

Utjecaj katalitičkih aktivnosti podjedinice RNA egzosoma Dis3 na vijabilnost stanica i stabilnost stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Štrbac, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:897244>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lucija Štrbac

7527/BT

Utjecaj katalitičkih aktivnosti podjedinice RNA egzosoma Dis3 na vijabilnost stanica i stabilnost stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj katalitičkih aktivnosti podjedinice RNA egzosoma Dis3 na vijabilnost stanica i stabilnost stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Lucija Štrbac, 0058211655

Sažetak: Eukariotski RNA egzosom je esencijalan i evolucijski očuvani proteinski kompleks koji degradira i procesira RNA molekule u 3'-5' smjeru. Sastoji se od katalitički-inaktivne jezgre koja ulazi u interakciju s dvije ribonukleazne podjedinice, Dis3 i Rrp6, čije specifične uloge nisu u potpunosti razjašnjene. Podjedinica Dis3 esencijalna je za vijabilnost stanica te posjeduje endoribonukleaznu i egzoribonukleaznu aktivnost. Prethodno je pokazano kako inaktivacija egzoribonukleazne domene Dis3 rezultira sporijim rastom i osjetljivosti na povišenu temperaturu. Rezultati ovog rada pokazuju kako je sporiji rast ovog mutanta pri povišenoj temperaturi posljedica oslabljene stanične stijenke, zbog čega u hipoosmolarnom okruženju dolazi do pucanja stanica. U skladu s navedenim, letalnost i aberantnu morfologiju stanica ovog mutanta u potpunosti anulira osmotska stabilizacija hranjive podloge. Osim toga, stanice ovog mutanta osjetljivije su na agense koji oštećuju staničnu stijenku već pri fiziološkoj temperaturi. Destabilizacija stanične stijenke prilikom inaktivacije egzoribonukleazne, ali ne i endoribonukleazne domene Dis3 vjerojatno proizlazi iz poremećaja u regulaciji metabolizma RNA.

Ključne riječi: Dis3, kvasac *S. cerevisiae*, RNA egzosom, stanična stijenka

Rad sadrži: 34 stranice, 11 slika, 1 tablicu, 70 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

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

Datum obrane: 1.9.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for biochemistry
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Influence of catalytic activities of RNA exosome subunit Dis3 on cell viability and cell wall stability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Lucija Štrbac, 0058211655

Abstract: The eukaryotic RNA exosome is an essential and conserved protein complex that degrades or processes RNA substrates in the 3'-5' direction. It comprises a non-catalytic core that is associated with two ribonucleases, Dis3 and Rrp6, whose specific functions are not fully understood. Dis3 is essential for viability and has both endoribonuclease and exoribonuclease activity. It was previously shown that disruption of Dis3 exoribonuclease activity by a point mutation results in slow growth and temperature sensitivity. Our results show that the growth defect that these mutant cells display at high temperature is due to a weakened cell wall, which leads to bursting of cells under hypoosmolar conditions. In agreement with this, lethality and aberrant morphology of this mutant can be completely rescued by osmotically stabilizing the growth medium. Furthermore, these mutant cells show increased sensitivity to compounds that act as cell wall stressors already at physiological temperature. Cell wall destabilization upon disruption of Dis3 exoribonuclease, but not endoribonuclease activity, is most probably due to dysregulation of RNA metabolism.

Keywords: cell wall, Dis3, RNA exosome, yeast *S. cerevisiae*

Thesis contains: 34 pages, 11 figures, 1 table, 70 references

Original in: Croatian

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

Mentor: assistant prof. Igor Stuparević, PhD

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

Defence date: 1.9.2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1.1. Određivanje vijabilnosti stanica kvasca <i>S. cerevisiae</i>	3
2.2. STANIČNA STIJENKA KVASCA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2.1. Struktura stanične stijenke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.2.2. Negativni učinak specifičnih agenasa na stabilnost stanične stijenke kvasca <i>S. cerevisiae</i>	5
2.3. RNA EGZOSOM.....	9
2.3.1. Dis3 katalitička podjedinica RNA egzosoma kvasca <i>S. cerevisiae</i>	11
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije i enzimi.....	14
3.1.2. Otopine	14
3.1.3. Sojevi kvasca	15
3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca	15
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Test rasta	16
3.2.2. Mjerenje aktivnosti enzima alkalne fosfataze.....	16
3.2.3. Mikroskopiranje fluorescencijskim mikroskopom	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1 Utjecaj specifičnih agenasa na vijabilnost, morfologiju i integritet katalitičkih mutanata proteina Dis3 kvasca <i>S. cerevisiae</i>	19
4.2 Utjecaj osmotske stabilizacije na katalitičke mutante Dis3 podjedinice pri povišenoj temperaturi	21
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. POPIS LITERATURE	28

1. UVOD

RNA egzosom ima esencijalnu ulogu u razgradnji, kontroli kvalitete i sazrijevanju RNA molekula u eukariotskim stanicama (Mitchell i sur., 1997). Ovaj 3'-5' egzoribonukleazni proteinski kompleks sastoji se od katalitički-inaktivne jezgre (Exo9) i dvije katalitičke podjedinice, Dis3 i Rrp6. Dis3 je esencijalna podjedinica koja posjeduje endo- i 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost kojom procesira i degradira mRNA, rRNA, snRNA, snoRNA i tRNA (Mitchell i sur., 1997). Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj pojedinih katalitičkih aktivnosti Dis3 na vijabilnost stanica te morfologiju i integritet stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* izloženih stresnim uvjetima. Stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* čvrst je omotač kompleksne strukture, prilagodljiv na fiziološke i morfološke promjene, rast u različitim uvjetima i utjecaj okolišnih stresora na površinu stanice (Aguilar-Uscanga i sur., 2003). Ispitivanja su se provodila u uvjetima nepovoljnim za stabilnost stanične stijenke, odnosno pri povišenoj temperaturi ili uz prisutnost agenasa koji narušavaju njen integritet. Motivacija za provedene eksperimente bila su prethodna istraživanja kojima je pokazana osjetljivost mutanta za katalitičku podjedinicu RNA egzosoma Rrp6 na agense SDS, kafein, Congo red i Calcofluor white (neobjavljeni rezultati Laboratorija za biokemiju). Isto tako, primijećeno je kako su stanice s inaktiviranom egzoribonukleaznom aktivnosti Dis3 temperaturno-osjetljive, odnosno da je takva mutacija letalna pri 37°C (Milbury i sur., 2019). Uz ispitivanje osjetljivosti katalitičkih mutanata Dis3 na specifične agense i povišenu temperaturu, ispitano je može li se kod mutanata za katalitičku aktivnost Dis3, dodatkom osmotskog stabilizatora sorbitola, suprimirati letalan fenotip koji nastaje kao posljedica navedenih nepovoljnih uvjeta.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KVASAC *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanični eukariot ovalnog oblika koji je svrstan u carstvo gljiva. Uobičajeno je poznat pod nazivima pekarski kvasac ili pivski kvasac, jer fermentira šećere u ugljikov dioksid i etanol, koji su nužni za dizanje tijesta, odnosno za vrenje piva i vina (Mortimer, 2000). Genom *S. cerevisiae* je 1996. bio prvi u potpunosti sekvenciran eukariotski genom (Goffeau i sur., 1996). Sekvenciranje je pružilo brojna saznanja o organizaciji genoma i njegovoj evoluciji. *S. cerevisiae* karakterizira jednostavan životni ciklus te kratko generacijsko vrijeme, koje u bogatoj hranjivoj podlozi pri 30°C iznosi oko 90 minuta. Stanice kvasca mogu biti u haploidnom ili diploidnom obliku. Haploidna stanica može biti **a** ili **α** tipa parenja te ima 16 kromosoma, dok je diploidna **a/α** tipa parenja te ima 32 kromosoma. Diploidne stanice nastaju parenjem haploidnih stanica. U nepovoljnim uvjetima, iz diploidnih stanica kvasca mogu mejozom nastati četiri spore, koje u povoljnim uvjetima germiniraju u dvije **a** stanice i dvije **α** stanice (Duina i sur., 2014). Haploidne i diploidne stanice dijele se pupanjem. Pup, koji predstavlja buduću stanicu kćer, započinje svoju formaciju koju prati inicijacija replikacije DNA i nastavak staničnog ciklusa. Stadij staničnog ciklusa se zbog toga može prepoznati prema veličini pupa, što čini *S. cerevisiae* pogodnim organizmom za identifikaciju mutanata koji su blokirani u određenom koraku staničnog ciklusa. Ovo je bilo od ključne važnosti prilikom identifikacije proteina koji reguliraju stanični ciklus i kataliziraju replikaciju DNA (Hartwell i sur., 1974). Genom kvasca kodira za više od oko 5800 proteina. Velik broj gena kvasca ima homologe u drugim eukariotskim organizmima, pri čemu su posebno zastupljeni geni koji kodiraju za proteine bitne za diobu stanica te funkciju pojedinih eukariotskih organela (Lodish i sur., 2016.). Kvasac se koristi kao modelni organizam pri molekularnim i staničnim istraživanjima zbog navedenih prednosti te lakog, brzog i jeftinog uzgoja. Dodatno, laka manipulacija genoma kvasca te dostupnost različitih vektorskih sustava za ekspresiju željenih gena u stanicama kvasca omogućila je praćenje promjena u fenotipu stanice te korištenje kvasca u modernim biotehnološkim procesima, kao što je proizvodnja humanih rekombinantnih proteina (Duina i sur., 2014; Lodish i sur., 2016).

