitak plazmida budući da je za diploidizaciju sojeva bila poželjna samo kratkotrajna ekspresija endonukleaze HO. Porasle stanice zatim se tehnikom širenja razmaza (engl. *plate streak technique*) precjepljuju na krutu YNB podlogu u koju je dodana 1 mg/mL 5-FOA koji osigurava rast isključivo transformanata koji su izgubili plazmid. Kod transformanata koji nisu izgubili plazmid, a time i marker gen *URA3*, dolazi do sinteze orotidin-5'-fosfat dekarboksilaze koja katalizira reakciju pretvorbe 5-FOA u toksični produkt. Kolonije koje su izgubile plazmid, a time i mogu rasti na 5-FOA podlozi, dalje se precjepljuju na krute YNB te YNB -Ura podloge. Podloga u kojoj nedostaje uracil služi kao negativna kontrola u kojoj ne očekujemo rast zbog prethodnog porasta na 5-FOA. Stanice s YNB kompletne podloge zatim se precjepljuju na krutu YPD i SPO podlogu u svrhu provjere diploidizacije sojeva. Stanicama uzgojenim na YPD podlozi svjetlosnim mikroskopom promatra se morfologija uobičajena za diploidne stanice. Nakon pet dana uzgoja na SPO podlozi, promatra se morfologija karakteristična za askuse spora. U svakom koraku selekcije te provjere diploidizacije i sporulacije stanica, korištene su pozitivne i negativne kontrole. Navedeni protokol upotrebljen je za diploidizaciju SK1 wt **a/a**, SK1 *pdr5 a/a* te SK1 *MUT1312block a/a*.

3.2.9. Test rasta

Test rasta (engl. *plate assay*) je semikvantitativna metoda za ispitivanje vijabilnosti stanica. Podloge za provedbu testa rasta pripremljene su kao krute YNB hranjive podloge. Stanice kvasca uzgojene su na rotacijskoj tresilici u tekućoj YNB podlozi na 30 °C do logaritamske faze rasta. Kulturi u log fazi spektrofotometrijski je određena gustoća kulture (OD_{600}/mL), koja je zatim sterilnom vodom prilagođena na 1 OD_{600}/mL . Slijedila je priprema 4 decimalna razrjeđenja početne suspenzije miješanjem 100 μL suspenzije stanica s 900 μL sterilne vode. Zatim je 10 μL svakog decimalnog razrjeđenja nakapano na krutu YNB podlogu. Podloge su inkubirane pri 30, 34,5 ili 37 °C tijekom 3 dana i fotografirane *Uvidoc HD6* kamerom.

3.2.10. Uzgoj za mejozu i sporulaciju kvasca

Diploidne stanice kvasca uzgajaju se na krutoj YPD podlozi 1-3 dana pri 30 °C. Zatim se precjepljuju u 5 mL tekuće YPD podloge, nakon čega slijedi prekonoćni uzgoj stanica do stacionarne faze na rotacijskoj tresilici pri 30 °C. Slijedi precjepljivanje 2,5 mL kulture u 37,5 mL YPA podloge u Erlenmeyer tikvici te inkubacija na tresilici pri 30 °C 6 do 8 sati. Zatim se 6 mL YPA kulture precjepljuje u 44 mL svježih YPA podloga u Erlenmeyer tikvici te inkubira na tresilici pri 30 °C do OD_{600}/mL jedinica stanica između 4 i 6. Oko 40 mL uzgojene YPA kulture centrifugira se 5'/3000 rpm. Supernatant se odbacuje, a talog se ispiru sterilnom vodom te ponovo centrifugira 5'/3000 rpm. Supernatant se ponovo odbacuje, a talog resuspendira u 40 mL SPII podloge u Erlenmeyer tikvici. Iz preostale uzgojene YPA kulture (10 mL) izuzima se 5 OD jedinica kvasca za izolaciju ukupnih proteina. Također, izuzima se i alikvot YPA kulture od 500 μL koji se nacijepljuje u 10 mL YPD podloge. Nakon što su stanice u YPD podlozi uzgojene do logaritamske faze, izuzima se 5 OD jedinica stanica te izoliraju ukupni proteini. Izolacije ukupnih proteina iz stanica uzgojenih u SPII podlozi napravljene su s po 5 OD jedinica stanica u 2., 4., 6., 8., i 24. satu uzgoja. Nulti sat uzgoja u SPII podlozi obilježava resuspendiranje stanica u SPII podlozi te početak inkubacije na tresilici pri 30 °C. Izolacija proteina u YPD, YPA i SPII podlozi potrebna je za praćenje promjene razine proteina Rrp6 u fermentacijskim, respirativnim te sporulacijskim uvjetima.

3.2.11. Izolacija ukupnih proteina iz stanica kvasca

Izolacija ukupnih proteina iz stanica kvasca provedena je prema Kushnirov, 2000. Iz kulture se izdvaja 5 OD jedinica kvasca te centrifugira 5'/3000 rpm. Talog stanica resuspendira se u 200 μL destilirane vode i prenosi u Eppendorf epruvetu u koju se zatim dodaje 200 μL 0,2

M NaOH te se sve vorteksira. Nakon inkubacije 5 minuta pri sobnoj temperaturi, otopina se centrifugira 1'/110000 rpm. Supernatant se odbacuje, a talog se resuspendira u 100 µL Laemmli pufera. Slijedi inkubacija u termobloku 3 minute pri 100 °C te centrifugiranje 1'/11000 rpm. Proteinski ekstrakti nalaze se u supernatantu te se izdvajaju u novu Eppendorf epruvetu.

3.2.12. Kvantifikacija proteina

Ukupni proteini stanica kvasca kvantificirani su komercijalnim setom kemikalija za određivanje koncentracije proteina *PierceTM 660nm Protein Assay Kit*. Kvantifikacija je omogućena kolorimetrijskom reakcijom u kojoj se boja mijenja iz crvenkasto-smeđe u zelenu i povećava proporcionalno u širokom rasponu povećanja koncentracije proteina. Uzorci se pripremaju u Eppendorf epruveti dodatkom 45 µL Laemmli pufera, 5 µL uzorka i 750 µL reagensa za određivanje koncentracije proteina. Slijepa proba pripremljena je s 50 µL Laemmli pufera i 750 µL reagensa za određivanje koncentracije proteina. Pripremljeni uzorci se vorteksiraju te inkubiraju na sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon inkubacije uzorci se premještaju u kivetu te se mjeri apsorbancija uzoraka i slijepe probe na 660 nm. Nepoznate koncentracije proteina izračunate su prema baždarnoj krivulji izrađenoj prema razrjeđenjima poznatih koncentracija albumina iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*, BSA).

3.2.13. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Za razdvajanje ukupnih proteina izoliranih iz stanica kvasca korištena je diskontinuirana SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza. Zbog denaturirajućeg svojstva te maskiranja nativnog naboja proteina molekulama SDS-a, proteini se razdvajaju prema njihovoj molekularnoj masi. Pripremaju se dva gela, 4,5 % gel za sabijanje (poravnavanje uzoraka) i 10 % gel za razdvajanje proteinskih uzoraka na osnovi molekularne mase. Oba gela pripremaju se u sustavu za izradu gela pri čemu su korištena stakla za gel elektroforezu s razmaknicom od 0,5/1 mm. Gel za sabijanje (pH = 6,8) sadrži pufer za gornji gel, akrilamid te APS i TEMED koji pokreću polimerizaciju gela. Gel za razdvajanje (pH = 8,8) sadrži deioniziranu vodu, pufer za donji gel, akrilamid, APS i TEMED. Između stakla umetnuta na nosače prvo se nanosi gel za razdvajanje. Odmah nakon stavljanja gela, po njegovoj fronti nanosi se izopropanol. Nakon polimerizacije donjeg gela, izopropanol se uklanja filter papirom te se dodaje gel za sabijanje i postavlja češljic za 10 jažica. Nakon što i gornji gel polimerizira, češljic se izvadi te se stakla s polimeriziranim gelom čuvaju na 4 °C ili odmah stavljaju u kadu za SDS-elektroforezu *Mini-PROTEAN* (Biorad) koja se puni puferom za elektroforezu. U jažice se nanosi smjesa proteinskih standarada *Precision Plus Protein Standard* poznate veličine te (ovisno o

eksperimentu) 10-40 μg ukupnih staničnih proteina koji su izolirani u Laemmli puferu. U ovome radu korištena su stakla s 1 mm razmaknicom te se u jažice nanosilo 40 μg ukupnih staničnih proteina. Elektroforeza se odvija pri naponu od 180 V i jakosti struje 380 mA.

3.2.14. Imunoblot

Imunoblot ili western blot je imunokemijska metoda za detekciju i karakterizaciju proteina prema specifičnosti prepoznavanja antigen-antitijelo. Nakon SDS-PAGE elektroforeze, u kojoj su proteini razdvojeni na osnovi molekulske mase, uklanja se gel za sabijanje te provodi mokri transfer proteina na nitroceluloznu membranu koja ima visoki kapacitet vezanja proteina. Mokri transfer označava način prijenosa proteina koji se odvija u kadici (Bio-Rad, SAD) koja je napunjena puferom za transfer. U puferu za transfer prethodno se priprema transfer *sandwich* koji se slaže između dva držača s rupama. Između držača uronjenih u pufer za transfer slažu se komponente navedenim redoslijedom: spužvica, tri filter papira, membrana, gel, tri filter papira te spužvica. Složeni transfer *sandwich* zatim se stavlja u nastavak za transfer u kadici koja je napunjena puferom za transfer. Prijenos proteina odvija se pri naponu od 90 V tijekom 1,5 h. Zatim se izuzima membrana, premješta u plastičnu kutijicu te tretira s 10 mL pufera za blokiranje (5 % obrano mlijeko u TBST puferu) sat vremena pri sobnoj temperaturi uz treskanje. Nakon blokiranja, membrane se ispiru s TBST puferom. U ovome radu, membrane su se zatim prerezale horizontalno u svrhu odvajanja dijela membrane na kojoj će se detektirati protein Rrp6 te Pgc1. Membrane se zatim tretiraju odgovarajućim razrijeđenim primarnim antitijelom (Poglavlje 3.1.7.). Primarna antitijela razrijeđena su u TBST puferu na željenu koncentraciju, odnosno na membranu s Rrp6 dodaje se 2 μL specifičnog primarnog antitijela u 6 mL TBST pufera, a za detekciju Pgc1 1 μL u 5 mL TBST pufera. Inkubacija se odvija pri sobnoj temperaturi sat vremena uz treskanje te potom preko noći pri 4 °C bez treskanja. Slijedi ispiranje membrane tri puta u 5 mL TBST pufera pet minuta, a zatim dodavanje odgovarajućeg razrijeđenog sekundarnog antitijela (Poglavlje 3.1.7.) 5 mL po membrani. Membrane se treskaju na sobnoj temperaturi sat vremena, a nakon toga ispiru tri puta u 5 mL TBST pufera po pet minuta. Zatim se dodaje supstrat *Clarity Western ECL Blotting Substrate* (Biorad) koji će omogućiti vizualizaciju proteinskih vrpca, nakon čega slijedi detekcija. Standardi na membranama označeni su *WesternSure* olovkom, a membrana je vizualizirana pomoću uređaja *C-Digit Blot Scanner* (LI - COR).

3.2.15. Izolacija ukupne RNA stanica kvasca

U svrhu sprječavanja kontaminacije RNazom, prije te tijekom izolacije RNA sve radne površine i pribor tretirani su otopinom RNaza Zap koja uništava enzim RNazu, a destilirana voda tretirana je dietilpirokarbonatom (DEPC) te autoklavirana. Uzorak kulture od 10 OD jedinica kvasca uzgojenih u sporulacijskim uvjetima (5 i 24 h) centrifugiran je 5'/3000 rpm, a zatim resuspendiran u 0,7 mL sterilne destilirane vode. Slijedi centrifugiranje 1'/11000 rpm nakon kojeg se talog resuspendira u 0,7 mL AE pufera. Nakon još jednog centrifugiranja 1'/11000 rpm supernatant se ukloni, a talog stanica skladišti se 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 te se u suspenziju doda 40 µL 10 % SDS. Suspenzija se kratko vorteksira te se dodaje 440 µL otopine fenola i kloroforma (5:1, pH 4,5) prethodno zagrijane na 65 °C. Suspenzija se zatim 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, ponovljena su tri ciklusa vorteksiranja uz zagrijavanje. Potom su uzorci centrifugirani uz hlađenje 10'/10000 rpm pri 4 °C. Oko 400 µL gornje vodene faze prebacuje se u novu Eppendorf epruvetu, gdje se dodaje jednak volumen otopine fenol/kloroform/IAA (24:25:1, pH 6,7) i sve se promiješa okretanjem Eppendorf epruvete. Nakon centrifugiranja 10'/10000 rpm pri 4 °C gornja vodena faza izdvoji se u novu Eppendorf epruvetu uz dodatak natrijevog acetata do finalne 0,3 M koncentracije i 3 volumena 100 % etanola u svrhu taloženja RNA. Zatim se uzorci talože na -80 °C minimalno 20 minuta. Nakon toga slijedi centrifugiranje 10'/10000 rpm pri 4 °C te se talog RNA ispiri s 80 % EtOH. Nakon centrifugiranja 2'/10000 rpm pri 4 °C, EtOH uklanja se pipetiranjem, a talog se suši u termobloku pri 30 °C. Izolirana RNA zatim se resuspendira u 100 µL DEPC vode te skladišti na -80 °C.

Za uklanjanje genomske DNA, potrebno je tretiranje izolirane ukupne RNA enzimom DNazom I. Pripremaju se reakcijske smjese koje se sastoje od 10 µg nepročišćene RNA, 10 µL 10x pufera za DNazu I i 1 µL DNaze I. Dodatkom DEPC vode konačni volumen reakcijske smjese iznosi 100 µL. Reakcijske smjese inkubiraju se 10 minuta na 37 °C. Zatim se dodaje jednak volumen otopine fenol/kloroform/IAA (pH 6,7) te sve skupa promiješa okretanjem epruvete. Slijedi centrifugiranje 10'/10000 rpm pri 4 °C. Gornja faza izdvaja se u novu Eppendorf epruvetu u koju se doda natrijev acetat do finalne 0,3 M koncentracije kao i 3 volumena 100 % EtOH. Uzorci se talože na -80 °C minimalno 20 minuta. Nakon taloženja slijedi centrifugiranje 10'/10000 rpm pri 4 °C. Supernatant se uklanja pipetiranjem, a talog se

ispire s 700 μ L 80 % EtOH. Slijedi centrifugiranje 2'/10000 rpm pri 4 °C. Etanol se uklanja pipetiranjem, a Eppendorf epruveta ostavlja se otvorena u termobloku pri 30 °C. Izolirana RNA resuspendira se u 15 μ L DEPC vode i skladišti na -80 °C.

3.2.16. RNA gel elektroforeza

Korišten je 1 %-tni agarozni gel pripremljen otapanjem određene mase agaroze u hladnom TAE puferu. U pripremljeni gel dodaje se *StainINTM RED Nucleic Acid STAIN* boja. Uzorci RNA nanesu se u jažice te se elektroforeza provodi pri naponu od 55 V uz hlađenje ohlađenim blokovima. Gel je vizualiziran s transiluminatorom uz UV svjetlo. Horizontalna RNA elektroforeza provedena je u svrhu provjere integriteta RNA te uspješnosti tretmana DNazom I.

3.2.17. RT-qPCR

RT-qPCR (engl. *reverse transcription quantitative PCR*) je metoda u kojoj je polazni genetski materijal molekula RNA. Reverznom transkripcijom prevodi se u cDNA pri čemu se segment od interesa amplificira i kvantificira. Za RT-qPCR je korišten *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* proizvođača Thermo Fisher Scientific, SAD. Kako bi se osiguralo umnažanje transkripta specifičnog obzirom na transkribirani lanac DNA, korištena je ekvimolarna smjesa specifičnih početnica, pri čemu je finalna koncentracija svake u reakcijskoj smjesi bila 0,1 μ M. Za umnažanje *MUT1312* korištena je *forward* početnica koja umnaža samo *antisense* lanac cDNA, odnosno izbjegava se umnažanje *sense* RNA transkribirane s tog lokusa (mRNA *RRP6*), a za umnažanje *housekeeping* transkripta *ACT1* korištena je odgovarajuća *reverse* početnica. Aktinomicin D dodaje se u reakcijsku smjesu kako bi se spriječila sinteza drugog lanca cDNA. Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju prikazana je u tablici 4. Odgovarajući volumen pročišćene RNA (1 μ g) računa se prema dobivenim masenim koncentracijama RNA nakon tretmana DNazom te je prema potrebi dodana DEPC voda tako da ukupan volumen iznosi 10 μ L. Reakcija reverzne transkripcije provodi se u PCR termobloku s postavljenim programom: 10' 25 °C/ 120' 37 °C/ 5' 85 °C/ 4 °C. Produkti reverzne transkripcije čuvaju se pri -20 °C.