2.1.1. Određivanje vijabilnosti stanica kvasca *S. cerevisiae*

Vijabilnost stanica je definirana kao postotak živih stanica u cijeloj populaciji (Duina i sur., 2014). Utvrđivanje vijabilnosti je najčešće korištena metoda za određivanje utjecaja različitih kemijskih, fizičkih ili okolišnih stresora u toksikološkim i mikrobiološkim istraživanjima. Za ispitivanje vijabilnosti koriste se brojne metode, čije su prednosti jednostavno i ekonomično izvođenje, a nedostatak im je vrijeme potrebno za dobivanje rezultata, koje često iznosi do nekoliko dana. Najčešće metode su: brojanje jedinica koje tvore koloniju (engl. *colony forming units*, CFU), test rasta, mjerenje zone inhibicije ili zamućenosti tekuće hranjive podloge te kolorimetrijske metode i metode s fluorescentnim bojanjem (Duina i sur., 2014).

2.2. STANIČNA STIJENKA KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka je čvrsti omotač koji obavija stanicu i nalazi se s vanjske strane stanične membrane. Ima kompleksnu strukturu koja omogućuje prilagodljivost na fiziološke i morfološke promjene koje nastaju kao posljedica razvoja stanice, rasta u različitim uvjetima ili utjecaja okolišnih stresora na površinu stanice (Aguilar-Uscanga i sur., 2003). Uloga stijenke je višestruka: osigurava osmotsku stabilnost, štiti od fizičkog stresa, održava oblik stanice i pruža zaštitu od utjecaja potencijalno destruktivnih stranih proteina (Klis i sur., 2006). Osmotski tlak u citoplazmi *S. cerevisiae* je, kao i u drugim gljivama, uobičajeno viši nego izvan stanice. Budući da nagli ulaz vode u stanicu narušava uvjete reakcija i izaziva pojačano bubrenje koje dovodi do pucanja stanične membrane, gljive grade čvrstu i elastičnu stijenkiju koja neutralizira pritisak u citoplazmi (Hohmann, 2002). Osim održavanja osmotske homeostaze, stanična stijenka služi i kao zaštitni omotač. Visoka elastičnost i mehanička snaga omogućuju stijenci prenošenje i raspodjelu fizičkog stresa, što rezultira efikasnom zaštitom od mogućih oštećenja (Klis i sur., 2006). Održavanje oblika stanice je preduvjet za odvijanje morfogeneze. Ako su dvije haploidne stanice kvasca različitih tipova parenja na bliskoj udaljenosti, dolazi do promjene oblika u „shmoo“ oblik, odnosno oblik namijenjen parenju, koji nastaje kao odgovor na signalne feromone primljene od bliske stanice suprotnog tipa parenja. Diploidi a/a tipa parenja ne mogu formirati „shmoo“ oblik, ali zato u uvjetima nedostatka nutrijenata mogu započeti pseudohifalni oblik rasta u kojima se stanice elongiraju i imaju odvojene citoplazme, ali su povezane staničnom stijenkijom (Dien i sur., 2008). Glikoproteini, a posebice njihovi N-vezani ugljikohidratni lanci, ograničavaju propusnost stanične stijenke za makromolekule te time štite gradivne polisaharide stijenke od utjecaja stranih proteina poput

glukanaza (Zlotnik i sur., 1984). Također, fosfodiesterški mostovi između fosforiliranih ugljikohidratnih lanaca daju stijenci negativan naboj pri fiziološkom pH. U skladu s time, stijenska je hidrofилne prirode i ima ulogu u zadržavanju vode i zaštiti od isušivanja (Jigami i Odani, 1999).

2.2.1. Struktura stanične stijenske *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenska kvasca *S. cerevisiae* čini 10-25% ukupne mase stanice, a sastoji se od tri glavne komponente: glukana, hitina i manoproteina (Klis i sur., 2006). Unutarnji sloj stanične stijenske tvore β -glukani (β -1,3-glukan i β -1,6-glukan) umreženi s hitinom, a vanjski sloj manoproteini. Glukan je polisaharid D-glukoznih monomera povezanih glikozidnim vezama. Najzastupljeniji je β -1,3-glukan s udjelom 30-45% mase stijenske koji tvori vlaknasti sloj, čime daje oblik i čvrstoću stijenci. Za elastičnost stijenske su odgovorne molekule β -1,3-glukana zbog svojeg fleksibilnog i spiralnog oblika. Njihovi nereducirajući krajevi su mjesto vezanja drugih polisaharida poput razgranatih lanaca β -1,6-glukana. β -1,6-glukan je polimer male molekulske mase te je zastupljen s 5-10% ukupne mase stijenske. Kovalentnim vezanjem β -1,6-glukana na β -1,3-glukan, hitin i manoproteine, povezuju se vanjske i unutarnje komponente, čime stijenska dobiva stabilnost. Hitin je linearni polimer građen od N-acetilglukozamina povezanih β -1,4-glikozidnom vezom. Lanci hitina se reducirajućim krajem vežu na β -1,3-glukan. Tijekom pupanja koncentriran je na vratu pupa i gradi primarni septum između stanice majke i stanice kćeri (Shaw i sur., 1991). Osim što se hitin veže na β -1,3-glukan, veže se i na β -1,6-glukan kao odgovor na utjecaj stresora stanične stijenske. Nisko je prisutan s udjelom 1,5-6%, no esencijalan je za netopljivost vlakana stijenske (Lipke i Ovalle, 1998).

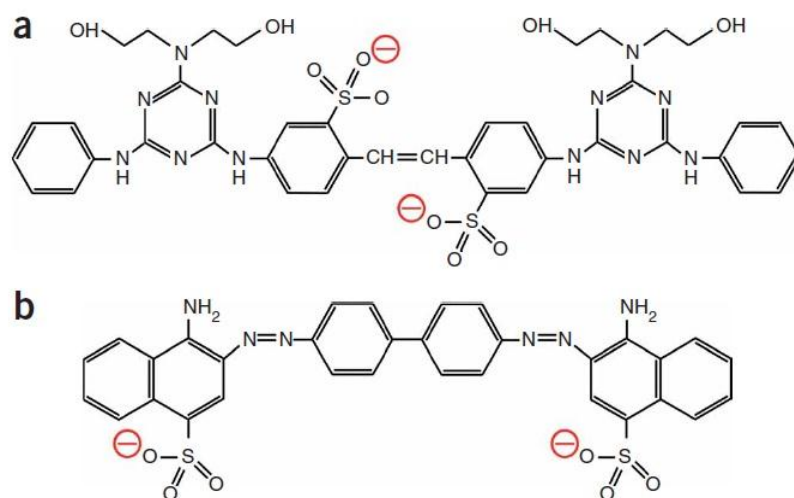
Kompozicija stijenske je koordinirana staničnim ciklusom, kojim je regulirana ekspresija većine gena koji kodiraju za proteine stijenske (Klis i sur., 2006). Vanjski sloj se sastoji od najmanje 20 različitih glikoproteina, udjela 30-50% mase stijenske. Glikoproteini stijenske omogućuju razne funkcije poput flokulacije, prepoznavanja stanice drugog tipa parenja, formiranja biofilma i pseudohifalnog rasta (Klis i sur., 2006). Modificiraju se dodatkom visokomananskih lanaca procesima N- i O-glikozilacije, a više od polovice proteina stijenske većih molekulskih masa dodatkom glikozil-fosfatidilinozitolnog (GPI) sidra. Navedene posttranslacijske modifikacije glikoproteina nužne su za umrežavanje proteina u matriks stanične stijenske (Free, 2013). Mehanička zaštita koju stijenska pruža stanici ne proizlazi iz

jedne komponente, već kao posljedica međusobnog povezivanja više komponenti stijenke u makromolekulske komplekse (Lipke i Ovalle, 1998).

2.2.2. Negativni učinak specifičnih agenasa na stabilnost stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*

Obzirom na kompleksnost građe stanične stijenke, očekivano je da velik broj gena kvasca kodira za proteinske produkte koji direktno ili indirektno sudjeluju u sintezi, remodeliranju ili razgradnji stijenke. Kako bi se identificirali i okarakterizirali geni čija je funkcija povezana s biogeneom stanične stijenke, provedeni su eksperimenti koji se zasnivaju na tretmanu stanica mutanata s agensima koji negativno utječu na stabilnost stanične stijenke. Na primjer, mutanti *S. cerevisiae* koji imaju defekte u genima koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u sintezi β -1,3-glukana ili β -1,6-glukana, manozilaciji manoproteina ili biosintezi GPI sidra pokazuju pojačanu osjetljivost na bojila Calcofluor white i Congo red (Imai i sur., 2005; Ram i sur., 1994). Osim navedenih, agensi koji se tipično koriste u takvim eksperimentima uključuju i detergent SDS, purinski analog kafein, killer-toksine, enzim β -1,3-glukanazu te inhibitore sinteze β -1,3-glukana kaspofungin i papulakandin B (De Groot i sur., 2001; Lussier i sur., 1997; Ram i sur., 1994).

Calcofluor white (CFW) i Congo red (CR) su bojila korištena u tekstilnoj industriji i u pripremi mikroskopskih preparata, budući da bojaju hitin stanične stijenke gljiva, algi i viših biljaka (Linder, 2018; Roncero i Duran, 1985). Oba spoja sadrže dvije sulfo-skupine (Slika 1).



Slika 1. Kemijska struktura spojeva Calcofluor white (a) i Congo red (b) (Ram i Klis, 2006)

CFW i CR imaju antifungalnu aktivnost kada su u topljivom obliku, odnosno u slabo kiselim, neutralnim ili lužnatim uvjetima, pri kojima su njihove sulfo-skupine negativno nabijene (Roncero i sur., 1988). CFW i CR ne mogu difundirati kroz staničnu membranu i ući u stanicu, a pretpostavka je da im to onemogućuju njihove negativno nabijene grupe (Kopecká i Gabriel, 1992). Imaju visoki afinitet prema polisaharidima stijenke, s kojima ostvaruju međumolekulske interakcije poput vodikovih veza i dipolnih interakcija, osobito prema hitinu kod gljiva i celulozi kod biljaka (Ram i sur., 1994). Smatra se da se stabilnost stanične stijenke smanjuje interferiranjem CFW i CR u mrežu β -glukana i hitina, čime se onemogućuje njihovo međusobno povezivanje i stvaranje mikrovlaknaste strukture (Ram i Klis, 2006). U usporedbi sa stanicama divljeg tipa, kod većine mutanata stanične stijenke primijećena je povećana razina hitina u stijenci, koji se pojačano akumulira kao posljedica aktivacije mehanizma stanice za očuvanje integriteta stijenke (engl. *cell wall integrity pathway*, CWI put) (Levin, 2011). Budući da se agensi poput CFW i CR vežu na hitin, mutanti stanične stijenke bit će osjetljiviji na navedene agense (Ram i Klis, 2006). Međutim, primijećeno je kako formacija primarnog septuma, koji sadrži oko 50% hitina, nije ugrožena tretmanom s CR. Prema tome, smatra se kako su efekti CR na separacijski proces i promjene u strukturi stanične stijenke većinom posljedica interakcije bojila s lancima glukana, a ne hitina. S druge strane, za CFW je pokazana veća specifičnost vezanja za hitin (Pringle, 1991). Važnost hitina u utjecaju CFW dokazuje i primjer stanica kvasca *Schizosaccharomyces pombe*, koje ne sadrže hitin u staničnoj stijenci te ne pokazuju osjetljivost na CFW (Roncero i Duran, 1985). Remodeliranje stijenke prilikom izlaganja agensima CFW i CR vidljivo je i u promjenama razine drugih komponenata poput β -glukana i manana (Kuranda i sur., 2006), a utjecaj agenasa prate i morfološke promjene stanice. Na primjeru stanica *S. cerevisiae* tretiranih agensom CR primijećeno je formiranje aberantnog septuma i nemogućnost potpune separacije stanice majke i stanice kćeri, što rezultira višestaničnim agregatima (Slika 2) (Vannini i sur., 1983).

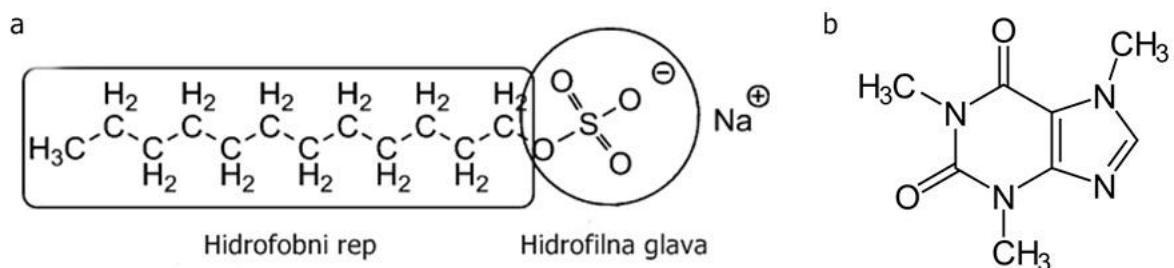


Slika 2. Elektronski mikroskopski snimak stanica kvasca tretiranih bojom Congo red. Formiraju se višestanični agregati uz abnormalni septum (strelice) (Kopecká i Gabriel, 1992).

Natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) je natrijeva sol estera sumporne kiseline i alkohola dodekanola. Sintetska je anionska površinski aktivna tvar koja se koristi u proizvodima za čišćenje i higijenu, u farmaceutskim i prehrambenim proizvodima te u industrijske i laboratorijske svrhe. SDS je amfipatska molekula s hidrofobnim repom od 12 C-atoma i hidrofilnom sulfatnom skupinom (Slika 3a). Dovodi do denaturacije proteina budući da hidrofobni rep interferira s hidrofobnim interakcijama, a sulfatna hidrofilna skupina s ionskim vezama unutar molekule proteina (Singer i Tjeerdema, 1993). Budući da SDS može stupati u nekovalentne hidrofobne interakcije s proteinima, pri čemu doprinosi negativnim nabojem i tako 'maskira' nativni naboj proteina, u laboratorijske svrhe primjenjuje se za određivanje molekulske mase proteina poliakrilamidnom gel elektroforezom (Waehneltd, 1975). Toksičnost SDS-a zabilježena je u raznim organizmima poput bakterija, kvasaca, mikroalgi, bodljikaša, rakova i ljudi. Osnova toksičnosti SDS-a uvelike je vezana za promjenu ionske ravnoteže stanice i indukciju oksidativnog stresa (Messina i sur., 2014). Toksičnost SDS-a ima fizički i biokemijski utjecaj na stanicu, pri čemu je stanična membrana ključno mjesto njenog djelovanja. Utjecaj je vidljiv od povećanja permeabilnosti membrane, pa sve do lize stanice, a intenzitet ovisi o prisutnoj koncentraciji SDS-a. SDS također narušava integritet stanične stijenke. Oštećenja stanične stijenke očituju se preko osjetljivosti na promjene u osmolarnosti, defekta u dijeljenju i lize stanice (Cao i sur., 2020). Kao odgovor na stres uzrokovan SDS-om aktivira se CWI put, no detaljni mehanizam odgovora stanice slabo je

razjašnjen (Levin, 2005). Protein Mck1 dio je CWI puta, odnosno uključen je u regulaciju ekspresije gena koji sudjeluju u odgovoru stanice na stres. Njegovom delecijom (*mck1*) stanice postaju osjetljivije na SDS. No, primijećeno je kako biosinteza triptofana i tirozina, ili njihova povećana koncentracija u mediju za uzgoj, omogućuju rast *mck1* stanica u prisutnosti SDS-a, što ukazuje na važnu ulogu ovih aminokiselina u odgovoru na SDS-inducirani stres (Schroeder i Ikui, 2019).

Kafein (1, 3, 7-trimetilksantin) je analog purinskih baza (Slika **3b**) koji utječe na raznovrsne stanične procese kod gljiva, biljaka i životinja. Negativan učinak kafeina karakterizira interferiranje s procesima popravka DNA i rekombinacijskih puteva, usporavanje razvoja stanice te moduliranje homeostaze unutarstaničnog kalcija (Calvo i sur., 2009). Kao i kod prethodno navedenih agenasa, kafeinom se kod kvasaca aktivira CWI put, čija je uloga zaštita integriteta stanične stijenke u svrhu očuvanja stabilnosti stanice koja se nalazi u nepovoljnim uvjetima. Aktivacija Pkc1-Mpk1 kinaze, koja je dio CWI puta, posljedica je inhibicije ključnog supstrata kafeina - TOR1 kinaze (Kuranda i sur., 2006). TOR1 kinaza je dio TORC1 kompleksa čija je uloga kontrola staničnog rasta i dijeljenja (Delan-Forino i sur., 2017). Također, kafein inhibira ciklički adenozin monofosfat koji djeluje kao aktivator metabolički bitnog enzima protein kinaze A (PKA) (Kuranda i sur., 2006). Posljedica utjecaja kafeina na TORC1 ili PKA su smanjen rast i dijeljenje stanica (Kuranda i sur., 2006).



Slika 3. Kemijska struktura natrijevog dodecil sulfata (a) (Czarnecki i sur., 2012) i kafeina (b) (Wikipedia, Slobodna enciklopedija, <https://bs.wikipedia.org/wiki/Kofein#/media/Datoteka:Koffein_-_Caffeine.svg> Pristupljeno 13. lipnja 2020.)

Utjecajem štetnih agenasa pokreću se regulatorni mehanizmi čija je svrha očuvanje integriteta stanične stijenke, a time i sprječavanje lize stanice (Arroyo i sur., 2009). Održavanje integriteta stijenke ovisno je o koordinaciji između biogeneze stanične stijenke i stanične

proliferacije (Lagorce i sur., 2003). Odgovor stanice na stres uključuje aktivaciju transkripcije velikog broja gena koji kodiraju za proteine uključene u biogenezu stijenke. Pri tome je najznačajniji CWI put, čijom se aktivacijom zbog stresa modelira stijenka u svrhu njenog očuvanja. Međutim, analizom ekspresije gena kod stanica izloženih prisutnosti agenasa koji ugrožavaju integritet stanične stijenke, zabilježene su razlike u ekspresiji pojedinih skupina gena. Dok je prilikom izlaganja agensu Congo red najviša ekspresija gena koji sudjeluju u remodeliranju stanične stijenke, kod izlaganju kafeinu su to geni koji sudjeluju u metabolizmu RNA i transportu (Kuranda i sur., 2006). Iako u transkripcijskim profilima postoje sličnosti, primijećene razlike ukazuju na specifičnost odgovora stanice prema faktoru koji uzrokuje oštećenje (Arroyo i sur., 2009).

2.3. RNA EGZOSOM

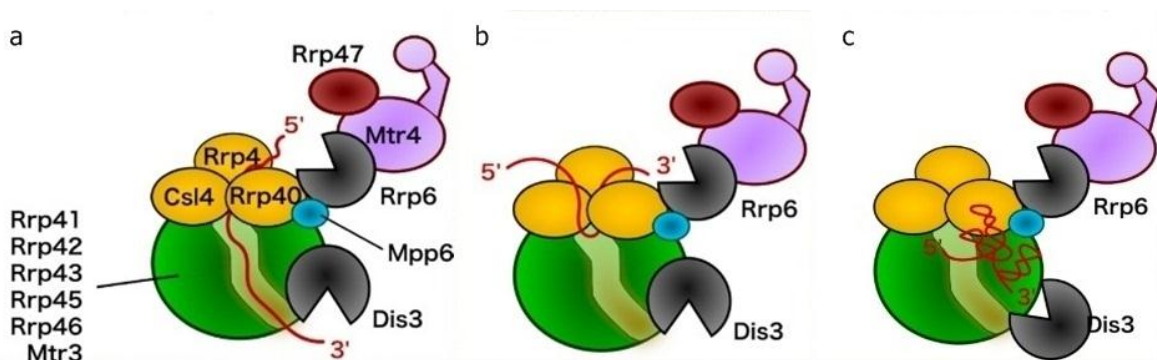
Regulacija sazrijevanja i degradacije RNA bitan je korak u ekspresiji gena (Ogami i sur., 2018). U jezgri eukariotskih stanica procesom transkripcije nastaju RNA molekule koje, u pravilu, zahtijevaju reakcije procesiranja kako bi sazrele u funkcionalne RNA. Nakon početnih koraka procesiranja, poput cijepanja i poliadenilacije, zreli 3' kraj RNA formira se 3'-5' egzonukleaznim skraćivanjem koje provodi RNA egzozom (Torchet i sur., 2002). RNA egzozom u jezgri kvasca ima glavnu ulogu u procesiranju skoro svake vrste transkripta koje sintetiziraju RNA polimeraza I, II i III (Delan-Forino i sur., 2017). Aktivnošću RNA egzozoma osigurava se adekvatno sazrijevanje 3' krajeva ribosomalne RNA (rRNA), transportne RNA (tRNA), telomerne RNA te malih nuklearnih i nukleolarnih RNA (snRNA i snoRNA). Osim skraćivanja 3' kraja, RNA egzozom može i katalizirati degradaciju transkripata koji su pogrešno procesirani. Također, egzozom u jezgri ima ulogu u degradaciji kriptičnih nestabilnih transkripata (engl. *cryptic unstable transcripts*, CUTs) (Davis i Ares, 2006; Neil i sur., 2009). Egzozom je prisutan i u citoplazmi, gdje je njegova funkcija vezana za procesiranje i degradaciju mRNA (Hilleren i sur., 2001). Ukratko, eukariotski RNA egzozom ima esencijalnu ulogu u razgradnji, kontroli kvalitete i sazrijevanju RNA.