Tablica 4. Komponente smjese za reverznu transkripciju

Komponenta smjese za RT	V [μ L]
10x pufer za reverznu transkriptazu	2
25x smjesa dNTP-ova (100 mM)	0,8
Ekvimolarna smjesa specifičnih početnica (0,1 μ M)	1,6
<i>MultiScribe</i> TM reverzna transkriptaza	1
Aktinomycin D (50 μ g/ml)	2
DEPC voda	2,6

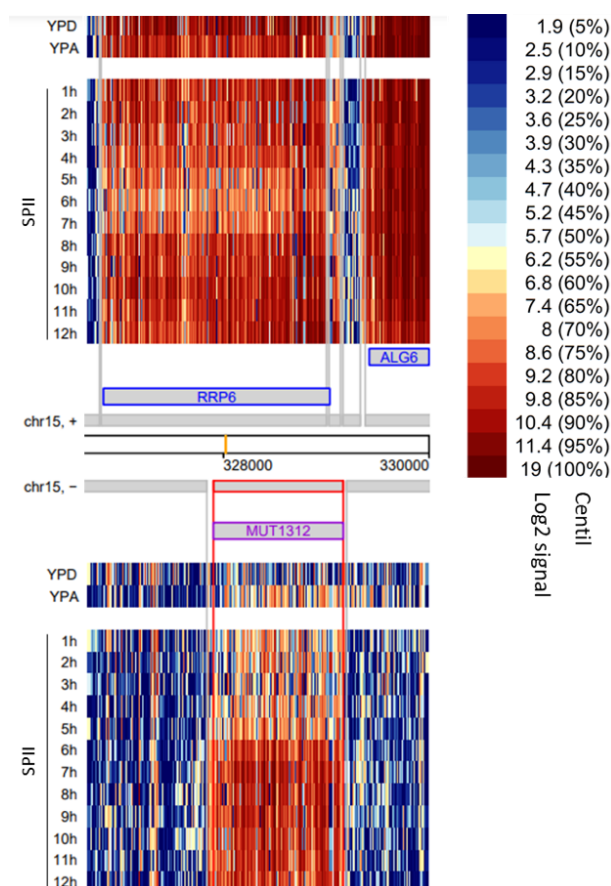
Dobivena cDNA analizira se kvantitativnom PCR reakcijom koristeći qPCR set kemikalija *Maxima SYBR Green*. Reakcijske smjese pripremaju se u mikrotitarskoj pločici. Sastav jedne reakcije čini 5 μ L *Maxima SYBR Green Master Mix*, 0,5 μ L uzvodne i nizvodne početnice, 3 μ L DEPC vode i 1 μ L cDNA te se za svaki uzorak pripremaju dvije tehničke paralele. Mikrotitarska pločica stavlja se u uređaj za qPCR (*Thermo Scientific*TM *PikoReal*TM *Real-Time PCR System*) te se postavlja program: 7' 95 °C/ 40x (15" 95 °C/ 45" 60 °C). Rezultati su analizirani u programu Excel metodom $\Delta\Delta$ Ct.

3.2.18. Mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom

Za mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom koristila se DAPI boja koja se veže na AT regije DNA te zbog toga često koristi za bojanje DNA jezgre. Predmetnica je pripremljena dodatkom vode, suspenzije stanica kvasca te DAPI boje. Obzirom na izrazitu flokulaciju SK1 sojeva, stanice su prije mikroskopiranja resuspendirane žustrim pipetiranjem. Predmetnica je prekrivena pokrovnicom te je dodana kap imerzijskog ulja. Uzorak je vizualiziran fluorescentnim optičkim mikroskopom *Carl Zeiss AxioObserver* uz povećanje 100x/1.4 N.A. Budući da su prikladne valne duljine za ekscitaciju boje 300-440 nm, korišten je DAPI filter. Mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom korišteno je u svrhu određivanja faze mejoze odgovarajućeg soja. Prema broju jezgara obojenih DAPI bojom, stanice su pribrojene fazi mejoze I (MI) ili II (MII). Stanice s dvije, tri ili četiri jezgre pribrojene su MI, a stanice s tri ili četiri jezgre MII.

4. REZULTATI I RASPRAVA

RNA egzosom evolucijski je očuvani ribonukleazni proteinski kompleks koji sudjeluje u procesima razgradnje, sazrijevanja i kontroli kvalitete RNA u jezgri i citoplazmi eukariota. Sastoji se od devet strukturnih podjedinica koje čine jezgru kompleksa i dvije 3'→5' katalitičke podjedinice, Rrp6 i Dis3 (Schneider i Tollervy, 2013). Katalitički inaktivna jezgra usmjerava RNA supstrate do Rrp6 i Dis3, čija je uloga obrada gotovo svih staničnih RNA poput mRNA, tRNA, rRNA, snRNA i snoRNA. Katalitička podjedinica Rrp6 specifična je za jezgrenu izoformu egzosoma, a zajedno s drugim egzosomskim podjedinicama omogućuje pravilno odvijanje staničnog ciklusa, mejoze i stanične diferencijacije. Naime, pokazano je da Rrp6 sudjeluje u koordinaciji tranzicije iz mitoze u mejozu, odnosno mitotička i premejotička prisutnost Rrp6 potrebne su za normalnu mejotičku diobu i stvaranje spora kod kvasca (Frenk i sur., 2014; Lardenois i sur., 2011). Međutim, iako je prisutnost proteina Rrp6 potrebna za ulaz u mejozu, razina proteina Rrp6 u stanicama divljeg tipa tijekom mejoze se smanjuje (Lardenois i sur., 2011). Budući da se razina proteina Rrp6 smanjuje, a razina mRNA *RRP6* ostaje relativno stabilna tijekom mejoze (slika 7), pretpostavka je da se regulacija ekspresije Rrp6 tijekom mejoze odvija posttranskripcijskim mehanizmom.



Slika 7. Razina transkripata *RRP6/MUT1312* i *ALG6* na 15. kromosomu kvasca *S. cerevisiae* pri fermentacijskim (YPD), respirativnim (YPA) i sporulacijskim (SPII) uvjetima uzgoja prikazana na Log2 skali te izražena u centilima. Visoka razina transkripta označena je nijansama crvene boje, a niska nijansama plave boje (prilagođeno prema Lardenois i sur., 2011).

Uz ulogu procesiranja, kontrole kvalitete i degradacije stabilnih vrsta RNA, Rrp6 sudjeluje i u degradaciji kriptičnih nestabilnih transkripata. Rrp6 tijekom mitoze degradira klasu nestabilnih transkripata koji su dobili ime prema njihovoj stabilizaciji za vrijeme mejoze - mejotički neanotirani transkripti (engl. *meiotic unannotated transcripts*, MUTs) (Lardenois i sur., 2011). Zanimljivo je da stabilizaciju nekodirajuće RNA *MUT1312*, koja nastaje *antisense* transkripcijom na lokusu *RRP6* (slika 7), prati spomenuti pad razine proteina Rrp6 (Lardenois i sur., 2011). Međutim, mehanizam i fiziološki značaj regulacije razine Rrp6 u mejozi i sporulaciji nije razjašnjen. Mehanizam proteolitičke regulacije prethodno je povezan s pravilnim odvijanjem mejoze (Mallory i sur., 2007), a nekodirajuća RNA često djeluje kao negativan regulator ekspresije gena (Statello i sur., 2021). Dakle, moguće je da se regulacija ekspresije Rrp6 tijekom mejoze odvija posttranskripcijski, na proteinskoj razini i/ili *antisense* nekodirajućom RNA *MUT1312*. Sukladno tome, cilj ovog rada bio je istražiti mehanizam koji dovodi do smanjenja razine proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije te dobiti uvid u fiziološki značaj ove regulacije.

4.1. Proteolitičko procesiranje proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije

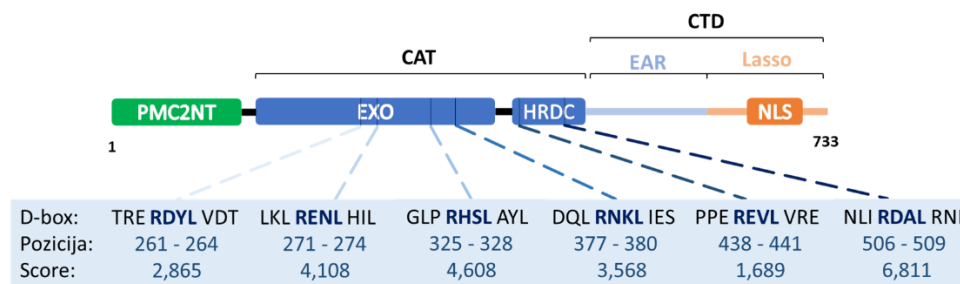
Smanjena razina proteina Rrp6 u mejozi stanica kvasca *S. cerevisiae* može biti posljedica proteolitičkog procesiranja. Jedan od primjera takvog mehanizma regulacije je regulacija razine Ume6, DNA-vezujućeg proteina koji reprimira transkripciju ranih mejotičkih gena tijekom mitotičke diobe. Degradacija Ume6, potrebna za normalnu indukciju mejotičkih gena te progresiju mejoze, odvija se kompleksom koji promovira anafazu/ciklosom (engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*, APC/C) (Mallory i sur., 2007). APC/C je E3 ubikvitin ligaza koja sudjeluje u ubikvitin-proteasom sustavu (UPS). APC/C prepoznaje i ulazi u interakciju sa specifičnim supstratima, čime regulira mitozu i mejozu njihovim označavanjem za proteasomsku razgradnju. Specifično, APC/C omogućuje prijelaz iz metafaze u anafazu, ulaz u sljedeći stanični ciklus te inducira premejotičku S fazu i izlaz iz mejoze II (Pesin i Orr-Weaver, 2008; Harper i sur., 2002). Budući da se razina proteina Rrp6 počinje smanjivati u ranim fazama mejoze, Rrp6 je također potencijalni supstrat APC/C kompleksa.

APC/C prepoznaje dvije vrste motiva preko kojih se veže na supstratni protein, destrukcijsku kutiju (D-box) te KEN-kutiju (KEN-box). Budući da je APC/C esencijalan te utječe na velik broj proteina u stanici, inaktivacija ovog kompleksa mogla bi narušiti regulaciju različitih staničnih procesa ili onemogućiti prolaz kroz sve faze stanične diobe, odnosno mejoze i sporulacije. Sukladno tome, kako bi se ispitalo je li Rrp6 supstrat APC/C kompleksa, odabran je pristup u kojemu se u genomski lokus *RRP6* uvodi mutacija koja će rezultirati inaktivacijom odgovarajućeg motiva u proteinu Rrp6 koji predstavlja potencijalno mjesto prepoznavanja APC/C. Ukoliko je Rrp6 supstrat APC/C kompleksa, pretpostavka je da bi takva mutacija stabilizirala Rrp6 tijekom mejoze. U svrhu uvida u potencijalne APC/C motive u sekvenci proteina Rrp6 te odabira mjesta mutacije, napravljena je bioinformatička analiza proteinske sekvence Rrp6 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1.1. Određivanje potencijalnih APC/C motiva u proteinskoj sekvenci Rrp6

Supstrati APC/C kompleksa sadrže sekvence aminokiselina, odnosno motive koji su potrebni za njihovu ubikvitinaciju. Najčešći motiv je D-box, koji uključuje inačicu sekvence RXXLXXXXN (u kojem je R arginin, X je bilo koja aminokiselina, L je leucin, a N asparagin). Drugi važan motiv je KEN-box (KENXXXN, u kojem je K lizin, a E glutamat). Većina APC/C supstrata sadrži jednu ili obje ove sekvence. Korištenjem GPS-ARM 1.0 (*group-based prediction system - APC/C recognition motif*) računalnog programa za predviđanje

potencijalno funkcionalnih D-box i KEN-box motiva APC/C-a u zadanim sekvencama, pretraženi su potencijalni motivi unutar sekvence proteina Rrp6 kvasca *S. cerevisiae*. Algoritam programa bazira se na postojećoj bazi podataka koja sadrži eksperimentalno identificirane D-box i KEN-box motive u proteinima različitih organizama (Liu i sur., 2012). Za ulaznu informaciju, u program je unesena proteinska sekvenca Rrp6 u FASTA formatu s parametrom *threshold* (prag) postavljenim na *all*. Pronađeno je šest D-box motiva i niti jedan KEN-box motiv. Dobiveni D-box motivi nalaze se u različitim domenama proteina Rrp6. Četiri motiva (RDYL, RENL, RHSL, RNKL) nalaze se u egzoribonukleaznoj katalitičkoj domeni, a dva motiva u HRDC domeni (REVL, RDAL), koja zajedno s egzoribonukleaznom domenom čini katalitički (CAT) modul Rrp6 (slika 8).



Slika 8. Motivi APC/C kompleksa u sekvenci Rrp6 kvasca *S. cerevisiae*. Kod kvasca *S. cerevisiae*, 733 aminokiselinska ostatka Rrp6 čine četiri domene: PMC2NT, EXO, HRDC i CTD. Unutar CTD domene, nalaze se EAR i *lasso* (tzv. omča) regija koja sadrži NLS slijed za lokalizaciju Rrp6 u jezgri. EXO i HRDC domena zajedno čine katalitički modul Rrp6 (CAT). Pozicije i *score* šest D-box motiva (RDYL, RENL, RHSL, RNKL, REVL, RDAL) pronađeni pomoću alata GPS-ARM, vizualizirani su u domenama sekvence Rrp6. Prikaz domena Rrp6 prilagođen je prema Wasmuth i Lima, 2017.

U kontekstu GPS-ARM alata, što je dobivena *score* vrijednost veća, veća je vjerojatnost da pronađeni motiv bude prepoznat od strane APC/C-a. Budući da se *score* temelji na algoritmu koji je prilagođen prema bazi podataka koja sadrži eksperimentalno identificirane motive iz različitih organizama, a ne samo kvasca *S. cerevisiae*, biranje motiva za mutaciju prema vrijednosti *score* nije bio jedini parametar. Napravljena je i analiza evolucijske očuvanosti pronađenih motiva višestrukim poravnanjem sekvenci proteina Rrp6 različitih eukariotskih organizama. Višestruko poravnanje daje uvid u homologiju i evolucijske odnose zadanih sekvenci. Za pronalaženje evolucijske očuvanosti D-box motiva, korišten je Clustal Omega, bioinformatički alat s visokom točnosti poravnanja. Odabrane su sekvence homologa Rrp6 iz

12 različitih organizama, a postavljeni su *default* parametri. Rezultati su pokazali kako je RHSL motiv evolucijski najočuvaniji motiv, budući da je identičan motiv pronađen na odgovarajućem položaju unutar sekvence homologa Rrp6 kod organizama poput ljudi, majmuna i miša (tablica 5). Obzirom na *score* vrijednost te evolucijsku očuvanost, motiv RHSL odabran je za konstrukciju soja s mutacijom u APC/C motivu Rrp6 (Δdb). U svrhu konstrukcije mutanta Δdb , uvedene su dvije ciljane točkaste mutacije u genomskom lokusu *RRP6* koje uzrokuju supstituciju aminokiselinskih ostataka proteina Rrp6 R325A i L328A, čime je motiv RHSL (Arg-His-Ser-Leu) mutiran u AHSA (Ala-His-Ser-Ala). Diploidne stanice kvasca *S. cerevisiae* s mutacijom za D-box motiv RHSL proteina Rrp6 (SK1 *rrp6* Δdb) korištene u eksperimentima u ovom radu konstruirala je istraživačka grupa J. Horecka (Stanford Genome Technology Center, USA).

Tablica 5. Višestruko poravnanje 12 sekvenci homologa Rrp6 u programu Clustal Omega. Najveća evolucijska očuvanost pronađena je kod D-box motiva RHSL, koji je zatim odabran za izradu konstrukta SK1 *rrp6* Δdb . Motiv RHSL (Arg-His-Ser-Leu) mutiran je u AHSA (Ala-His-Ser-Ala).

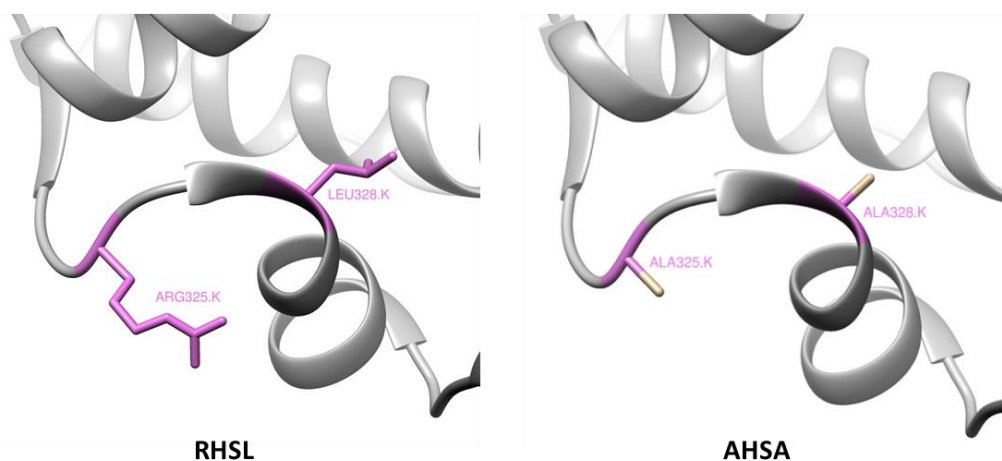
Organizam	Peptid (D-box)					
	RDYL	REN L	RHSL	RNKL	REVL	RDAL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TRE RDYL VDT	LKL REN L H-IL	GLP RHSL AYL	DQL RNKL IES	PPE REVL VRE	NLI RDAL R--
<i>Homo sapiens</i>	TRT EDFI IDT	LEL RSDM Y-IL	NLG RHSL DHL	DKM REM WER	NTQ QLTA FQL	LLI QQAR E--
<i>Macaca mulatta</i>	TRT EDFI IDT	LEL RSDM Y-IL	NLG RHSL DHL	DKM RLEL WER	NTQ QLTA FQL	LLI QQAR E--
<i>Mus musculus</i>	TRT EDFI VDT	LEL RSDM Y-IL	NLA RHSL DHL	DRM RLEL WER	NSQ QLTA FQL	LLI QQAR E--
<i>Rattus norvegicus</i>	TRT EDFI VDT	LEL RSDM Y-IL	NLA RHSL DHL	DRM RLEL WER	NSQ QLTA FQL	LLI QQAR E--
<i>Equus caballus</i>	TRR EDFI VDT	LEL RSDM Y-IL	NLG RHSL DHL	DKM RLEL WER	NTQ QLTA FQL	LLI QQAR E--
<i>Canis lupus familiaris</i>	TRT EDFI VDT	LEL RSDM Y-IL	NLG RHSL DHL	DKM RLEL WER	NTQ QLTA FQL	LLI QQAR E--
<i>Danio rerio</i>	TRE EDFI IDT	LEL RSEM Y-IL	NLG RNSL DHL	DRV RADL FDG	NTQ QLAA FRL	QLI KQAR E--
<i>Drosophila melanogaster</i>	TRS KDYI FDT	LIL RDDM H-IL	NMA RLSL AYL	GRM TNDL LQQ	DNR QLVA LRG	QIV LKAR D--
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TRT EDYI VDI	FKL WDHI GPYL	KLE RNSL EFL	DVM RMEL HTM	NAV QLSI VAG	SVI RISM QNA
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NRE KDWI VDT	LEL REEL E-AL	GFE GHGL AFL	DHL RNEL ISK	GRE ALMI YRA	KVV QEAE KLY
<i>Loa loa</i>	TRQ TDYI IDP	FPL WNDM H-IL	NYS KFSY QHL	DQL RIKL LDQ	NSR QQFA LAA	QII NTSR D--