Eukariotski RNA egzozom je 3'-5' egzonukleazni kompleks. Sastoji se od 9 proteina koji čine katalitički inaktivnu jezgru egzozoma (Exo9) i dvije katalitičke podjedinice, Dis3 (poznat i pod nazivom Rrp44) i Rrp6 (Slika 4). Egzozom je očuvani proteinski kompleks čija jezgra Exo9 ima znatnu strukturalnu sličnost s bakterijskom i arhejskom 3'-5' fosforilitičkom egzoribonukleazom, što je vidljivo u kompoziciji domena i centralnom kanalu koji je prilagođen prolasku samo jednolančanih RNA molekula (Ogami i sur., 2018). Kod eukariota, od 9 prisutnih

podjedinica jezgre, njih 6 (Rrp41, Rrp42, Rrp46, Rrp43, Mtr3 i Rrp45) pripada proteinskoj skupini RNaza PH tipa, dok ostale 3 podjedinice (Rrp4, Rrp40 i Csl4) pripadaju proteinskoj skupini RNaza S1/KH tipa (Zinder i Lima, 2017). Funkcija eukariotske Exo9 jezgre u regulaciji RNA razgradnje postala je predmet interesa budući da se sastoji od 9 podjedinica koje nemaju katalitičku aktivnost, a svaka je esencijalna za vijabilnost stanice, što indicira da imaju bitan regulatorni učinak u procesima procesiranja i degradacije RNA kataliziranih RNA egzozomom.

Ribonukleazna aktivnost eukariotskog egzozoma pripisuje se dvjema podjedinicama koje ulaze u interakciju s Exo9, Dis3 i Rrp6. Dis3 i Rrp6 su 3'-5' egzonukleaze, no jedino Dis3 posjeduje i endonukleaznu aktivnost. Dis3 s Exo9 ulazi u interakciju u citoplazmi i jezgri, a sastavljen je od N-terminalne PIN domene, dvije *cold-shock* domene, S1 domene i ribonukleazne domene (RNB) (Dziembowski i sur., 2007). Uz Dis3, katalitičku ulogu u 11-podjediničnom kompleksu Exo11^{Dis3/Rrp6} ima Rrp6. Rrp6 je 3'-5' egzoribonukleaza koja sadrži N-terminalnu domenu važnu za ostvarivanje interakcija s kofaktorima Rrp47 i TRAMP kompleksom (Butler i Mitchell, 2010), centralnu egzoribonukleaznu i HRDC domenu i C-terminalnu domenu pomoću koje ostvaruje interakcije s Exo9 (Midtgaard i sur., 2006). Rrp6 nije esencijalan, ali njegova delecija rezultira fenotipom sporog rasta, temperaturnom osjetljivošću i nakupljanjem 3'-produženih oblika 5.8 rRNA, snRNA i snoRNA (Allmang i sur. 1999). Osim katalitičke, Rrp6 ima i strukturnu ulogu. Rrp6 alosterički stimulira aktivnost Dis3 i proširuje centralni kanal jezgre Exo9. Zadnjih 100 aminokiselina C-terminusa Rrp6 čini tzv. omču koja veže RNA blizu ulaska u Exo9 kanal i stimulira degradaciju RNA (Wasmuth i Lima, 2017).

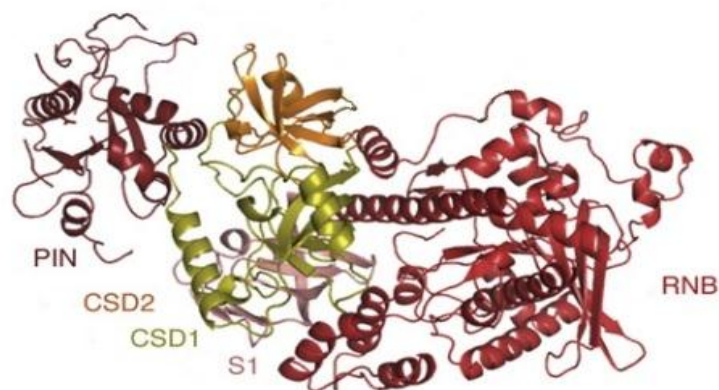
Kako bi egzozom u jezgri ostvario maksimalnu aktivnost *in vivo* i *in vitro*, potrebna je i prisutnost tri kofaktora: Mtr4, Mpp6 i Rrp47. Rrp47 ulazi u interakciju s Rrp6 kako bi doveo do njegove stabilizacije, a njihovom interakcijom također se formira mjesto za vezanje Mtr4, esencijalne RNA helikaze koja djeluje u sklopu TRAMP kompleksa (Schuch i sur., 2014). Mpp6 se veže na podjedinicu Rrp40 te aktivira helikaznu aktivnost Mtr4 (Falk i sur., 2017). Aktivnosti navedenih kofaktora egzozoma nužne su kako bi došlo do odmatanja sekundarne strukture RNA koja je formirana na 3' kraju. Rezultat su jednolančane RNA molekule koje se tada mogu uvesti u centralni kanal egzozoma u 3'-5' orijentaciji (Schneider i Tollervey, 2013). Dis3 će degradirati RNA koje se uvedu kroz cijeli centralni kanal, a Rrp6 će degradirati ili skratiti RNA koje ulaze u S1/KH 'kapu' prstena, a zatim prolaze do aktivnog mjesta Rrp6 (Slike **4a** i **4b**). Uz navedene načine, postoji i alternativni put kojim RNA direktno dolazi u kontakt s aktivnim mjestom Dis3 (Slika **4c**) (Ogami i sur., 2018).



Slika 4. Struktura RNA egzozoma i putevi navođenja molekula RNA do katalitičkih podjedinica. (a) Uvođenje RNA kroz centralni kanal jezgre egzozoma do aktivnog mjesta Dis3. (b) Prijelaz RNA preko 'kape' prstena do aktivnog mjesta Rrp6. (c) Put u kojem RNA zaobilazi centralni kanal i direktno pristupa Dis3 (Ogami i sur., 2018)

2.3.1. Dis3 katalitička podjedinica RNA egzozoma kvasca *S. cerevisiae*

Dis3 (poznat i pod nazivom Rrp44) katalitička je podjedinica RNA egzozoma molekulske mase oko 110 kDa, koja sudjeluje u reakcijama procesiranja i degradiranja strukturiranih i nestrukturiranih molekula RNA poput mRNA, rRNA, snRNA, snoRNA i tRNA (Mitchell i sur., 1997). Smještena je na dnu jezgre Exo9, blizu pore za izlaz RNA (Slika 4) (Malet i sur., 2010). Dis3 je sastavni dio egzozoma esencijalan za vijabilnost, a u stanicama kvasca prisutan je i u citoplazmi i u jezgri stanice (Allmang i sur., 1999). Homolog je RNAze R bakterije *Escherichia coli*. RNAza R pripada obitelji RNAza II, hidrolitičkih 3'-5' egzoribonukleaza. Kvaščev Dis3 i RNAza II sadrže 19% jednakih sekvenci, pri čemu je stupanj evolucijskog očuvanja najveći kod aktivnog mjesta egzoribonukleazne domene, što upućuje na sličan hidrolitički mehanizam dvaju nukleaza. Homologija Dis3 i RNAze II vidljiva je u domenama proteina, kao što su dvije *cold-shock* domene (CSD1 i CSD2), centralna katalitička domena (RNB) i C-terminalna S1 domena (Slika 5) (Frazão i sur., 2006).



Slika 5. Struktura proteina Dis3 s naznačenim domenama (Bonneau i sur., 2009).

CSD i S1 domene dijele karakteristiku OB (engl. *oligonucleotide/oligosaccharide/oligopeptide-binding*) domena koje su evolucijski očuvane u bakterijama, a prisutne su kod proteina koji vežu nukleinske kiseline (Murzin, 1993). Vežanje jednolančane RNA (engl. *single-stranded RNA*, ssRNA) posredovano je CSD1 i RNB domenama (Lorentzen i sur., 2008). Aktivno mjesto RNB domene sadrži četiri aminokiselinska aspartatna ostatka koji hidrolitički cijepaju okosnicu RNA. Mutacija u jednom od četiri aspartatna ostatka u potpunosti onemogućuje egzoribonukleaznu aktivnost domene (Dziembowski i sur., 2007). Njena uloga napad je na 3' kraj jednolančane RNA, koja mora biti minimalno 4 nukleotida duga kako bi dosegla aktivno mjesto RNB domene (Lorentzen i sur., 2008). Dis3 ima biokemijska svojstva koja su nalik svojstvima RNAze R (Vincent i Deutscher, 2006). Homologija je vidljiva u mogućnosti degradacije RNA intra- i intermolekularne sekundarne strukture (Lorentzen i sur., 2008). U susretu s dvolančanom RNA (engl. *double-stranded RNA*, dsRNA), proces degradacije se kod RNAaze II zaustavlja. Međutim, kod Dis3 je degradacija dsRNA moguća ako jedan lanac ima dovoljno produljen 3' kraj (Dziembowski i sur., 2007). Iako će imati puno veću aktivnost pri produljenjima većim od 9 nukleotida, Dis3 može degradirati dsRNA s minimalnim produljenjem od 4 nukleotida. Pretpostavlja se kako je mehanizam odmatanja dsRNA posljedica steričke okluzije kojom dolazi do translokacije 3' kraja u 'poru' koja je specifična za ssRNA te sterički nepristupačna za dsRNA (Lorentzen i sur., 2008). Jednolančana RNA zatim nastavlja put prema 3' kraju katalitičkog mjesta. Kod *S. cerevisiae* i viših eukariota, Dis3 dodatno posjeduje i N-terminalnu PIN domenu, koja ima endonukleaznu aktivnost i ostvaruje izravnu interakciju s Rrp41 i Rrp45. Dis3 se PIN domenom veže za dno egzosomalnog prstena. Aktivno mjesto PIN domene sastoji se od četiri aminokiselinska ostatka izloženih otapalu, što omogućuje RNA

neograničen pristup katalitičkom centru bez potrebe za prijenos kroz cijeli centralni kanal egzosoma (Slika 4c) (Bonneau i sur., 2009). Cijepa cirkularne i linearne ssRNA s preferencijom za lance s fosforiliranim 5' krajem (Schaeffer i sur., 2009). Iako je protein Dis3 esencijalan za vijabilnost stanica, njegova endo- i egzoribonukleazna aktivnost pojedinačno nisu. Inaktivacija egzoribonukleazne aktivnosti RNB domene (mutacija D551N) rezultira fenotipom sporog rasta, nepotpunim procesiranjem RNA te temperaturnom osjetljivosti, a disrupcija endonukleazne aktivnosti PIN domene (mutacija D171N) samo sporim rastom i nepotpunim procesiranjem molekula RNA. Međutim, mutacija koja inaktivira obje katalitičke aktivnosti je letalna (Schneider i sur., 2009). Kod mutanata za RNB domenu (*dis3-54*) prisutne su poteškoće pri pravilnoj segregaciji kromosoma i odvijanju mitoze, koje karakterizira akumulacija anafaznog i pre-anafaznog mitotskog diobenog vretena, nepravilna orijentacija vretena te promjena u lokalizaciji i strukturi mikrotubula (Smith i Kiss, 2011). Za razliku od delecije gena *DIS3*, delecija gena koji kodira za katalitičku podjedinicu Rrp6 (*rrp6*) nije letalna. No, kombinacija mutacija *rrp6* i *dis3-D551N* ima letalan ishod, što ukazuje na djelomično preklapanje funkcija dvaju katalitičkih podjedinica (Dziembowski i sur., 2007). Rrp6 se nalazi na vrhu egzosoma gdje ulaze molekule RNA, zbog čega bi mutacijom *rrp6* mogao biti ometen prolaz RNA do aktivnog mjesta Dis3 (Makino, 2015). Međusobni utjecaj katalitičkih podjedinica pokazan je i *in vitro* mjerenjem aktivnosti Rrp6 u kompleksu Exo11^{Dis3^{exo}-Rrp6}. U usporedbi s Exo11^{Dis3/Rrp6}, primijećeno je kako nedostatak egzoribonukleazne aktivnosti Dis3 rezultira djelomičnim gubitkom funkcije Rrp6. Isto tako, Rrp6 stimulira aktivnost Dis3. Na primjer, aktivnost degradacija poli-A supstrata 40 je puta veća kod Exo11^{Dis3/Rrp6} u usporedbi s Exo10^{Dis3} (Wasmuth i Lima, 2012).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

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

Agar: Liofilchem (Conyers, SAD)

Adenin, aminokiseline, *p*-nitrofenilfosfat, Calcofluor white, kafein: Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Glukoza: Gram Mol (Zagreb, Hrvatska)

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

3.1.2. Otopine

Za mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze: 0,1 M Tris-HCl pufer (pH=8,8)

0,1 M Tris, pH se podešava dodatkom HCl-a

20 mM otopina *p*-nitrofenilfosfata

7,425 g/L *p*-nitrofenilfosfata otapa se u 0,1 M Tris-HCl puferu (pH=8,8), priprema se na dan mjerenja, između mjerenja čuva se na +4°C

1 M NaOH

3.1.3. Sojevi kvasca

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

Soj	Genotip	Izvor
DLY1354 = <i>DIS3</i>	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 dis3::KanMX4 [pBS3269-DIS3, LEU2]</i>	Stuparević i sur., 2013
DLY1350 = <i>dis3-D171N (dis3 endo)</i>	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 dis3::KanMX4 [pBS3278-dis3D171N, LEU2]</i>	Stuparević i sur., 2013
DLY1358 = <i>dis3-D551N (dis3 exo)</i>	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 dis3::KanMX4 [pBS3270-dis3D551N, LEU2]</i>	Stuparević i sur., 2013

3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca

YNB -Leu (Yeast Nitrogen Base) hranjiva podloga

Za uzgoj sojeva kvasca *S. cerevisiae* korištena je YNB -Leu hranjiva podloga sastava: YNB prah 6,7 g/L, smjesa aminokiselina i dušičnih baza 2 g/L, triptofan, uracil i histidin svaki po 0,8 g/L. U tekuću YNB -Leu hranjivu podlogu, nakon sterilizacije autoklaviranjem, dodaje se sterilizirana otopina glukoze do finalne koncentracije 20 g/l. U krute hranjive podloge, prije sterilizacije, uz otopinu glukoze dodaje se i agar, koncentracije 16 g/l.