↓
 Δdb : AHSA

4.1.2. Mutacija Δdb ne narušava stabilnost proteina Rrp6

Budući da je RHSL evolucijski očuvani motiv koji se nalazi u katalitičkoj domeni, mutacija takvog motiva može narušiti strukturu i time aktivnost proteina. Naime, protein postaje nestabilan jer se supstituirani ostatak ne može uklopiti u postojeću strukturu proteina. Kada se supstitucijski ostatak ne uklapa u strukturu, kao posljedica dolazi do manje ili veće promjene konformacije, a strukturne promjene pojavljuju se zbog pojave novih ili nedostatka starih interakcija aminokiselinskih ostataka. Promjene u interakciji mogu narušiti ionske i

disulfidne veze, promijeniti specifičnost vezanja liganda, modificirati alosteričko mjesto te uzrokovati sudare ili druge nestabilnosti (Vihinen, 2015). Kako bi se provjerilo bi li mutacija Δdb mogla narušiti stabilnost proteina Rrp6, napravljene su bioinformatička i eksperimentalna analiza. Iz digitalne baze podataka koji sadrži 3D strukture proteina (engl. *protein data bank*, PDB), preuzete su četiri eksperimentalne proteinske strukture Rrp6 proteina *Saccharomyces cerevisiae* dobivene difrakcijom X-zraka: 2HBJ, 5C0W, 5C0X, 5C0Y (Makino i sur., 2015; Midtgaard i sur., 2006). Svaka struktura zatim je analizirana u UCSF Chimera 1.16., programu za interaktivnu vizualizaciju i analizu molekularnih struktura. Za svaku od navedenih struktura napravljena je R325A i L328A supstitucija aminokiselinskih ostataka (RHSL \rightarrow AHSA) alatom *Rotamers*. Stabilnost Rrp6 s mutacijom Δdb zatim je ispitana opcijom pronalaska mogućnosti sudara (engl. *clashes*) atoma zadanog proteina za određivanje uklapanja supstituiranog ostatka u raspoloživi prostor. Sudari su nepovoljne interakcije ostataka u kojima se njihovi atomi nalaze preblizu, a česta su pojava kod uvođenja mutacija koje rezultiraju promjenom aminokiselinskih ostataka u proteinu (Čalyševa i Vihinen, 2017). Rezultati analize pokazali su kako mutacija D-box motiva nije uzrokovala pojavu sudara u odabranim strukturama Rrp6 (slika 9, tablica 6). Provjera stabilnosti proteina Rrp6 s mutacijom Δdb provedena je i s Missense3D. Missense3D je bioinformatički alat koji predviđa strukturne promjene uvedene supstitucijom aminokiselina kao strukturno štetne ili neutralne na temelju 16 strukturnih značajki kao što su pucanje ionskih i disulfidnih veza, promjene u šupljinama u unutrašnjosti proteina (engl. *cavity*), pojava sudara itd. Program dopušta provjeru strukture sa supstitucijom isključivo jedne aminokiseline, zbog čega je napravljena zasebna analiza za supstitucije R325A (AHSL) i L328A (RHSA) u proteinskoj strukturi Rrp6 kvasca preuzetoj s PDB-a. Detaljna analiza 2HBJ, 5C0W, 5C0X i 5C0Y struktura Rrp6 Missense3D alatom pokazala je kako supstitucije ne uzrokuju promjene u stabilnosti, izuzev mogućnosti promjene u dimenzijama određenih šupljina u unutrašnjosti proteina supstitucijom leucina u alanin u modelima 5C0W i 5C0Y (tablica 6)



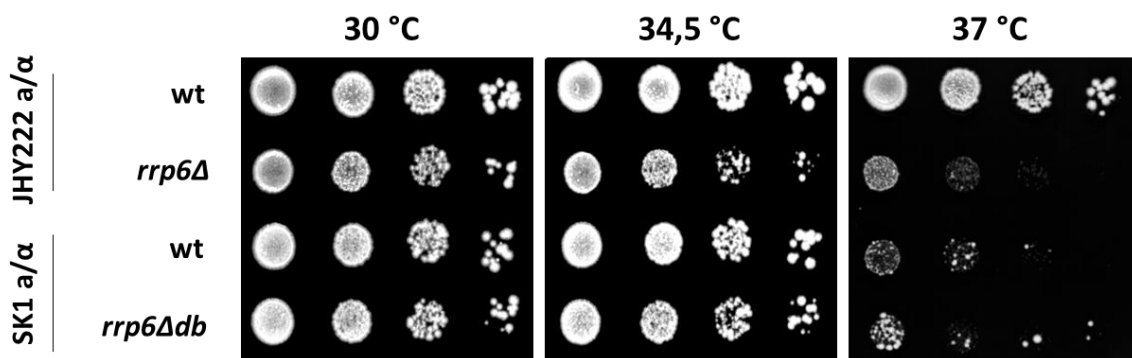
Slika 9. Ispitivanje stabilnosti strukture Rrp6 s R325A i L328A supstitucijom. Motiv u strukturi nativnog Rrp6 (RHSL) i Rrp6 s mutacijom Δdb (AHSA) vizualizirani su u programu UCSF Chimera 1.16.

Tablica 6. Rezultati analize ispitivanja stabilnosti Rrp6 sa supstitucijama R325A i L328A u programu UCSF Chimera 1.16. te stabilnosti Rrp6 sa zasebnim supstitucijama R325A (AHSL) i L328A (RHSA) u alatu Missense3D

Model	UCSF Chimera	Missense3D	
	A H S A	A H S L	R H S A
	Sudari (DA/NE)	Rezultati analize	
2HBJ	NE	stabilna struktura	stabilna struktura
5C0W	NE	stabilna struktura	pojava šupljine
5C0X	NE	stabilna struktura	stabilna struktura
5C0Y	NE	stabilna struktura	pojava šupljine

Kako bi se dodatno potvrdilo dolazi li do promjene stabilnosti Rrp6 uvođenjem mutacije Δdb , provedena je i eksperimentalna analiza. Poznato je da stanice kojima nedostaje Rrp6 (*rrp6* Δ) pri povišenoj temperaturi pokazuju fenotip slabijeg rasta (Briggs i sur., 1998). Sukladno tome, slabiji rast stanica *rrp6* Δdb u usporedbi s rastom divljeg tipa ukazao bi na nestabilnost proteina Rrp6. U svrhu ispitivanja stabilnosti *rrp6* Δdb , provedena je metoda testa rasta (engl. *plate assay*). Test rasta je semi-kvantitativna metoda za ispitivanje vijabilnosti stanica te usporedbu rasta određenih mutanata u odnosu na rast stanica divljeg tipa. Stanice

JHY222 divljeg tipa (engl. *wild type*, wt) i *rrp6Δ* korištene su kao kontrolne diploidne stanice za učinak mutacije *rrp6Δ* (budući da ista nije vijabilna u liniji sojeva SK1) te su uz sojeve SK1 wt i *rrp6Δdb* uzgojene u YNB tekućoj podlozi pri 30 °C do logaritamske faze. Njihov rast potom je ispitan na istovjetnim krutim podlogama pri fiziološkoj temperaturi od 30 °C i restriktivnim temperaturama od 34,5 i 37 °C tijekom tri dana. Za razliku od rasta stanica divljeg tipa (JHY222 wt), rast JHY222 *rrp6Δ* pri povišenoj temperaturi karakterizira letalan fenotip, što je u skladu s prethodno pokazanom temperaturnom osjetljivošću *rrp6Δ* (Briggs i sur., 1998). Fenotip slabijeg rasta uočljiv je na obje povišene temperature, ali je značajniji pri 37 °C. Nadalje, test rasta SK1 *rrp6Δdb* pokazao je podjednaku temperaturnu osjetljivost kao i SK1 stanice divljeg tipa (SK1 wt), koje su osjetljivije od onih linije sojeva JHY222 (slika 10). Sličan fenotip rasta sojeva SK1 wt i *rrp6Δdb* na svim ispitanim temperaturama ukazuje na nepromijenjenu stabilnost proteina Rrp6. Dakle, rezultati bioinformatičke i eksperimentalne analize stabilnosti proteina Rrp6 s mutacijom Δdb potvrđuju da mutacija Δdb nema negativan učinak na stabilnost proteina Rrp6.



Slika 10. Test rasta JHY222 wt i *rrp6Δ* te SK1 wt i *rrp6Δdb* pri fiziološkoj temperaturi od 30 °C te restriktivnim temperaturama od 34,5 i 37 °C. Stanice su uzgojene pri 30 °C do logaritamske faze rasta u tekućoj YNB podlozi. Zatim su decimalna razrjeđenja takvih kultura nakapana na krutu podlogu na kojoj su stanice rasle tri dana pri navedenim temperaturama.

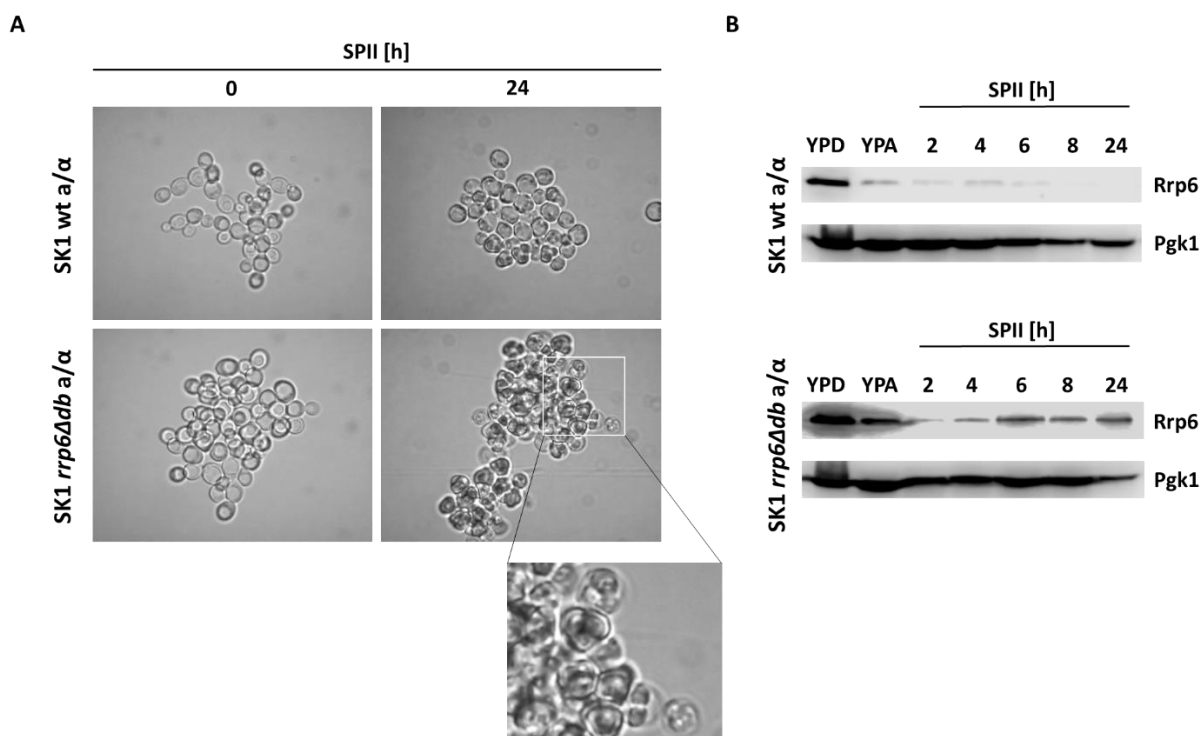
4.1.3. Mutacija Δdb rezultira održanom razinom proteina Rrp6 tijekom cijele mejoze i sporulacije

Nakon što je pokazano kako se stabilnost proteina Rrp6 ne narušava uvođenjem mutacije Δdb , sljedeći korak bio je ispitati utjecaj ove mutacije na stabilnost proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije. Pretpostavka je da se, ukoliko je Rrp6 supstrat APC/C kompleksa

tijekom mejoze, APC/C neće moći vezati na inačicu proteina Rrp6 Δdb i označiti Rrp6 za degradaciju proteasomom. Dakle, ukoliko je Rrp6 supstrat APC/C kompleksa, kod soja *rrp6 Δdb* očekuje se održana razina Rrp6 tijekom mejoze.

Stanice SK1 wt i *rrp6 Δdb* prvo su uzgojene u bogatoj YPD podlozi. Zatim su precjepljene u pretsporulacijsku YPA podlogu te na kraju u SPII podlogu koja sadrži samo kalijev acetat. Uvjeti uzgoja u kojima stanice kvasca kao izvor ugljika koriste isključivo acetat, a istovremeno nije prisutan izvor dušika, nazivaju se sporulacijskim jer potiču mejozu i sporulaciju stanica. Inkubacija stanica u sporulacijskim uvjetima trajala je 24 h, nakon čega su stanice vizualizirane svjetlosnim mikroskopom. Usporedbom stanica sojeva SK1 wt i *rrp6 Δdb* na početku i kraju uzgoja u SPII podlozi (0 i 24 h) može se uočiti kako nema razlike u rastu, morfologiji te sporulaciji, budući da je kod oba soja uočljiva prisutnost velikog broja karakterističnih askusa spora nakon 24 h (slika 11A).

Kako bi se dobio uvid u razinu proteina Rrp6, izuzimani su uzorci kulture u određenim točkama uzgoja (YPD, YPA, SPII: 2, 4, 6, 8, 24 h) s kojima je zatim provedena izolacija ukupnih proteina. Izolirani proteinski ekstrakti podvrgnuti su imunoblot analizi za semi-kvantitativno određivanje razine proteina Rrp6. U tu svrhu, korišteno je poliklonalno antitijelo α -Rrp6 koje prepoznaje C-terminus proteina Rrp6 kvasca *S. cerevisiae*. U svim ekstraktima, dodatno je analizirana razina proteina fosfoglicerat kinaze 1 (engl. *phosphoglycerate kinase 1*, Pgc1), enzima glikolize. Pgc1 je konstitutivno eksprimirani protein koji se često koristi za normalizaciju ekspresije proteina od interesa, u ovom slučaju Rrp6. Za detekciju Pgc1 u proteinskim ekstraktima upotrijebljeno je komercijalno monoklonalno antitijelo α -Pgc1. Rezultati imunoblot analize s ekstraktima soja SK1 wt pokazali su kako je tijekom uzgoja u YPD podlozi prisutna značajna količina proteina Rrp6, a njegova razina smanjuje se već prilikom inkubacije u pretsporulacijskoj YPA podlozi (slika 11B). Značajniji pad razine Rrp6 vidljiv je tijekom ranih faza mejoze, a tijekom kasnijih se više ne može detektirati, što je u skladu s prethodno pokazanim rezultatima (Lardenois i sur., 2011). U stanicama soja SK1 *rrp6 Δdb* također dolazi do smanjenja razine proteina Rrp6 prilikom prijelaza s YPD na YPA podlogu. Međutim, razina proteina Rrp6 tijekom mejoze značajno je očuvana, odnosno protein se može detektirati u svim fazama mejoze. Sukladno tome, može se zaključiti da pad razine proteina Rrp6 tijekom mejoze zahtijeva njegovo prepoznavanje od strane APC/C kompleksa, što upućuje na proteolitički mehanizam regulacije razine proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije.

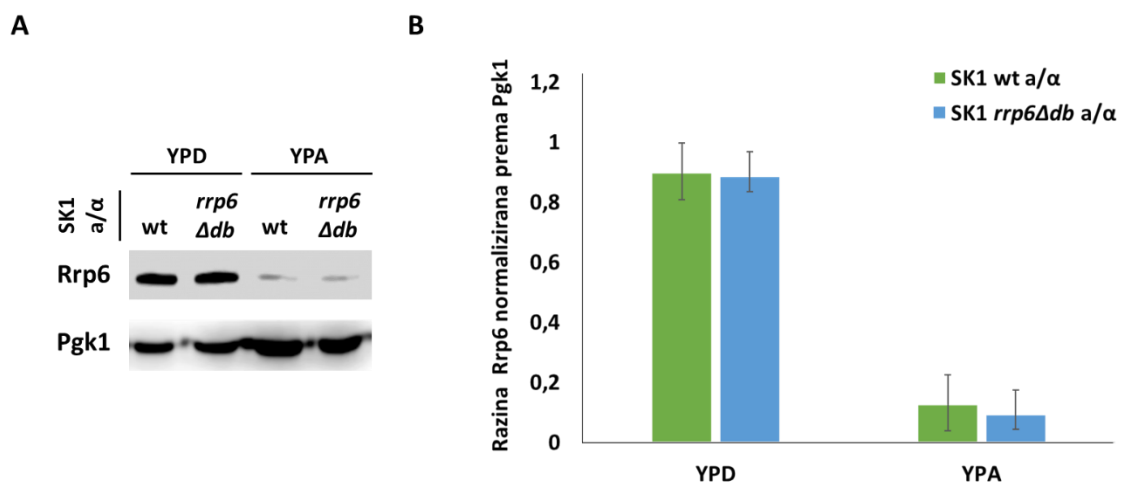


Slika 11. Analiza fenotipa sporulacije i razine proteina Rrp6 tijekom mejoze kod sojeva SK1 wt i *rrp6Δdb*. **A)** Fenotip stanica SK1 wt i *rrp6Δdb* u nultom satu te nakon 24 sata uzgoja u SPII podlozi vizualiziran je svjetlosnim mikroskopom. **B)** Imunoblot analiza proteina Rrp6 i Pgk1 u ekstraktima sojeva SK1 wt i *rrp6Δdb* prilikom uzgoja u podlogama YPD, YPA te SPII (2, 4, 6, 8, 24 h).

4.1.4. Mutacija Δdb ne utječe na razinu proteina Rrp6 prilikom prijelaza s fermentabilnih na respirativne uvjete uzgoja

Prethodno je pokazano kako razina proteina Rrp6, osim tijekom mejoze, pada i tijekom prijelaza s fermentabilnih na respirativne uvjete uzgoja (Poglavlje 4.1.3.). U bogatoj YPD podlozi stanice kao izvor ugljika koriste glukozu koja izostaje u pretsporulacijskoj YPA podlozi. Uobičajeni protokol za indukciju učinkovite sporulacije provodi se u bogatom YPA mediju koji sadrži acetat te na taj način predstavlja pretposporulacijsku podlogu za prilagodbu stanica na slijedeće sporulacijske uvjete. Cilj ovog eksperimenta bio je provjeriti utječe li mutacija Δdb , osim na razinu Rrp6 tijekom mejoze, i na razinu Rrp6 tijekom prijelaza s fermentabilnih na respirativne uvjete uzgoja. U svrhu toga, imunoblot metodom su analizirani proteinski ekstrakti SK1 wt i *rrp6Δdb* stanica uzgojenih u YPD i YPA podlozi. Rezultati takve analize neovisno su ponovljeni tri puta te je intenzitet proteinskih vrpca kvantificiran u

programu Gel Analyzer. Obzirom na jednaki pad u razini proteina Rrp6 kod stanica divljeg tipa i *rrp6Δdb* mutanta vidljiv na rezultatima imunoblot analize (slika 12A) i kvantifikacije (slika 12B), pokazano je kako se pad u razini Rrp6 prijelazom s fermentacijskih na respirativne uvjete događa neovisno o mutaciji Δdb . Ovaj rezultat upućuje na zaključak da prepoznavanje od strane APC/C kompleksa nije ključno za pad razine proteina Rrp6 tijekom prijelaza s fermentacijskih na respirativne uvjete uzgoja. Međutim, budući da je razina Rrp6 u ovom eksperimentu ispitana s mutacijom samo jednog od mogućih šest D-box motiva proteina Rrp6, moguće je da bi inaktivacija drugih APC/C motiva ili istovremena inaktivacija većeg broja motiva pokazala drugačiji učinak.



Slika 12. Ispitivanje razine proteina Rrp6 prilikom prijelaza s fermentacijskih (YPD) na respirativne uvjete uzgoja (YPA) imunoblot analizom (A) i kvantifikacijom imunoblot rezultata u programu Gel Analyzer (B)

4.2. Utjecaj inhibicije proteasoma na razinu proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije

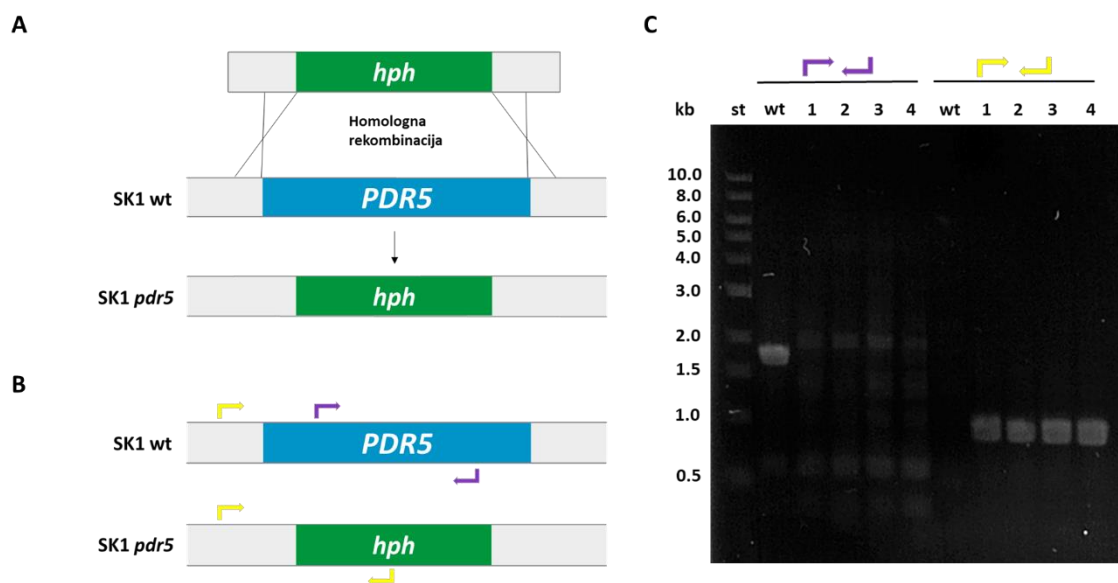
Proteasom je multiproteinski kompleks odgovoran za razgradnju proteina *Archea* te eukariotskih i nekih prokariotskih stanica. Supstrati proteasoma su kratkoživući, oštećeni, pogrešno smotani ili na neki drugi način nestabilni te nepotrebni proteini koje proteasom prepoznaje prema kovalentno vezanom ubikvitinu. Proteasom ima ključnu ulogu u kontroli staničnog ciklusa, mejoze i apoptoze degradacijom širokog raspona supstrata (Hilt i Wolf, 1995). Aktivnosti E1, E2 i E3 enzima ubikvitin-proteasom sustava potrebni su za ubikvitinaciju proteina. U ovome radu pokazano je kako je Rrp6 jedan od supstrata E3 APC/C kompleksa tijekom mejoze (Poglavlje 4.1.3.), a budući da protein obilježen ubikvitinom prepoznaje i degradira proteasom, može se pretpostaviti da i Rrp6 podliježe takvoj proteolitičkoj

degradaciji. U tom bi slučaju inhibicija proteasoma tijekom mejoze stabilizirala razinu Rrp6. Inhibicija proteasoma može se provesti različitim inhibitorima, a u ovome radu upotrebljen je MG132, kratki sintetički peptidni aldehid koji blokira aktivna mjesta proteasoma i posljedično inhibira razgradnju proteina konjugiranih ubikvitinom (Gaczynska i Osmulski, 2005). Međutim, uporabu inhibitora proteasoma kod kvasca *S. cerevisiae* onemogućuje nepropusnost stanične stijenke i membrane jer kvasac posjeduje proteine koji dovode do otpornosti na širok raspon citotoksičnih spojeva (Lee i Goldberg, 1996). Ovi proteini kodirani su genima koji su zajednički poznati kao geni za pleiotropnu rezistenciju na lijekove (engl. *pleiotropic drug resistance*, *PDR*) (Balzi i Goffeau, 1991). Budući da stanice kvasca nisu nativno permeabilne za inhibitor proteasoma MG132, prvo su konstruirane stanice diploidnog mutanta *pdr5* koje su propusne za ovaj inhibitor.

4.2.1. Konstrukcija soja SK1 *pdr5 a/a*

Za konstrukciju diploidnog mutanta *pdr5* (SK1 *pdr5 a/a*), mutacija *pdr5* prvo se uvodi u haploidne stanice divljeg tipa (SK1 wt), a konstruirani mutant zatim se diploidizira. Za konstrukciju haploidnog mutanta korištena je prethodno umnožena disrupcijska kazeta *pdr5::hph* koja se homolognom rekombinacijom ugrađuje u genom kvasca tako da deletira gen *PDR5* na čije se mjesto ugrađuje marker gen *hph* (slika 13A). Stanice s uspješnom ugradnjom selekcioniraju se na podlozi s antibiotikom higromicinom, a uspješnost ugradnje na odgovarajuće mjesto u genomu provjerava se genotipizacijom. Genotipizaciji prethodi izolacija genomske DNA iz četiri različite kolonije mutanata *pdr5* i jedne kolonije ishodnog soja (divlji tip, wt). Izolirana genomska DNA genotipizira se PCR metodom uz odgovarajuće parove početnica. Uspješnost umnažanja PCR produkata, čija veličina ovisi o genotipu stanice, analizira se gel elektroforezom. Prvi set početnica korišten za genotipizaciju hibridizira se unutar lokusa *PDR5*, čime se s genomskom DNA ishodnog soja umnaža PCR produkt veličine 1711 pb (slika 13B, C). Kod genotipizacije uspješno konstruiranog mutanta *pdr5* ne očekujemo umnažanje produkta budući da se početnice ne mogu hibridizirati unutar *PDR5* jer je isti zamijenjen *hph*. Drugi set početnica hibridizira se unutar lokusa *hph* te uzvodno od lokusa *PDR5* (slika 13B). U tom slučaju, genotipizacijom genomske DNA ishodnog soja ne očekujemo umnažanje produkta budući da se *reverse* početnica veže unutar gena *hph* kojeg kvasac nativno nema u genomu (slika 13C). S druge strane, uspješno konstruirani mutant *pdr5* sadrži gen *hph* na lokusu *PDR5* te u tom slučaju očekujemo umnažanje fragmenta veličine 894

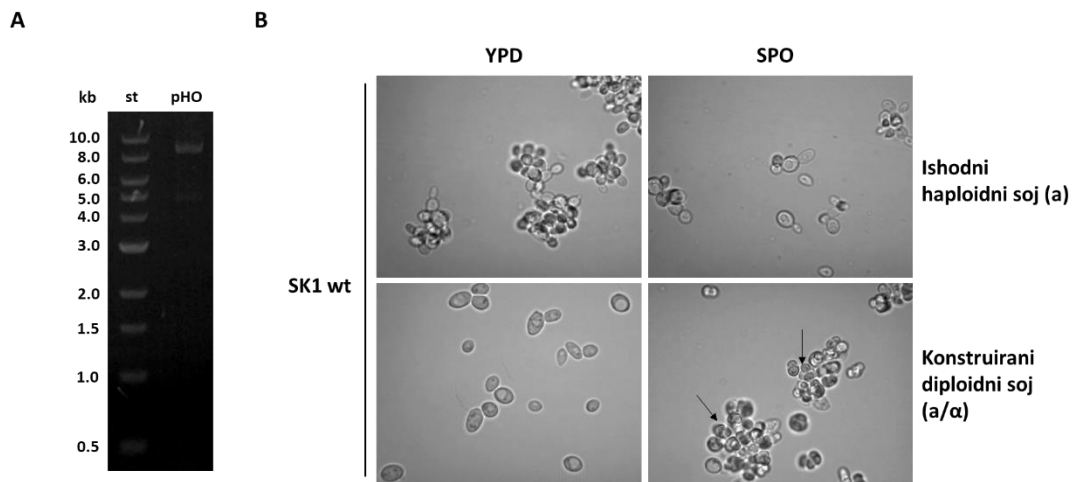
pb. Na temelju rezultata genotipizacije s oba seta početnica, potvrđena je uspješna konstrukcija mutanta SK1 *pdr5*.



Slika 13. Delecija gena *PDR5* te genotipizacija genomske DNA ishodnog soja (SK1 divlji tip, wt) i mutanata *pdr5* (SK1 *pdr5*, 1-4) uz odgovarajuće setove početnica (mjesto hibridizacije označena su ljubičastim i žutim strelicama). **A)** Shematski prikaz zamjene gena *PDR5* s disrupcijskom kazetom *pdr5::hph* homolognom rekombinacijom. **B)** Shematski prikaz hibridizacije početnica. Prvi set početnica (ljubičaste strelice) hibridizira se unutar gena *PDR5*. Drugi set početnica (žute strelice) hibridizira se uzvodno od gena *PDR5*, u genomskoj DNA, te unutar gena *hph*. **C)** Gel elektroforeza umnoženih PCR produkata odgovarajuće veličine. Uzorci: DNA standardi (st) i PCR produkti genotipizacije genomske DNA divljeg tipa i mutanata *pdr5* (1-4).

Budući da su laboratorijski sojevi kvasca najčešće haploidi koji ne mogu mijenjati tip parenja zbog mutacije u genu koji kodira za endonukleazu HO (engl. *homothallic switching endonuclease*, HO), za diploidizaciju takvih sojeva potrebna je transformacija s plazmidom s kojeg se eksplicira gen *HO* (pHO). Takav plazmid prethodno je transformiran u *E.coli* te pohranjen u obliku trajne kulture. U svrhu izolacije pHO, bakterijske stanice su nacijeppljene u LB hranjiviji medij s dodatkom ampicilina. Iz uzorka *E. coli* kulture plazmid je zatim izoliran miniprep metodom (Poglavlje 3.2.7.), a uspješnost izolacije plazmida provjerena je elektroforezom u 0,8 % gelu (slika 14A). Sljedeći protokol diploidizacije i selekcije opisan je na primjeru konstrukcije diploidnih stanica divljeg tipa, međutim, ekvivalentno je proveden za diploidizaciju i selekciju mutanta *pdr5*. Detaljniji opis diploidizacije i selekcije nalazi se u

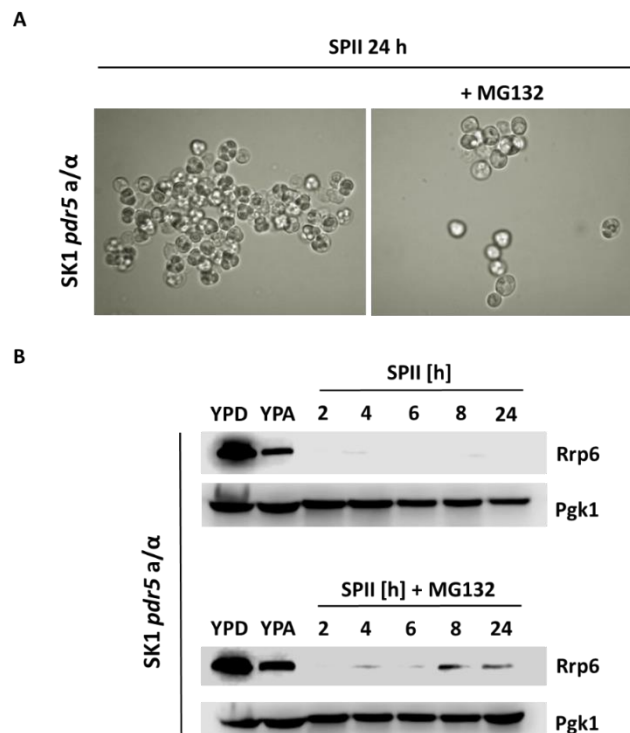
poglavlju 3.2.8. Ukratko, izolirani plazmid pHO koji sadrži marker gen *URA3* transformiran je u haploidne stanice ishodnog soja divljeg tipa, nakon čega je provedena selekcija transformiranih stanica na hranjivoj podlozi bez uracila. Slijedilo je precjepljivanje stanica na podlogu koja sadrži 5-FOA kako bi se provela selekcija stanica koje su izbacile plazmid, budući da je za diploidizaciju sojeva bila poželjna samo kratkotrajna ekspresija endonukleaze HO. Naime, stanice koje nisu izbacile plazmid ne mogu rasti na podlozi s 5-FOA jer sadrže i marker gen plazmida *URA3* koji kodira za orotidin-5'-fosfat dekarboksilazu, enzim koji katalizira pretvorbu 5-FOA u toksični produkt fluorouracil (Boeke i sur., 1987). Uspješnost diploidizacije potvrđena je inkubacijom na krutoj YPD podlozi, na kojoj su, u skladu s očekivanim, diploidne stanice većeg volumena i izduženije morfologije od haploidnih (slika 14B). Također, sposobnost sporulacije provjerena je inkubacijom konstruiranih diploida na krutoj SPO podlozi (engl. *sporulation media*). Nakon pet dana inkubacije, diploidne stanice divljeg tipa vizualizirane su svjetlosnim mikroskopom, pri čemu je vidljivo kako diploidni soj, za razliku od haploidnog, uspješno sporulira (slika 14B). Jednaki rezultati dobiveni su i za konstruirani soj *pdr5 a/a*.



Slika 14. Diploidizacija SK1 wt *a/a*. **A)** Gel elektroforeza izoliranog plazmida pHO. Uzorci: DNA standardi (st) te plazmid pHO. **B)** Fenotip haploidnih i diploidnih stanica divljeg tipa na YPD i SPO podlozi vizualiziran je svjetlosnim mikroskopom. Spore su označene strelicama.

4.2.2. Inhibicija proteasoma rezultira održanom razinom Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije

Kako bi se provjerio utjecaj proteasoma na razinu Rrp6 tijekom mejoze, uspješno konstruirani a/α soj *pdr5*, permeabilan za inhibitor proteasoma (MG132), uzgojen je u uvjetima mejoze i sporulacije kao što je opisano u poglavlju 4.1.3. Stanice se uzgajaju u YPD, YPA te potom SPII podlozi sa ili bez dodanog MG132. U svrhu provjere fenotipa stanica nakon 24 sata uzgoja u SPII sa ili bez MG132, stanice su vizualizirane svjetlosnim mikroskopom. U oba uvjeta uzgoja, prisutan je velik broj karakterističnih askusa spora (slika 15A). Kako bi se dobio uvid u razinu proteina Rrp6, izuzimani su uzorci kulture u određenim točkama uzgoja (YPD, YPA, SPII: 2, 4, 6, 8, 24 h) s kojima je zatim provedena izolacija ukupnih proteina. Izolirani proteinski ekstrakti podvrgnuti su imunoblot analizi za određivanje razine proteina Rrp6. Rezultati, dobiveni usporedbom sa stanicama koje su sporulirale bez prisutnosti MG132, su pokazali kako se Rrp6 kod stanica uzgojenih s MG132 mogao detektirati i u kasnijim satima mejoze (slika 15B). Moguće je da se nešto slabiji učinak stabilizacije u odnosu na onaj postignut mutacijom Δdb može pripisati slabijoj permeabilnosti stanica za MG132 u sporulacijskim uvjetima uzgoja. Budući da u uvjetima u kojima je proteasom inhibiran dolazi do stabilizacije Rrp6, može se zaključiti kako je Rrp6 supstrat proteasoma tijekom mejoze. Sumarno, degradacija proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije odvija se putem ubikvitin-proteasom puta, odnosno ubikvitinacijom APC/C kompleksom te finalno degradacijom proteasomom.