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

3.2. Metode

3.2.1. Test rasta

Test rasta je semikvantitativna metoda za ispitivanje vijabilnosti stanica. Podloge za provedbu testa rasta pripremljene su kao krute YNB –Leu hranjive podloge pri čemu su u pojedine dodani određeni agensi. Stanice kvasca uzgojene su na rotacijskog tresilici u tekućoj YNB -Leu podlozi na 30°C do logaritamske faze rasta. Kulturi u log fazi spektrofotometrijski je određena gustoća kulture (OD_{600}/mL) koja je zatim prilagođena sterilnom vodom na 1 OD_{600}/mL . Slijedila je priprema 4 decimalna razrjeđenja početne suspenzije sukcesivnim miješanjem 100 μL suspenzije stanica s 900 μL sterilne vode. 10 μL svakog decimalnog razrjeđenja nakapano je na dobro osušenu krutu YNB -Leu podlogu sa ili bez odgovarajućeg agensa. Podloge su inkubirane pri 30°C ili 37°C tijekom 3 dana i fotografirane Uvidoc HD6 kamerom.

3.2.2. Mjerenje aktivnosti enzima alkalne fosfataze

Sojevi kvasca uzgajani su tekućoj YNB -Leu hranjivoj podlozi na rotacijskog tresilici na 30°C do logaritamske faze rasta. Kulturi u log fazi spektrofotometrijski je određena gustoća kulture (OD_{600}/mL). Odgovarajući volumen suspenzije centrifugiran je 5 minuta na 3000 rpm, te su stanice resuspendirane u tekućoj YNB –Leu hranjivoj podlozi na gustoću stanica 0,3 OD_{600}/mL . Slijedi inkubacija kultura na rotacijskoj tresilici na 37°C tijekom 72 sata. Nakon tri dana, spektrofotometrijski se odredila gustoća suspenzije stanica. Uzet je i alikvot suspenzije stanica te centrifugiran 90 sekundi na 11 000 rpm. Za dvije tehničke paralele svakog uzorka, izdvojeno je po 0,5 mL supernatanta (hranjive podloge). Supernatant i supstrat odvojeno su pripremljeni u epruветama te inkubirani 5 minuta u vodenoj kupelji pri 30°C. Supstrat je pripremljen kao otopina 20 mM *p*-nitrofenilfosfata u Tris-HCl puferu (pH 8.8). Slijepa proba sadržavala je po 0,25 mL hranjive podloge bilo koja 2 soja. Reakcija započinje dodatkom 0,5 mL otopine supstrata u epruветu sa supernatantom. Nakon 45 minuta, reakcija je zaustavljena denaturacijom enzima, odnosno dodatkom 0,5 mL 1 M otopine natrijeva hidroksida, istim redoslijedom kojim se dodavao i supstrat. Kako bi dobivena količina produkta u slijepoj probi bila rezultat isključivo spontanog raspada supstrata, NaOH je u slijepu probu dodan prije supstrata pa je enzimska reakcija odmah zaustavljena. Dobiveni uzorci bili su korišteni za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije produkta (*p*-nitrofenol) koji u lužnatom mediju

daje žuto obojenje. Apsorbancija uzorka pri 420 nm proporcionalna je koncentraciji produkta, a aktivnost enzima računa se prema formuli:

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

3.2.3. Mikroskopiranje fluorescencijskim mikroskopom

Za mikroskopiranje fluorescencijskim mikroskopom koristila se boja Calcofluor white koja se kao nespecifični fluorokrom veže na hitin stanične stijenke kvasca. Predmetnica je pripremljena dodatkom vode, suspenzije stanica kvasca te dodatkom jednakog volumena boje Calcofluor white (1 mg/mL). Predmetnica je prekrivena pokrovnicom te je dodana kap imerzijskog ulja. Uzorak je vizualiziran fluorescencijskim optičkim mikroskopom Olympus BX51 uz povećanje 100x/1.4 N.A. Budući da su prikladne valne duljine za ekscitaciju boje 300-440 nm, korišten je DAPI filter.

4. REZULTATI I RASPRAVA

RNA egzosom je proteinski kompleks koji sudjeluje u sazrijevanju i degradaciji RNA molekula u eukariotskim stanicama. Egzosom kvasca *S. cerevisiae* sastoji se od 9 proteina koji čine jezgru egzosoma (Exo9) te od dvije katalitičke podjedinice, Dis3 i Rrp6. Dis3 je esencijalna podjedinica koja posjeduje endo- i 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost kojom procesira i degradira mRNA, rRNA, snRNA, snoRNA i tRNA (Mitchell i sur., 1997). U zadnjih dvadeset godina intenzivno se istražuju molekule RNA, struktura i funkcija RNA egzosoma. Poznato je kako gubitak određenih funkcija podjedinica egzosoma utječe na raznolike biološke procese stanice, poput odgovora na oštećenje DNA, regulacije razrješavanja R-omči, održavanja integriteta genoma, transporta RNA iz jezgre u citoplazmu, translacije i diferencijacije stanice (Ogami i sur., 2018). Međutim, mnoga pitanja o funkciji RNA egzosoma još nisu u potpunosti razjašnjena.

Prethodno je pokazano kako su mutanti s deletiranim genom koji kodira za katalitičku podjedinicu RNA egzosoma Rrp6 osjetljivi na kafein, Congo red, Calcofluor white i SDS, odnosno na agense koji oštećuju staničnu stijenku (neobjavljeni rezultati Laboratorija za biokemiju). Isto tako, primijećeno je kako su stanice s inaktiviranom egzoribonukleaznom aktivnosti Dis3 temperaturno-osjetljive, odnosno da je takva mutacija letalna pri 37°C (Milbury i sur., 2019). Navedeni agensi i povišena temperatura uzrokuju stres za stanicu i ugrožavaju stabilnost stanične stijenke, te su u sklopu ovog rada provedeni eksperimenti kojima se ispituje dolazi li do promjene stabilnosti stanične stijenke pri inaktivaciji katalitičkih aktivnosti proteina Dis3. Cilj ovog rada bio je ispitati vijabilnost, morfologiju i integritet stanica kvasca kojima je inaktivirana endo- ili egzoribonukleazna aktivnost katalitičke podjedinice Dis3 prilikom izlaganja navedenim agensima te pri visokoj temperaturi. Također, htjelo se ispitati može li mutantima za katalitičku aktivnost dodatak osmotskog stabilizatora 1 M sorbitola suprimirati letalan fenotip, odnosno na taj način utvrditi je li on posljedica narušavanja integriteta stanične stijenke. Naime, stanice uzgajane u mediju bez osmotskog stabilizatora nalaze se u hipoosmolarnom okruženju, koje nije optimalno te predstavlja stres staničnoj stijenci ukoliko je njena stabilnost narušena. Stabilizacija stanične stijenke vrši se dodatkom 1 M sorbitola koji smanjuje turgorski pritisak, povećanjem vanjske osmolarnosti. U takvim uvjetima stanice ne pucaju i zadržavaju svoj oblik unatoč destabilizacije stanične stijenke.