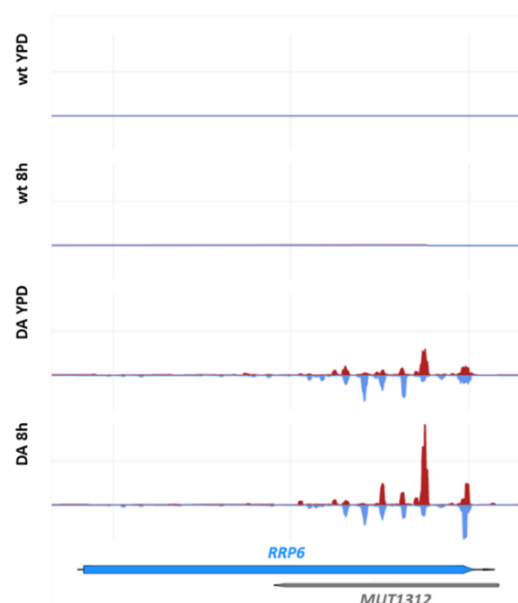


Slika 15. Analiza fenotipa sporulacije te razine proteina Rrp6 tijekom mejoze SK1 *pdr5 a/a* stanica uzgojenih u SPII podlozi bez ili sa inhibitora MG132. **A)** Fenotip stanica SK1 *pdr5 a/a* nakon 24 sata uzgoja u SPII podlozi sa ili bez MG132 vizualiziran je svjetlosnim mikroskopom. **B)** Imunoblot analiza proteina Rrp6 i Pgk1 soja SK1 *pdr5 a/a* prilikom uzgoja u YPD, YPA te SPII (2, 4, 6, 8, 24 h) podlozi bez ili sa inhibitora MG132.

4.3. Uloga nekodirajuće RNA *MUT1312* u regulaciji razine proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije

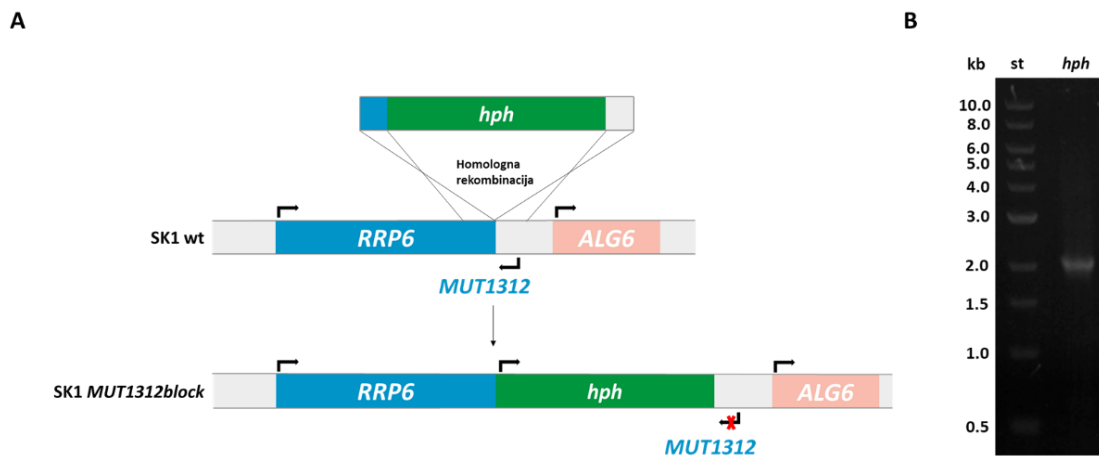
Duge nekodirajuće RNA (engl. *long non-coding RNAs*, lncRNAs) su transkripti duljine veće od 200 parova baza koji ne kodiraju za proteine. Međutim, njihova uloga očituje se u nizu različitih regulatornih procesa na transkripcijskoj i posttranskripcijskoj razini. Regulatorne lncRNA eksprimiraju se u određenim razvojnim fazama ili kao odgovor na nutritivne ili okolišne promjene (Hung i Chang, 2010). Jedan od primjera mehanizama posttranskripcijske regulacije dugom nekodirajućom RNA je komplementarno sparivanje *antisense* RNA s mRNA. *Sense-antisense* hibridizacijom stvara se dvolančana RNA (dsRNA) koja može ometati modifikaciju i translaciju mRNA, te njen transport ili zadržavanje u jezgri (Faghihi i Wahlestedt, 2009). Iako je za kvasac *Saccharomyces cerevisiae* poznato da se nekodirajuće RNA transkribiraju tijekom mitoze, pri čemu imaju različite regulatorne uloge, ekspresija lncRNA u mejozi te njihova mejotička regulatorna uloga nisu dovoljno istražene. U Lardenois i sur., pokazano je da postoje nekodirajuće RNA koje se stabiliziraju tijekom mejoze (MUT), a inače su degradirane tijekom mitoze egzoribonukleazom Rrp6. Obzirom na stabilizaciju MUT transkriptata u mejozi, pretpostavka je da sudjeluju u njejoj regulaciji. Analiza transkriptoma kvasca *S. cerevisiae* u sporulacijskim uvjetima ukazala je na moguću regulaciju razine ekspresije Rrp6 s nekodirajućom RNA *MUT1312*, koja nastaje *antisense* transkripcijom na lokusu *RRP6* (slika 7). U sporulacijskim uvjetima uzgoja dolazi do pojačane stabilizacije *MUT1312*, koju prati stabilna transkripcija *sense*/mRNA *RRP6*. Istovremeni pad razine proteina Rrp6 i pojačana ekspresija nekodirajuće RNA *MUT1312* sugeriraju da bi *antisense* transkripcija mogla imati ulogu u regulaciji ekspresije Rrp6. U skladu s ovom pretpostavkom, preliminarni rezultati sekvenciranja RNA istraživačke grupe M. Primiga (IRSET Inserm, Rennes, Francuska) pokazuju formiranje dvolančane RNA *RRP6/MUT1312* u stanicama kvasca tijekom mejoze. Iako su stanice kvasca evolucijski izgubile mehanizam RNA interferencije (RNAi) (Drinnenberg i sur., 2011), u svrhu detekcije dsRNA za ovu analizu je

sustav RNAi rekonstruiran u kvascu ekspresijom proteina Dicer i Argonaute (Ago) (Drinnenberg i sur., 2009). Endonukleaza Dicer cijepa dvolančanu RNA (dsRNA) u male interferirajuće RNA (siRNA) veličine oko 20 nukleotida (Zhang i sur., 2004). Zatim se svaka siRNA odmotava u dvije jednolančane RNA, *sense* i *antisense*. Protein Argonaute degradira *sense* lanac, a veže *antisense* lanac kako bi omogućio cijepanje ciljnih transkripata (Liu, 2012; Kim i Rossi, 2008). Lanci razgrađeni sustavom RNAi su vrlo kratki te u pravilu nisu prisutni u stanicama kvasca *S. cerevisiae* divljeg tipa koji ne sadrži ovaj sustav. Sukladno tome, provođenje metode sekvenciranja kratkih molekula RNA preferencijalno omogućuje detekciju ovih transkripata kod soja u kojem je rekonstituiran sustav RNAi te, posljedično, daje informaciju o sekvencama molekula RNA koje su se nalazile u strukturi dvolančane RNA. Dakle, pojava signala potvrđuje formiranje dsRNA te degradaciju istog RNAi mehanizmom, a sekvenciranje takvih RNA daje informaciju o specifičnoj regiji transkripta koji je bio dio dsRNA strukture. Rezultati ove analize objedinjeni su u obliku baze podataka koja sadrži transkripte kvasca kod kojih dolazi do formiranja dsRNA prilikom uzgoja u YPD i SPII (istraživačka grupa M. Primiga, neobjavljeni rezultati). Kod stanica divljeg tipa u YPD i SPII podlozi očekivano nije detektiran signal (slika 16, wt YPD, SPII 8 h). Međutim, kod stanica s eksprimiranim proteinima Dicer i Argonaute (DA) pojavljuje se signal na regiji na kojoj se *RRP6* preklapa s *MUT1312* (slika 16, DA YPD, SPII 8 h). Signal detekcije dsRNA još jače je izražen kod uzgoja u SPII podlozi, što je u skladu s očekivanjima budući da se *MUT* transkripti akumuliraju u mejozi i sporulaciji (Lardenois i sur., 2011). Rezultati analize na slici 16 pokazuju formiranje dsRNA u regiji *RRP6-MUT1312*, a time sugeriraju i potencijalni mehanizam inhibicije sinteze proteina Rrp6 pomoću *antisense* RNA.



Slika 16. Analiza formiranja dsRNA u stanicama divljeg tipa kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i istovjetnim stanicama s eksprimiranim proteinima Dicer i Argonaute (DA) prilikom uzgoja u YPD i SPII (8 h) podlozi (prilagođeno prema Primig, 2019)

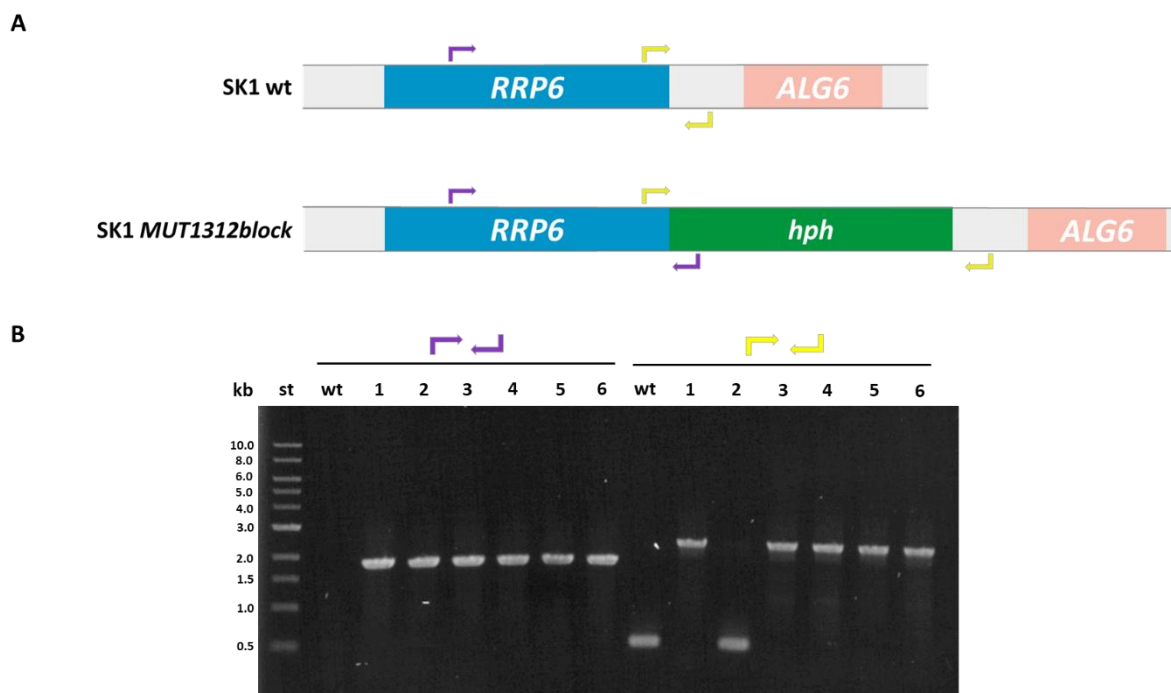
U svrhu ispitivanja utjecaja *antisense* transkripta *MUT1312* na ekspresiju Rrp6 tijekom mejoze, odabran je pristup inaktivacije njegove transkripcije, kako bi se ispitalo hoće li u tim uvjetima doći do pojačane razine ekspresije Rrp6 tijekom mejoze. Budući da se *MUT1312* velikim dijelom preklapa s kodirajućom regijom gena *RRP6*, nije bilo moguće deletirati cijelu regiju *MUT1312* bez da se izravno utječe na ekspresiju *RRP6*. Nizvodno od gena *RRP6* se nalazi gen *ALG6* (slika 7). Budući da su bidirekcionalni promotori česti kod kvasca (Xu i sur., 2009), postoji mogućnost da *ALG6* i *MUT1312* dijele bidirekcionalnu promotorsku regiju. Gen *ALG6* kodira za protein ključan za pravilno odvijanje početnih koraka glikozilacije, esencijalnog procesa stanica, zbog čega bi delecija ili mutacija promotorske regije *ALG6* mogla rezultirati štetnim promjenama i utjecati na fenotip mutanta. Sukladno tome, odabrana je strategija za blokiranje transkripcije *MUT1312* u kojoj se nakon STOP kodona ORF-a *RRP6* ugrađuje marker gen *hph*, koji bi kao razmaknica imao ulogu sprječavanja transkripcije *MUT1312* preko ORF-a *RRP6* (slika 17A).



Slika 17. Konstrukcija soja SK1 *MUT1312block*. **A)** Shematski prikaz ugradnje *hph* kazete homolognom rekombinacijom u svrhu konstrukcije soja s blokiranom transkripcijom nekodirajuće RNA *MUT1312*. Kazeta se homolognom rekombinacijom ugrađuje u regiju gena *RRP6* nakon STOP kodona. Nizvodno od *RRP6* i *MUT1312* nalazi se gen *ALG6*. **B)** Gel elektroforeza PCR reakcijom umnožene kazete *hph* veličine 2042 pb. Uzorci: DNA standardi (st) te PCR produkt (kazeta *hph*).

4.3.1. Konstrukcija soja SK1 *MUT1312 a/α*

Za konstrukciju diploidnog mutanta *MUT1312block* (SK1 *MUT1312block a/α*), *MUT1312block* mutacija prvo se uvodi u haploidne stanice divljeg tipa (SK1 wt), a konstruirani mutant zatim se diploidizira. Za konstrukciju haploidnog mutanta korištena je kazeta koja nosi marker gen *hph*. Kazeta se homolognom rekombinacijom ugrađuje u genom kvasca nakon STOP kodona u ORF-u *RRP6* tako da blokira transkripciju *MUT1312* (slika 17A). Također, kazeta je prethodno umnožena PCR reakcijom, a dobiveni produkt reakcije provjeren gel elektroforezom, pri čemu je veličina produkta u skladu s očekivanom (2042 pb) (slika 17B). Umnožena kazeta *hph* transformirana je u haploidne stanice kvasca divljeg tipa koje su zatim selekcionirane na krutoj hranjivoj podlozi u kojoj je dodan antibiotik higromicin, a uspješnost ugradnje na odgovarajuće mjesto u genomu provjerava se genotipizacijom. Genotipizaciji prethodi izolacija genomske DNA iz šest različitih kolonija mutanta *MUT1312block* i jedne kolonije ishodnog soja (divlji tip, wt). Uspješnost umnažanja PCR produkata, čija veličina ovisi o genotipu stanice, analizira se gel elektroforezom. Prvi set početnica (ljubičaste strelice) hibridizira se unutar lokusa *RRP6* te unutar lokusa *hph*, čime se s genomskom DNA uspješno konstruiranog mutanta *MUT1312* očekuje veličina produkta 1789 pb (slika 18A, B). Genotipizacijom genomske DNA ishodnog soja ne očekuje se umnažanje produkta budući da se *reverse* početnica hibridizira unutar lokusa *hph* kojeg kvasac nativno nema u genomu (slika 18A, B). Drugi set početnica (žute strelice) hibridizira se unutar ORF-a *RRP6* te u regiji nizvodno od ORF-a *RRP6*, zbog čega se genotipizacijom genomske DNA mutanta *MUT1312block* očekuje umnažanje produkta veličine 2373 pb. Dobiveni PCR produkt sadrži dio lokusa *RRP6*, lokus *hph* te dio genomske DNA (slika 18A, B). Genotipizacijom genomske DNA ishodnog soja također očekujemo umnažanje produkta, međutim, nastali produkt znatno je manje veličine (423 pb), budući da ishodnom soju nedostaje gen *hph* (slika 18B). Genotipizacijom genomske DNA mutanta *MUT1312block* (broj 2) drugim setom početnica pojavljuje se i produkt ekvivalentan veličini produkta divljeg tipa, najvjerojatnije jer je u stanicama tog mutanta došlo do duplikacije kromosoma. Na temelju ostalih rezultata genotipizacije s oba seta početnica, može se zaključiti da je konstrukcija mutanta *MUT1312block* uspješna. Haploidni divlji tip i mutant *MUT1312block* zatim su diploidizirani kao što je opisano u poglavlju 4.2.1.

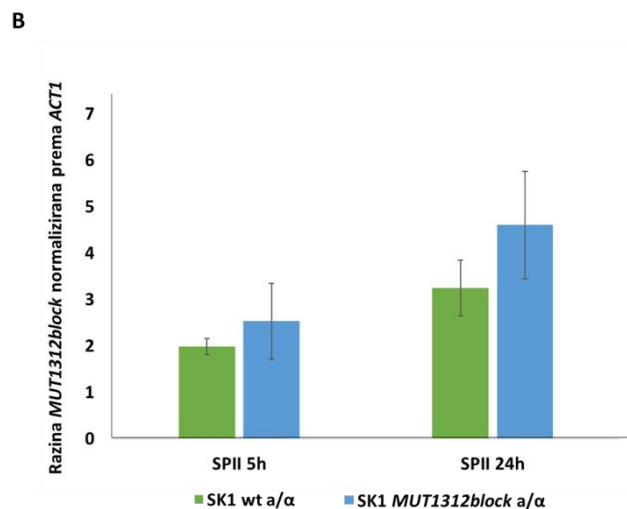
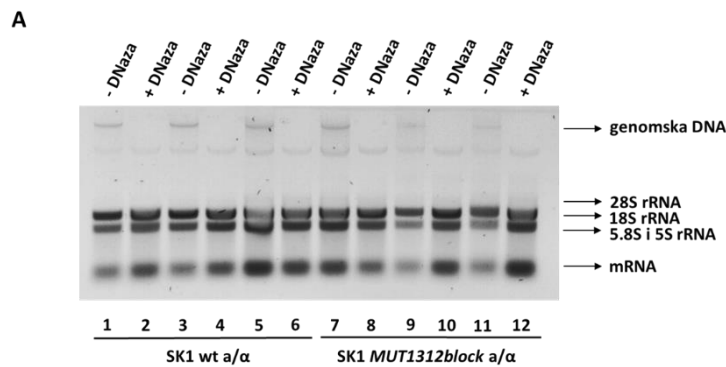


Slika 18. Genotipizacija genomske DNA ishodnog soja (wt) te stanica s blokiranom transkripcijom *MUT1312* (*SK1 MUT1312block*) uz odgovarajuće setove početnica (mjesto hibridizacije označena su ljubičastim i žutim strelicama). **A)** Shematski prikaz mjesta hibridizacije dva seta početnica. Prvi set početnica (ljubičaste strelice) hibridizira se unutar gena *RRP6* te unutar gena *hph*. Drugi set početnica (žute strelice) hibridizira se u regijama uzvodno i nizvodno od STOP kodona *RRP6*. **B)** Gel elektroforeza umnoženih PCR produkata odgovarajuće veličine. Uzorci: DNA standardi (st) i PCR produkti (wt, *MUT1312block* 1-6).

4.3.2. U soju *SK1 MUT1312 a/a* ne dolazi do uspješnog blokiranja transkripcije *MUT1312*

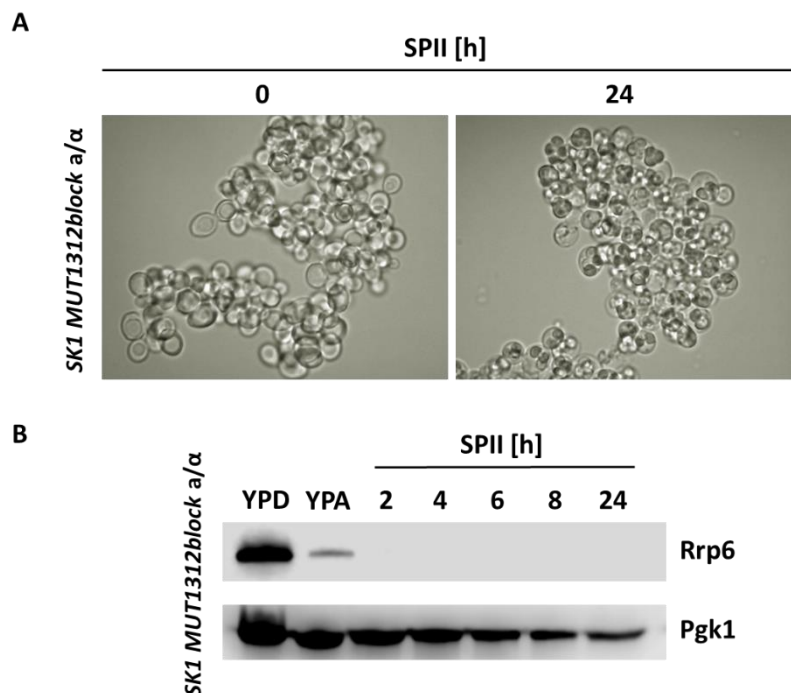
U svrhu provjere uspješnosti konstrukcije diploidnog soja koji ima blokiranu transkripciju *MUT1312*, napravljen je RT-qPCR. Diploidne stanice divljeg tipa te diploidni mutanti *MUT1312block* uzgojeni su u sporulacijskim uvjetima kao što je opisano u poglavlju 4.1.3. Stanice se uzgajaju u YPD, YPA te SPII podlozi. U 5. i 24. satu uzgoja u SPII, iz stanica je izolirana ukupna RNA metodom s vrućim fenolom (Poglavlje 3.2.15.). Izolacija se radila u biološkim triplikatima. Izolirana RNA zatim je obrađena DNazom u svrhu uklanjanja zaostale genomske DNA. Uspješnost tretmana DNazom i integritet izolirane RNA provjereni su gel elektroforezom u 1 % agaroznom gelu. Za razliku od uzoraka prije tretmana DNazom (-DNaza), uzorci nakon tretmana (+DNaza) nemaju zaostalu genomsku DNA. Nadalje, razlučivost različitih vrsta staničnih RNA (28S rRNA, 18S rRNA, 5,8S i 5S rRNA te mRNA) na gelu te nedostatak degradacije RNA, potvrđuju uspješno pročišćavanje uzoraka (slika 19A).

S pročišćenom RNA zatim je napravljena reverzna transkripcija (RT) sa specifičnim početnicama za transkribirani lanac. U takvim uzorcima dolazi do sinteze samo cDNA koja je kao kalup koristila transkript *MUT1312*. Korištene su i specifične početnice za mRNA *ACT1* (engl. *actin*) koja je konstitutivno eksprimirana jer kodira za strukturni protein aktin koji sudjeluje u izgradnji citoskeleta stanice te se zbog toga koristi za normalizaciju razine transkripta *MUT1312*. Produkti reverzne transkripcije kvantificirani su kvantitativnim PCR-om (qPCR) uz odgovarajuće početnice. Rezultati kvantifikacije pokazali su kako je prisutna razina cDNA *MUT1312* kod mutanta SK1 *MUT1312block a/a* slična detektiranoj razini cDNA *MUT1312* kod SK1 wt stanica (slika 19B). Dakle, kod mutanta *MUT1312block* i dalje dolazi do transkripcije *MUT1312*, odnosno blokiranje transkripcije ovom strategijom nije bilo uspješno. Unatoč tome što je u transkriptomskim analizama mjesto početka transkripcije *MUT1312* mapirano nizvodno od ORF-a *RRP6* (slika 7), regije iz kojih inicira transkripcija nekodirajućih RNA često su slabo definirane i ovise o permisivnoj strukturi kromatina na određenoj regiji više nego o definiranim promotorskim sekvencama. Sukladno rezultatima ovog rada, moguće je da transkripcija *MUT1312* može inicirati i unutar 3' kraja ORF-a *RRP6*, zbog čega bi bilo nužno primijeniti drugačiju strategiju da se blokira njena transkripcija.



Slika 19. Provjera uspješnosti izolacije ukupne RNA te blokiranja transkripcije *MUT1312*. **A)** Agarozna gel elektroforeza ukupne RNA sojeva SK1 wt i SK1 *MUT1312block a/a* iz petog sata uzgoja u SII podlozi. Uzorci: RNA ekstrakti prije i poslije tretmana DNAazom (-DNAaza, +DNAaza). Označeni su položaji genomske DNA i stanične RNA (28S rRNA, 18S rRNA, 5,8S i 5S rRNA te mRNA). **B)** Razina transkripta *MUT1312* u 5. i 24. satu mejoze kvantificirana RT-qPCR metodom te normalizirana prema *ACT1*.

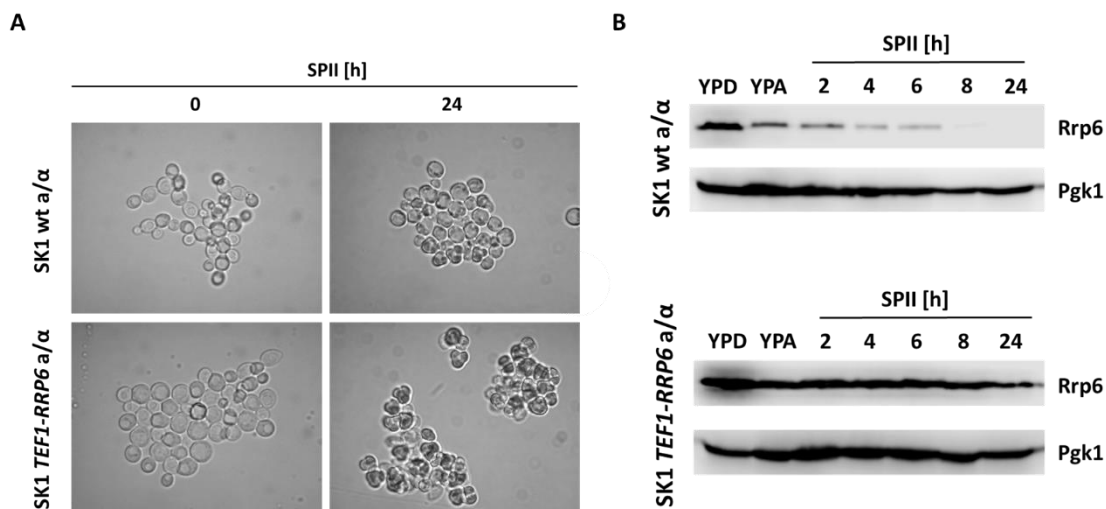
U svrhu ispitivanja razine proteina Rrp6, mutant *MUT1312block a/a* uzgojen je u uvjetima mejoze i sporulacije kao što je opisano u poglavlju 4.1.3. Stanice se uzgajaju u YPD, YPA te potom SII podlozi. Provjerom fenotipa spora nakon prekonoćne inkubacije u SII (24 h) vidljivo je da dolazi do formiranja velikog broja askusa karakteristične morfologije (slika 20A). Također, u određenim točkama uzgoja (YPD, YPA, SII: 2, 4, 6, 8, 24 h) izuzimani su uzorci kulture s kojima je zatim provedena izolacija ukupnih proteina. Izolirani proteinski ekstrakti podvrgnuti su imunoblot analizi za određivanje razine proteina Rrp6. U skladu s očekivanjem, razina proteina Rrp6 smanjuje se te nestaje ulaskom u mejozu (slika 20B). Analiza razine proteina Rrp6 te mogućnosti sporulacije napravljene su u svrhu dodatne provjere stabilizacije Rrp6 kod mutanta *MUT1312block a/a*. Budući da blokiranje transkripcije *MUT1312* nije bilo uspješno, na temelju ovih eksperimenata nije moguće zaključiti potencijalni utjecaj nekodirajuće RNA *MUT1312* na razinu proteina Rrp6 tijekom mejoze.



Slika 20. Analiza fenotipa sporulacije te razine proteina Rrp6 tijekom mejoze soja SK1 *MUT1312block a/a*. **A)** Fenotip stanica SK1 *MUT1312block a/a* vizualiziran je svjetlosnim mikroskopom na početku i kraju uzgoja u SPII podlozi (0 i 24 h). **B)** Imunoblot analiza razine proteina Rrp6 i Pgk1 soja SK1 *MUT1312block a/a* prilikom uzgoja u YPD, YPA te SPII (2, 4, 6, 8, 24 h) podlozi.

4.4. Utjecaj prekomjerne ekspresije Rrp6 na tijek mejoze i sporulacije

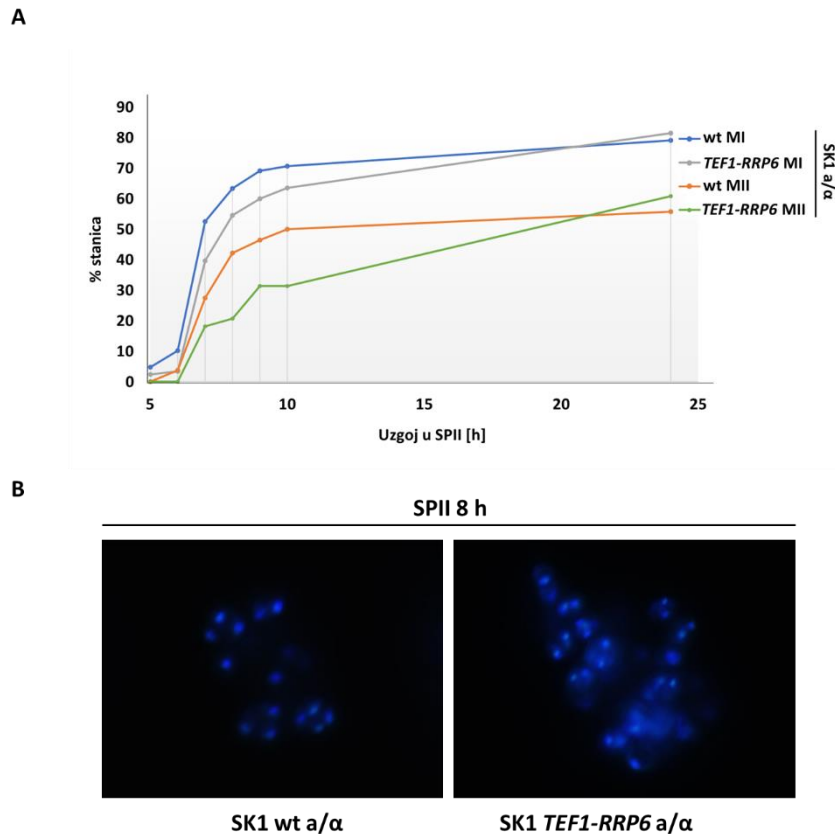
Protein Rrp6 esencijalan je za mejozu i sporulaciju kvasca *S. cerevisiae* (Lardenois i sur., 2011). Međutim, utvrđeno je da se razina proteina Rrp6 stanica kvasca divljeg tipa smanjuje tijekom mejoze te da takve stanice uspješno prolaze kroz mejozu i sporulaciju. U svrhu ispitivanja fiziološke važnosti mejotičkog pada razine Rrp6, odabran je pristup u kojemu se postiže konstitutivna ekspresija Rrp6 u mejozi. U tu je svrhu korišten prethodno konstruirani soj u kojemu dolazi do konstitutivne ekspresije *RRP6* budući da je nativni promotor gena *RRP6* zamijenjen jakim konstitutivnim promotorom *TEF1* (SK1 *TEF1-RRP6*). U svrhu provjere razine proteina Rrp6 kod mutanta *TEF1-RRP6*, stanice divljeg tipa i stanice s prekomjernom ekspresijom *RRP6* uzgajaju se u uvjetima mejoze i sporulacije kao što je opisano u poglavlju 4.1.3. Stanice se uzgajaju u YPD, YPA te potom SPII podlozi. U svrhu provjere fenotipa spora nakon 24 sata uzgoja u SPII, stanice su vizualizirane svjetlosnim mikroskopom. Usporedbom sa stanicama divljeg tipa, vidljivo je da mutanti *TEF1-RRP6* također formiraju veliki broj askusa karakteristične morfologije (slika 21A). Također, u određenim točkama uzgoja (YPD, YPA, SPII: 2, 4, 6, 8, 24 h) izuzimani su uzorci kulture s kojima je zatim provedena izolacija ukupnih proteina. Izolirani proteinski ekstrakti podvrgnuti su imunoblot analizi za određivanje razine proteina Rrp6. Rezultati su pokazali kako prekomjerna ekspresija Rrp6 održava razinu Rrp6 stalnom i visokom u svim satima mejoze, odnosno da je ostvarena potpuna stabilizacija proteina Rrp6 (slika 21B).



Slika 21. Analiza fenotipa sporulacije te razine proteina Rrp6 tijekom mejoze stanica divljeg tipa i stanica s prekomjernom ekspresijom gena *RRP6*. **A)** Fenotip stanica SK1 wt te SK1 *TEF1-RRP6 a/a* vizualiziran je svjetlosnim mikroskopom na početku i kraju uzgoja u SII podlozi (0 i 24 h). **B)** Imunoblot analiza razine proteina Rrp6 i Pgk1 soja SK1 wt i SK1 *TEF1-RRP6 a/a* prilikom uzgoja u YPD, YPA te SII (2, 4, 6, 8, 24 h) podlogama.

Nakon što je potvrđena prekomjerna ekspresija *RRP6*, te je pokazano da je protein Rrp6 prisutan tijekom cijele mejoze, sljedeći korak bio je ispitati kako stalna prisutnost Rrp6 u mejozi utječe na kinetiku prolaska kroz njene faze. U svrhu uvida u tijek i efikasnost sporulacije, stanice divljeg tipa te mutanta *TEF1-RRP6* uzgojene su pri sporulacijskim uvjetima kao što je opisano u poglavlju 4.1.3. Uzorci kulture izuzimani su iz SII podloge u 5., 6., 7., 8., 9., 10. i 24. satu te fiksirani i čuvani u 70 % etanolu. Kako bi se odredila faza mejoze u kojoj se stanice nalaze, stanice su bojane DAPI bojilom. DAPI bojilo (4'-6-diamidino-2-fenilindol) često se koristi u fluorescentnoj mikroskopiji za bojenje kromosoma i jezgre zbog svoje visoke specifičnosti za vezanje na AT regije DNA (Karg i Golic, 2017). Obojane jezgre promatrane su fluorescentnim optičkim mikroskopom s DAPI filterom. Faza mejoze određena je prema broju obojanih jezgara: stanice s dvije, tri ili četiri jezgre pribrojene su stanicama koje su prošle kroz MI fazu mejoze, a s tri ili četiri onima koje su prošle kroz MII fazu mejoze. Analiza broja jezgara stanica napravljena je s dvije paralele za svaki navedeni sat mejoze. Rezultati su pokazali kako je zadržavanje razine proteina Rrp6 tijekom cijele mejoze imalo negativan učinak na tijek sporulacije, odnosno *TEF1-RRP6* mutant sporije prolazi kroz faze mejoze (slika 22A). Međutim, zakašnjeni efekt prolaza kroz faze mejoze nije značajno utjecao na finalnu, odnosno prekonocnu razinu sporulacije (slika 22A, 24 h). Reprezentativni prikaz

razlike u broju jezgara divljeg tipa i mutanta *TEF1-RRP6* pokazan je na slici 22B, gdje je vidljivo kako stanice divljeg tipa u osmom satu SPII uzgoja pretežito sadrže tri do četiri jezgre, a stanice mutanta *TEF1-RRP6* sadrže jednu do dvije jezgre. Budući da prisutnost proteina Rrp6 tijekom cijele mejoze uzrokuje negativne promjene u efikasnosti odvijanja faza, može se zaključiti kako je kontrolirano smanjenje razine proteina Rrp6 u stanicama divljeg tipa u mejozi fiziološki bitno.



Slika 22. Ispitivanje efikasnosti sporulacije divljeg tipa te stanica kvasca s prekomjernom ekspresijom gena *RRP6*. **A)** Tijek mejoze divljeg tipa (SK1 wt) i mutanta *TEF1-RRP6* (SK1 *TEF1-RRP6*) prati se u 5., 6., 7., 8., 9., 10. i 24. satu prema prolasku stanica kroz mejozu I (MI) i mejozu II (MII). Kriterij određivanja faze mejoze je broj jezgara koje stanica ima u određenom satu: stanice s dvije, tri ili četiri jezgre pribrojene su MI, a s tri ili četiri MII fazi mejoze. Na x-osi prikazano je vrijeme uzgoja u SPII, a na y-osi prikazan je postotak stanica unutar populacije koje su završile određenu fazu mejoze. **B)** Reprezentativni primjer razlike u broju jezgara stanica divljeg tipa te mutanta *TEF1-RRP6* vizualiziranih fluorescentnim optičkim mikroskopom u osmom satu uzgoja u SPII.

Eksperimentima u ovom radu potvrđeno je kako razina proteina Rrp6 tijekom mejoze pada, a po prvi put je pokazano kako u toj regulaciji sudjeluju APC/C kompleks te proteasom. Relevantan primjer za regulaciju sličnim proteolitičkim mehanizmom tijekom mejoze kvasca je protein Ume6. Ume6 je transkripcijski faktor koji u vegetativnim uvjetima reprimira transkripciju ranih gena mejoze. Njegovom degradacijom, odnosno dvostrukom regulacijom APC/C kompleksom te proteinom Ime1, sprječava se represija ranih mejotičkih gena te time omogućuje ulaz u mejozu (Mallory i sur., 2007). Sličnost u regulaciji Ume6 i Rrp6 očituje se u važnosti njihove prisutnosti prije ulaska u mejozu, budući da stanice mutanata *ume6Δ* i *rrp6Δ* ne sporuliraju, te degradaciji ovih proteina APC/C kompleksom i proteasomom ulaskom u mejozu. Također, razine oba proteina regulirane su prijelazom s fermentacijskih (YPD) na respirativne uvjete (YPA) uzgoja, pri čemu se već drastično smanjuju. Mutacijom jednog od tri potencijalna D-box motiva Ume6, koje APC/C prepoznaje i označuje ubikvitinom, postignuta je stabilizacija Ume6 u respiracijskim uvjetima (Mallory i sur., 2007). Suprotno tome, mutacija jednog od šest potencijalnih D-box motiva (RHSL→AHSA) ne stabilizira Rrp6 u respiracijskim uvjetima. Moguće je da APC/C u respiracijskim uvjetima odabire jedan ili više D-box motiva Rrp6, odnosno da RHSL motiv možda nije meta APC/C kompleksa u respiracijskim uvjetima. Sukladno tome, prepoznavanje Rrp6 od strane APC/C pri respirativnim uvjetima konkluzivno bi se moglo ispitati mutacijom svih APC/C motiva. U uvjetima snižene temperature je nedavno mutacijom tri motiva za sumoilaciju EXOSC10 (homolog Rrp6 sisavaca) pokazana značajna stabilizacija EXOSC10, čime je pokazana uloga ove modifikacije u regulaciji njegove ekspresije (Knight i sur., 2016). Također, obzirom na razlike u specifičnim ulogama Ume6 i Rrp6 (transkripcijski faktor i ribonukleaza), moguće je da Ume6 i Rrp6 ne dijele u potpunosti isti mehanizam regulacije. Iako su uloge Ume6 u mejozi većinom jasne, nije poznato zašto se nakon 24 sata uzgoja u SPII razina Ume6 ponovo stabilizira (Mallory i sur., 2007). Za razliku od toga, Rrp6 se ne stabilizira niti u kasnim fazama mejoze. Nadalje, kod Ume6 je pokazana dvostruka regulacija, odnosno osim APC/C kompleksom, za potpunu degradaciju tijekom mejoze potreban je i protein Ime1, za koji se pretpostavlja da stimulira dodatnu degradaciju APC/C kompleksom (Cooper i Strich, 2011). Sukladno tome, moguća je dodatna regulacija Rrp6 nekim drugim mehanizmom, kako tijekom mejoze, tako i u respirativnim uvjetima rasta.

Mogući dodatni mejotički mehanizam regulacije ekspresije Rrp6 je regulacija nekodirajućom RNA. Rrp6 je egzoribonukleaza koja za vrijeme vegetativnih uvjeta razgrađuje MUT transkripte (Lardenois i sur., 2011). Tijekom mejoze, kada se smanjuje razina proteina

Rrp6, *antisense* transkript *MUT1312* se stabilizira (slika 7). Istovremeni pad razine proteina Rrp6, a održana razina mRNA *RRP6* i stabilizacija *MUT1312*, sugeriraju potencijalni *antisense-sense* mehanizam regulacije. Međutim, iako ovakvi *antisense-sense* primjeri nisu temeljito istraženi u kvascu, inhibicija translacije *antisense* transkriptom pokazana je na primjeru transkripta antigena za sazrijevanja humanih B stanica (BCMA). U tom je radu pokazano kako prekomjerna ekspresija *antisense* RNA smanjuje razinu proteina, ali ne i razinu odgovarajuće mRNA (Hatzoglou i sur., 2002). U prilog takve regulacije Rrp6 u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* govori i analiza formiranja dvolančane RNA (dsRNA) tijekom mejoze kvasca. Naime, formiranje dsRNA moglo biti ometati modifikacije, translaciju i transport mRNA, a navedena analiza pokazala je prisutnost dsRNA u regiji genoma kvasca s koje su transkribirani *RRP6-MUT1312*. Iz tog razloga, u ovome radu odabrana je strategija blokiranja transkripcije *MUT1312*. Međutim, blokiranje transkripcije nije bilo uspješno te zbog toga nije mogla biti ispitana mejotička uloga *MUT1312*. Nekodirajuće RNA, za razliku od gena koji kodiraju za proteine, nemaju precizno definirane promotorske regije, zbog čega je inaktivacija istih izazovna te često neuspješna, pogotovo u slučaju *antisense* RNA koje se transkribiraju kroz kodirajuću regiju gena. Za inaktivaciju transkripcije *MUT1312* možda bi bila primjenjiva metoda CRISPR interferencije (CRISPRi), u kojoj se katalitički-inaktivna Cas9 putem *guide* RNA usmjerava na određenu regiju genoma, pri čemu ometa transkripciju s jednog lanca DNA (Qi i sur., 2013).

Poznato je da stanice kojima u potpunosti nedostaje Rrp6 (*rrp6Δ*) ne mogu započeti premejotičku replikaciju DNA, a dio stanica koji uspijeva, s jako niskom efikasnosti prolazi kroz sve faze mejoze (Lardenois i sur., 2011). Međutim, zanimljivo je da se, unatoč tome što je Rrp6 esencijalan za mejozu i sporulaciju, pad u razini proteina Rrp6 tijekom mejoze pokazao fiziološki bitnim. U rezultatima ovog rada pokazano je da prekomjerna ekspresija Rrp6 te njegova prisutnost tijekom cijele mejoze usporavaju sam tijek te efikasnost prolaska kroz mejotičke faze. Iz toga proizlazi da je prisutnost Rrp6 iznimno bitna prilikom ulaza u mejozu, ali je isto tako važna i njegova postepena degradacija nakon ulaza u mejozu. Budući da je utvrđeno da je nedostatak Rrp6 uzrok akumulacije MUT transkripata, moguće je da stalna ekspresija Rrp6 na ulazu u mejozu sprječava njihovu akumulaciju, a time i narušava ispravnu regulaciju mejoze, što se manifestira kroz narušen tijek i kinetiku prolaska kroz mejotičke faze. Međutim, moguće je da degradacija Rrp6 pri ulasku u mejozu ima i još neotkrivene, MUT-neovisne uloge. Prema Frenk i sur. 2014, prekomjena ekspresija proteina Rrp6 tijekom mejoze ne utječe na akumulaciju dva ispitana MUT transkripta. Međutim, nije nužno da prekomjerna

ekspresija Rrp6 daje funkcionalan Rrp6, odnosno moguće je da Rrp6 jedino u kompleksu s egzosomom sudjeluje u degradaciji MUT transkripata. Sukladno tome, potrebna su daljnja istraživanja kojima će se dobiti detaljniji uvid u ulogu Rrp6, ali i ostatka RNA egzosoma te njihovih RNA supstrata, u mejozi i sporulaciji. Sumarno, na temelju opisane važnosti prisutnosti proteina Rrp6 prije mejoze te degradaciji Rrp6 ulazom u mejozu, može se zaključiti kako ekspresiju Rrp6 karakterizira ekstenzivna regulacija tijekom mejoze kvasca. Također, Rrp6 sisavaca intenzivno se istražuje posljednjih godina te se, u skladu s rezultatima ovog rada, naglašava važnost njegove mejotičke uloge. Pokazano je da aktivnost te regulacija Rrp6, odnosno EXOSC10 kod sisavaca, nužna za pravilno odvijanje spermatogeneze, oogeneze i rane embriogeneze (Petit i sur., 2022; Wu i Dean, 2020; Jamin i sur., 2017).

5. ZAKLJUČCI

1. Razina proteina Rrp6 smanjuje se tijekom mejoze i sporulacije stanica kvasca *S. cerevisiae*.
2. Proteinska sekvenca Rrp6 sadrži šest potencijalnih D-box motiva APC/C kompleksa. Četiri motiva (RDYL, RENL, RHSL, RNKL) nalaze se u egzoribonukleaznoj katalitičkoj domeni, a dva motiva u HRDC domeni (REVL, RDAL), pri čemu je RHSL motiv evolucijski najočuvaniji.
3. Pad razine proteina Rrp6 tijekom mejoze zahtijeva prepoznavanje RHSL motiva APC/C kompleksom, što upućuje na proteolitički mehanizam regulacije razine proteina Rrp6 tijekom mejoze i sporulacije.
4. Prepoznavanje RHSL motiva APC/C kompleksom nije ključno za pad razine proteina Rrp6 tijekom prijelaza s fermentacijskih na respirativne uvjete uzgoja.
5. Inhibicija proteasoma stabilizira razinu proteina Rrp6 tijekom mejoze, što potvrđuje proteolitičku regulaciju APC/C kompleksom i proteasomom.
6. Prekomjerna ekspresija Rrp6 održava razinu Rrp6 stalnom i visokom u svim satima mejoze. Kontrolirano smanjenje razine Rrp6 tijekom mejoze fiziološki je važno te esencijalno za pravilno odvijanje mejotičkih faza budući da potpuna stabilizacija Rrp6 ima negativan učinak na tijek mejoze i sporulacije.

6. LITERATURA

- Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, Mitchell P, Petfalski E, Tollervey D (1999a) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J* **18**, 5399–5410. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5399>
- 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. <https://doi.org/10.1101/gad.13.16.2148>
- Andrade JM, Pobre V, Silva IJ, Domingues S, Arraiano CM (2009) The role of 3'-5' exoribonucleases in RNA degradation. *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**, 187–229. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)00805-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)00805-2)
- Astell CR, Ahlstrom-Jonasson L, Smith M, Tatchell K, Nasmyth KA, Hall BD (1981) The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **27**, 15–23. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90356-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90356-1)
- Bachiller S, Alonso-Bellido IM, Real LM, Pérez-Villegas EM, Venero JL, Deierborg T, i sur. (2020) The ubiquitin proteasome system in neuromuscular disorders: Moving beyond movement. *Int J Mol Sci* **21**, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21176429>
- Balzi E, Goffeau A (1991) Multiple or pleiotropic drug resistance in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1073**, 241–252. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90128-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90128-4)
- Bansal S, Tiwari S (2019) Mechanisms for the temporal regulation of substrate ubiquitination by the anaphase-promoting complex/cyclosome. *Cell Div* **14**, 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13008-019-0057-5>
- Barford D (2011) Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **366**, 3605–3624. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0069>
- Beck F, Unverdorben P, Bohn S, Schweitzer A, Pfeifer G, Sakata E, i sur. (2012) Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 14870–14875. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1213333109>
- Bhat SA, Ahmad SM, Mumtaz PT, Malik AA, Dar MA, Urwat U, i sur. (2016) Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Non-coding RNA Res* **1**, 43–

50. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2016.11.002>

Bhavsar-Jog YP, Bi E (2017) Mechanics and regulation of cytokinesis in budding yeast. *Semin Cell Dev Biol* **66**, 107–118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016%2Fj.semcdb.2016.12.010>

Blumer KJ, Reneke JE, Thorner J (1988) The *STE2* gene product is the ligand-binding component of the α -factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **263**, 10836–10842. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)38046-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)38046-3)

Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**, 164–175. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)54076-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)54076-9)

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>

Briza P, Ellinger A, Winkler G, Breitenbach M (1988) Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *J Biol Chem* **263**, 11569–11574. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)37997-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)37997-3)

Bucking-Throm E, Duntze W, Hartwell LH, Manneys TR (1973) Reversible arrest of haploid yeast cells in the initiation of DNA synthesis by a diffusible sex factor. *Cell Res* **76**, 99–110. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827\(73\)90424-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827(73)90424-2)

Burgess SM, Powers T, Mell JC (2017) Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model genetic organism. *eLS* 1–12. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000821.pub2>

Burton JL, Solomon MJ (2001) D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev* **15**, 2381–2395. <https://doi.org/10.1101/gad.917901>

Çelik E, Çalik P (2012) Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv* **30**, 1108–1118. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>

- Coluccio A, Bogengruber E, Conrad MN, Dresser ME, Briza P, Neiman AM (2004) Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **3**, 1464–1475. <https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1464-1475.2004>
- Cooper KF, Strich R (2011) Meiotic control of the APC/C: similarities & differences from mitosis. *Cell Div* **6**, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-6-16>
- Čalyševa J, Vihinen M (2017) PON-SC – program for identifying steric clashes caused by amino acid substitutions. *BMC Bioinformatics* **18**, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1947-7>
- Da Fonseca PCA, Kong EH, Zhang Z, Schreiber A, Williams MA, Morris EP, i sur. (2011) Structures of APC/C^{Cdh1} with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* **470**, 274–280. <https://doi.org/10.1038/nature09625>
- Di Donato N, Neuhann T, Kahlert AK, Klink B, Hackmann K, Neuhann I, i sur. (2016) Mutations in EXOSC2 are associated with a novel syndrome characterised by retinitis pigmentosa, progressive hearing loss, premature ageing, short stature, mild intellectual disability and distinctive gestalt. *J Med Genet* **53**, 419–425. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103511>
- Dirick L, Goetsch L, Ammerer G, Byers B (1998) Regulation of meiotic S phase by Ime2 and a Clb5,6-associated kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **281**, 1854–1857. <https://doi.org/10.1126/science.281.5384.1854>
- Drinneberg IA, Fink GR, Bartel DP (2011) Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. *Science* **333**, 1592. <https://doi.org/10.1126/science.1209575>
- Drinneberg IA, Weinberg DE, Xie KT, Mower JP, Wolfe KH, Fink GR, i sur. (2009) RNAi in budding yeast. *Science* **326**, 544–550. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1176945>
- Eckard SC, Rice GI, Fabre A, Badens C, Gray EE, Hartley JL, i sur. (2014) The SKIV2L RNA exosome limits activation of the RIG-I-like receptors. *Nat Immunol* **15**, 839–845. <https://doi.org/10.1038/ni.2948>
- EMBL-EBI (2011) Clustal Omega (Verzija 1.2.4). <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
Pristupljeno 26. srpnja 2021.
- Engbrecht J, Roeder GS (1990) *MER1*, a yeast gene required for chromosome pairing and

- genetic recombination, is induced in meiosis. *Mol Cell Biol* **10**, 2379–2389. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.5.2379-2389.1990>
- Erdemir T, Bilican B, Cagatay T, Goding CR, Yavuzer U (2002) *Saccharomyces cerevisiae* CID is implicated in both non-homologous DNA end joining and homologous recombination. *Mol Microbiol* **46**, 947–957. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03224.x>
- Faghihi MA, Wahlestedt C (2009) Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 637–643
- Flynn RA, Almada AE, Zamudio JR, Sharp PA (2011) Antisense RNA polymerase II divergent transcripts are P-TEFb dependent and substrates for the RNA exosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 10460–10465. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106630108>
- Fox MJ, Mosley AL (2016) Rrp6: Integrated roles in nuclear RNA metabolism and transcription termination. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **7**, 91–104. <https://doi.org/10.1002/wrna.1317>
- Freese EB, Chu MI, Freese E (1982) Initiation of yeast sporulation by partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *J Bacteriol* **149**, 840–851. <https://doi.org/10.1128/jb.149.3.840-851.1982>
- Frenk S, Oxley D, Houseley J (2014) The nuclear exosome is active and important during budding yeast meiosis. *PLoS One* **9**, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107648>
- Gaczynska M, Osmulski PA (2005) Small-molecule inhibitors of proteasome activity. *Methods Mol Biol* **301**, 3–22. <https://doi.org/10.1385/1-59259-895-1:003>
- Gagliardi D, Dziembowski A (2018) 5' and 3' modifications controlling RNA degradation: From safeguards to executioners. *Philos Trans R Soc B* **373**, 1–5. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2018.0160>
- Gavaldá S, Gallardo M, Luna R, Aguilera A (2013) R-Loop mediated transcription-associated recombination in *trf4Δ* mutants reveals new links between RNA surveillance and genome integrity. *PLoS One* **8**, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065541>
- Gelfand B, Mead J, Bruning A, Apostolopoulos N, Tadigotla V, Nagaraj V, et al. (2011) Regulated antisense transcription controls expression of cell-type-specific genes in yeast. *Mol Cell Biol* **31**, 1701–1709. <https://doi.org/10.1128/MCB.01071-10>

- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, et al. (1996) Life with 6000 Genes. *Science* **274**, 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Goutte C, Johnson AD (1988) $\alpha 1$ protein alters the DNA binding of $\alpha 2$ repressor specificity. *Cell* **52**, 875–882. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90429-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90429-1)
- Graham AC, Kiss DL, Andrulis ED (2009) Core exosome-independent roles for Rrp6 in cell cycle progression. *Mol Biol Cell* **20**, 2242–2253. <https://doi.org/10.1091%2Fmbc.E08-08-0825>
- Graham AC, Kiss DL, Andrulis ED (2006) Differential distribution of exosome subunits at the nuclear lamina and in cytoplasmic foci. *Mol Biol Cell* **17**, 1399–1409. <https://doi.org/10.1091%2Fmbc.E05-08-0805>
- Haber JE (2012) Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 33–64. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.134577>
- Hagen DC, McCaffrey G, Sprague GF (1986) Evidence the yeast *STE3* gene encodes a receptor for the peptide pheromone α factor: Gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 1418–1422. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.5.1418>
- Haile S, Cristodero M, Clayton C, Estévez AM (2007) The subcellular localisation of trypanosome *RRP6* and its association with the exosome. *Mol Biochem Parasitol* **151**, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.10.005>
- Halbach F, Reichelt P, Rode M, Conti E (2013) The yeast Ski complex: Crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell* **154**, 814–826. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.017>
- Harari Y, Ram Y, Rappoport N, Hadany L, Kupiec M (2018) Spontaneous changes in ploidy are common in yeast. *Curr Biol* **28**, 825–835. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.062>
- Hardwick SW, Luisi BF (2013) Rarely at rest: RNA helicases and their busy contributions to RNA degradation, regulation and quality control. *RNA Biol* **10**, 56–70. <https://doi.org/10.4161/rna.22270>
- Harper JW, Burton JL, Solomon MJ (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* **16**, 2179–2206.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1101/gad.1013102>

Hartwell LH (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev* **38**, 164–198.
<https://doi.org/10.1128/membr.38.2.164-198.1974>

Hartwell LH (2004) Yeast and cancer. *Biosci Rep* **24**, 523–544.
<https://doi.org/10.1007/s10540-005-2743-6>

Hatzoglou A, Deshayes F, Madry C, Laprée G, Castanas E, Tsapis A (2002) Natural antisense RNA inhibits the expression of BCMA, a tumour necrosis factor receptor homologue. *BMC Mol Biol* **3**, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1471-2199-3-4>

Heinicke S, Livstone MS, Lu C, Oughtred R, Kang F, Angiuoli S V., et al. (2007) The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): A comparative genomics analysis tool for biologists. *PLoS One* **2**, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000766>

Herskowitz I (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**, 536–553. <https://doi.org/10.1128/micro.52.4.536-553.1988>

Hilleren P, McCarthy T, Rosbash M, Parker R, Jensen TH (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**, 538–542.
<https://doi.org/10.1038/35097110>

Hilt W, Wolf DH (1995) Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol Biol Rep* **21**, 3–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/bf00990964>

Hochstrasser M (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* **30**, 405–439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.405>

Houseley J, Kotovic K, El Hage A, Tollervey D (2007) Trf4 targets ncRNAs from telomeric and rDNA spacer regions and functions in rDNA copy number control. *EMBO J* **26**, 4996–5006. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601921>

Houseley J, Lacava J, Tollervey D (2006) RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrm1964>

Hung T, Chang HY (2010) Long noncoding RNA in genome regulation. *RNA Biol* **7**, 582–585.
<https://doi.org/10.4161/rna.7.5.13216>

Imperial College London (2019) Missense3D <http://missense3d.bc.ic.ac.uk/missense3d/>
Pristupljeno 8. siječnja 2022.

- Jamin SP, Petit FG, Christine K, Smagulova F, Illner D, Scherthan H, i sur. (2017) EXOSC10/Rrp6 is post-translationally regulated in male germ cells and controls the onset of spermatogenesis. *Sci Rep* **7**, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14643-y>
- Jansen R, Dowzer C, Michaelis C, Galova M, Nasmyth K (1996) Mother cell-specific *HO* expression in budding yeast depends on the unconventional myosin Myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* **84**, 687–697. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81047-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81047-8)
- Januszyk K, Lima CD (2014) The eukaryotic RNA exosome. *Curr Opin Struct Biol* **24**, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.01.011>
- Karg TJ, Golic KG (2017) Photoconversion of DAPI and Hoechst dyes to green and red-emitting forms after exposure to UV excitation. *Chromosoma* **127**, 235–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00412-017-0654-5>
- Kim DH, Rossi JJ (2008) RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques* **44**, 613–616. <https://doi.org/10.2144/000112792>
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 239–256. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(02\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00087-6)
- Knight JRP, Bastide A, Peretti D, Roobol A, Roobol JO, Mallucci GR, i sur. (2016) Cooling-induced SUMOylation of EXOSC10 down-regulates ribosome biogenesis. *RNA* **22**, 623–635. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00412-017-0654-5>
- Kostriken R, Strathern JN, Klar AJS, Hicks JB, Heffron F (1983) A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **35**, 167–174. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90219-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90219-2)
- Kreger-Van Rij NJ (1978) Electron microscopy of germinating ascospores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **117**, 73–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/bf00689354>
- Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J, Cheung WL, Dorsey J, Schindler K, i sur. (2006) Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev* **20**, 2580–2592. <https://doi.org/10.1101/gad.1457006>

- Kurjan J, Herskowitz I (1982) Structure of a yeast pheromone gene (*MFA*): A putative α -factor precursor contains four tandem copies of mature α -factor. *Cell* **30**, 933–943. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90298-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90298-7)
- Kushnirov VV (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**, 857–860. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000630\)16:9%3C857::aid-yea561%3E3.0.co;2-b](https://doi.org/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, et al. (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* **121**, 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.029>
- Laffleur B, Basu U, Lim J (2017) RNA exosome and non-coding RNA-coupled mechanisms in AID-mediated genomic alterations. *J Mol Biol* **429**, 3230–3241. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.12.021>
- Lange H, Holec S, Pieuchot L, Ret M Le, Canaday J, Gagliardi D (2008) Degradation of a polyadenylated rRNA maturation by-product involves one of the three RRP6-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol* **28**, 3038–3044. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MCB.02064-07>
- Lansbury PT, Lashuel HA (2006) A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature* **443**, 774–779. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature05290>
- Lardenois A, Liu Y, Walther T, Chalmel F, Evrard B, Granovskaia M, et al. (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 USA* **108**, 1058–1063. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016459108>
- Lee DH, Goldberg AL (1996) Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**, 27280–27284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27280>
- Lejeune F, Li X, Maquat LE (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol Cell* **12**, 675–687. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00349-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00349-6)
- Liu J-J, Bratkowski MA, Liu X, Niu CY, Ke A, Wang HW (2014) Visualization of distinct

- substrate-recruitment pathways in the yeast exosome by EM. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 95–102. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2736>
- Liu J, Carmell MA, Rivas F V., Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, i sur. (2004) Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437–1441. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
- Liu Z, Yuan F, Ren J, Cao J, Zhou Y, Yang Q, i sur. (2012) GPS-ARM: Computational analysis of the APC/C recognition motif by predicting D-boxes and KEN-boxes. *PLoS One* **7**, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034370>
- Lorentzen E, Walter P, Fribourg S, Evguenieva-Hackenberg E, Klug G, Conti E (2005) The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 575–581. <https://doi.org/10.1038/nsmb952>
- Makino DL, Schuch B, Stegmann E, Baumgartner 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>
- Mallory MJ, Cooper KF, Strich R (2007) Meiosis-specific destruction of the Ume6p repressor by the Cdc20-directed APC/C. *Mol Cell* **27**, 951–961. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.019>
- McAler WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **307**, 178–180. <https://doi.org/10.1038/307178a0>
- Michaelis S, Herskowitz I (1988) The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol Cell Biol* **8**, 1309–1318. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.3.1309-1318.1988>
- Midtgaard SF, Assenholt J, Jonstrup AT, Van LB, Jensen TH, 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 USA* **103**, 11898–11903. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604731103>
- Mishra K, Kanduri C (2019) Understanding long noncoding RNA and chromatin interactions: What we know so far. *Non-coding RNA* **5**, 1–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390%2Fncrna5040054>

- Mitchison JM (1958) The growth of single cells: II. *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* **15**, 214–221. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(58\)90077-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(58)90077-6)
- Morgan DO (2007) *The Cell Cycle: Principles of control*, 1. izd., New Science Press, London, str. 48.
- Mortimer RK (2000) Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res* **10**, 403–409. <https://doi.org/10.1101/gr.10.4.403>
- Nadal-Ribelles M, Solé C, Xu Z, Steinmetz LM, de Nadal E, Posas F (2015) Control of Cdc28 CDK1 by a stress-induced lncRNA. *Mol Cell* **53**, 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.006>
- Nasr F (2012) Course: Yeast Genetics and Biology-yeastwonderfulworld. <https://yeastwonderfulworld.wordpress.com/2012/02/09/hello-world/> Pristupljeno 12. lipnja 2022.
- Neil H, Malabat C, Aubenton-Carafa Y, Xu Z, Steinmetz LM, Jacquier A (2009) Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* **457**, 1038–1042. <https://doi.org/10.1038/nature07747>
- Neiman AM (2011) Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **189**, 737–765. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127126>
- Nieduszynski CA, Knox Y, Donaldson AD (2006) Genome-wide identification of replication origins in yeast by comparative genomics. *Genes Dev* **20**, 1874–1879. <https://doi.org/10.1101/gad.385306>
- Oo JA, Brandes RP, Leisegang MS (2022) Long non-coding RNAs: Novel regulators of cellular physiology and function. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **474**, 191–204. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02641-z>
- Orr-Weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ (1981) Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 6354–6358. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6354>
- Ostapenko D, Burton JL, Solomon MJ (2012) Identification of anaphase promoting complex substrates in *S. cerevisiae*. *PLoS One* **7**, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045895>

- Otterstedt K, Larsson C, Bill RM, Ståhlberg A, Boles E, Hohmann S, i sur. (2004) Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep* **5**, 532–537. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400132>
- Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E (2020) *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology* **6**, 1-31. <https://doi.org/10.3934%2Fmicrobiol.2020001>
- Pefanis E, Wang J, Rothschild G, Lim J, Kazadi D, Sun J, i sur. (2015) RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* **161**, 774–789. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.034>
- Pesin JA, Orr-Weaver TL (2008) Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 475–499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.041408.115949>
- Petit FG, Jamin SP, Kernanec P, Becker E, Halet G, Primig M (2022) EXOSC10/Rrp6 is essential for the eight-cell embryo/morula transition. *Dev Biol* **483**, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.12.010>
- Petranovic D, Tyo K, Vemuri GN, Nielsen J (2010) Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS Yeast Res* **10**, 1046–1059. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00689.x>
- 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>
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.503>
- Piekarska I, Rytka J, Rempola B (2010) Regulation of sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol* **57**, 241–250. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18388/abp.2010_2401
- Preker P, Nielsen J, Kammler S, Lykke-Andersen S, Christensen MS, Mapendano CK, Christophe K, Schierup MH, Jensen TH (2008) RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. *Science* **322**, 1851–1854. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1164096>

- Primig M (2019) dsRNA profiling of diploid yeast cells undergoing asynchronous mitosis (YPD) or meiotic prophase I (SPII), Inserm-National Institute of Health and Medical Research, IRSET. http://vm-gb.curie.fr/mprimig/dsRNA_meiosis/index.php. Pristupljeno 2. kolovoza 2022.)
- Primig M, Williams RM, Winzeler EA, Tevzadze GG, Conway AR, Hwang SY, i sur. (2000) The core meiotic transcriptome in budding yeasts. *Nat Genet* **26**, 415–423. <https://doi.org/10.1038/82539>
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, i sur. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**, 1173–1183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016%2Fj.cell.2013.02.022>
- Raijmakers R, Vree Egberts W, Van Venrooij WJ, Pruijn GJM (2002) Protein-protein interactions between human exosome components support the assembly of RNase PH-type subunits into a six-membered PNPase-like ring. *J Mol Biol* **323**, 653–663. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00947-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00947-6)
- RBVI (2004) UCSF Chimera (Verzija 1.16). <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> Pristupljeno 6. siječnja 2022.
- Rine J, Sprague GF, Herskowitz I (1981) *rme1* mutation of *Saccharomyces cerevisiae*: Map position and bypass of mating type locus control of sporulation. *Mol Cell Biol* **1**, 958–960. <https://doi.org/10.1128/mcb.1.10.958-960.1981>
- Roeder GS (1995) Sex and the single cell: Meiosis in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 10450–10456. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10450>
- Schaeffer D, Tsanova B, Barbas A, Reis FP, Dastidar EG, Sanchez-Rotunno M, i sur. (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 56–62. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1528>
- 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%2Fnar%2F18.10.3091>
- Schneider C, Tollervey D (2013) Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem Sci* **38**, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.06.013>

- Schuch B, Feigenbutz M, Makino DL, Falk S, Basquin C, Mitchell P, i sur. (2014) The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *EMBO J* **33**, 2829–2846. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/emboj.201488757>
- Schulz D, Schwalb B, Kiesel A, Baejen C, Torkler P, Gagneur J, i sur. (2013) Transcriptome surveillance by selective termination of noncoding RNA synthesis. *Cell* **155**, 1075–1087. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.024>
- Shen V, Kiledjian M (2006) A view to a kill: Structure of the RNA exosome. *Cell* **127**, 1093–1095. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.035>
- Smalle J, Vierstra RD (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 555–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141801>
- Sprague GF, Jensen R, Herskowitz I (1983) Control of yeast cell type by the mating type locus: Positive regulation of the α -specific *STE3* gene by the *MATa1* product. *Cell* **32**, 409–415. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90460-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90460-9)
- Statello L, Guo C-J, Chen L-L, Huarte M (2021) Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- 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 Res* **35**, 5556–5567. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm614>
- Strathern J, Hicks J, Herskowitz I (1981) Control of cell type in yeast by the mating type locus. The α 1- α 2 hypothesis. *J Mol Biol* **147**, 357–372. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90488-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90488-5)
- Strich R (2011) Meiotic, cryptic, and stable unannotated transcripts: Noncoding RNAs add to the epigenetic tool box controlling meiotic development. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 891–892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018013108>
- Synowsky SA, Heck AJR (2008) The yeast Ski complex is a hetero-tetramer. *Protein Sci* **17**, 119–125. <https://doi.org/10.1110/ps.073155908>
- Tan GS, Magurno J, Cooper KF, Solomon M (2011) Ama1p-activated anaphase-promoting

- complex regulates the destruction of Cdc20p during meiosis II. *Mol Biol Cell* **22**, 315–326. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-04-0360>
- The Cuckoo Workgroup (2011) GPS-ARM (Verzija 1.0). <http://arm.biocuckoo.org/>
Pristupljeno 26. srpnja 2021.
- Tisseur M, Kwapisz M, Morillon A (2011) Pervasive transcription - Lessons from yeast. *Biochimie* **93**, 1889–1896. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.07.001>
- Tsai IJ, Burt A, Koufopanou V (2010) Conservation of recombination hotspots in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 7847–7852. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908774107>
- van Dijk EL, Chen CL, Aubenton-Carafa Y, Gourvennec S, Kwapisz M, Roche V, i sur. (2011) XUTs are a class of Xrn1-sensitive antisense regulatory non-coding RNA in yeast. *Nature* **475**, 114–119. <https://doi.org/10.1038/nature10118>
- Vihinen M (2015) Types and effects of protein variations. *Hum Genet* **134**, 405–421. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1529-6>
- Wan J, Yourshaw M, Mamsa H, Rudnik-Schöneborn S, Menezes MP, Hong JE, i sur. (2012) Mutations in the RNA exosome component gene EXOSC3 cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration. *Nat Genet* **44**, 704–708. <https://doi.org/10.1038/ng.2254>
- Wang G, Huang M, Nielsen J (2017) Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. *Curr Opin Biotechnol* **48**, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.017>
- Wasmuth EV, Lima CD (2017) The Rrp6 C-terminal domain binds RNA and activates the nuclear RNA exosome. *Nucleic Acids Res* **45**, 846–860. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1152>
- Wasmuth EV, Zinder JC, Zattas D, Das M, Lima CD (2017) Structure and reconstitution of yeast Mpp6-nuclear exosome complexes reveals that Mpp6 stimulates RNA decay and recruits the Mtr4 helicase. *eLife* **6**, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.29062>
- Wasmuth EV, 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>
- Weißbach S, Langer C, Puppe B, Nedeva T, Bach E, Kull M, i sur. (2015) The molecular

- spectrum and clinical impact of *DIS3* mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol* **169**, 57–70. <https://doi.org/10.1111/bjh.13256>
- Weissman AM (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169–178. <https://doi.org/10.1038/35056563>
- Werven FJ Van, Neuert G, Hendrick N, Lardenois A, Oudenaarden A Van, Primig M, i sur. (2012) Transcription of two long non-coding RNAs mediates mating type control of gametogenesis in budding yeast. *Cell* **150**, 1170–1181. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.049>
- Wilson KL, Herskowitz I (1984) Negative regulation of *STE6* gene expression by the $\alpha 2$ product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **4**, 2420–2427. <https://doi.org/10.1128/mcb.4.11.2420-2427.1984>
- Wlotzka W, Kudla G, Granneman S, Tollervy D (2011) The nuclear RNA polymerase II surveillance system targets polymerase III transcripts. *EMBO J* **30**, 1790–1803. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.97>
- Wu D, Dean J (2020) EXOSC10 sculpts the transcriptome during the growth-to-maturation transition in mouse oocytes. *Nucleic Acids Res* **48**, 5349–5365. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa249>
- Wyers F, Rougemaille M, Badis G, Rousselle J, Dufour M, Boulay J, i sur. (2005) 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>
- Xu Z, Wei W, Gagneur J, Perocchi F, Clauder-münster S, Camblong J, i sur. (2009) Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature* **457**, 1033–1037. <https://doi.org/10.1038/nature07728>
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W (2004) Single processing center models for human dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>
- Zinder JC, Lima CD (2017) Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev* **31**, 88–100. <https://doi.org/10.1101/gad.294769.116>
- Zinder JC, Wasmuth EV, 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 LUCIJA ŠTRBAC 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.

Lucija Štrbac

Vlastoručni potpis