Budući da je *DIS3* esencijalan gen, delecija ovog gena nije moguća, no moguće je provesti ispitivanje s mutantima kod kojih su inaktivirane katalitičke aktivnosti proteina Dis3. U radu su korišteni prethodno konstruirani sojevi kojima je u genomu mutiran gen *DIS3*, a na

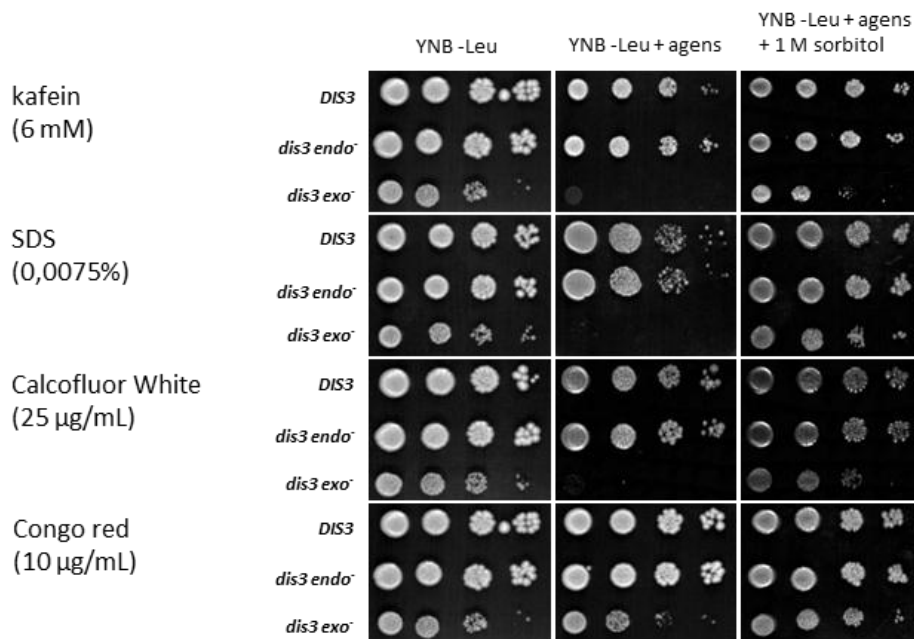
centromernom plazmidu je prisutna funkcionalna kopija gena *DIS3* (stanice *DIS3*) ili inačica gena *DIS3* u koju je uvedena točkasta mutacija koja inaktivira endoribonukleaznu (stanice *dis3 endo*, odnosno *dis3-D171M*), odnosno egzoribonukleaznu (stanice *dis3 exo*, *dis3-D551M*) aktivnost proteina Dis3 (Stuparevic i sur., 2013). Kako bi se osigurala selekcija stanica s plazmidom, na plazmidu se nalazi marker gen *LEU2* te su stanice tijekom svih eksperimenata uzgajane u podlozi koja ne sadrži aminokiselinu leucin.

4.1 Utjecaj specifičnih agenasa na vijabilnost, morfologiju i integritet katalitičkih mutanata proteina Dis3 kvasca *S. cerevisiae*

Integritet stanične stijenke određenih mutanata kvasca može se ispitati provođenjem testa rasta stanica u prisutnosti agensa koji su štetni za staničnu stijenku, odnosno svojim djelovanjem negativno utječu na njen integritet. Boje Calcofluor white i Congo red interferiraju u mrežu β -glukana i hitina stijenke, čime se onemogućuje njihovo međusobno povezivanje i stvaranje mikrovlaknaste strukture (Ram i Klis, 2006). Detergent SDS narušava integritet stanične membrane i stijenke, uzrokuje defekte dijeljenja i osjetljivost na promjene u osmolarnosti (Cao i sur., 2020), a purinski analog kafein usporava razvoj stanice i uzrokuje poteškoće pri dijeljenju stanice budući da ima utjecaj na TOR signalni put (Kuranda i sur., 2006). Ako određeni mutanti imaju oslabljenu staničnu stijenku, moguće je očekivati pojačanu osjetljivost na agense. Provođenjem ispitivanja na sojevima kojima nedostaje pojedina aktivnost proteina Dis3, proučavamo kakva je osjetljivost određenog mutanta na dodani agens te ju uspoređujemo sa stanicama divljeg tipa. U slučaju da je osjetljivost veća, pokazujemo kako inaktivacija određene katalitičke aktivnosti Dis3 utječe na stabilnost stanične stijenke kvasca.

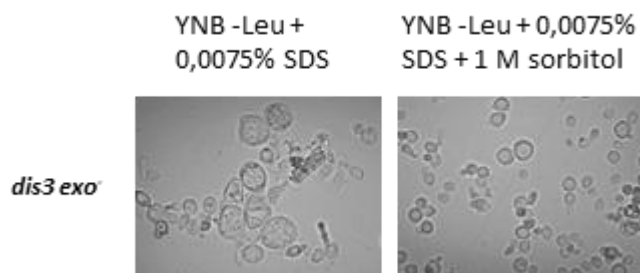
U svrhu ispitivanja utjecaja agenasa na vijabilnost stanica kvasca *S. cerevisiae*, provedena je metoda testa rasta. Sojevi *DIS3* (ekvivalentan stanicama divljeg tipa), katalitički mutant za endoribonukleaznu (*dis3 endo*) i katalitički mutant za egzoribonukleaznu aktivnost (*dis3 exo*) su uzgajani u tekućoj YNB -Leu podlozi pri 30°C do logaritamske faze rasta te je potom njihov rast ispitan na istovjetnim krutim podlogama sa ili bez dodatka agensa i 1 M sorbitola. Korišteni agensi i njihove koncentracije bili su: 6 mM kafein, 0,0075% SDS, 25 μ g/mL Calcofluor white i 10 μ g/mL Congo red (Slika 6). Nakon tri dana, na kontrolnim hranjivim podlogama bez dodatka agenasa i 1 M sorbitola nije bilo razlike u fenotipu sojeva (Slika 6, YNB -Leu). Međutim, uzgojem stanica u podlozi sa svakime od četiri ispitana agensa, vidljiva

je značajna inhibicija rasta stanica *dis3^{exo}* u usporedbi sa stanicama divljeg tipa i *dis3^{endo}* (Slika 6, YNB –Leu +agens).



Slika 6. Vijabilnost sojeva *DIS3*, *dis3^{endo}*, *dis3^{exo}*. Stanice su uzgajane pri 30°C do logaritamske faze rasta u tekućoj YNB –Leu podlozi. Zatim su decimalna razrjeđenja takvih kultura nakapana na krute podlogu sa ili bez dodatka agensa i 1 M sorbitola. Dodani agensi i njihove koncentracije su: 6 mM kafein , 0,0075% SDS, 25 µg/mL Calcofluor white i 10 µg/mL Congo red. Podloge s kolonijama fotografirane su nakon 3 dana inkubacije na 30°C.

Destabilizacija stanične stijenke mutanta *dis3^{exo}* vidljiva je prilikom mikroskopskog promatranja ovih stanica nakon rasta na podlozi sa SDS-om, koji rezultira agregiranjem stanica te izrazitim povećanjem njihova volumena (Slika 7). Nakupine neodvojenih stanica te povećan volumen, uzrokovan pojačanim ulaskom vode u stanicu, ukazuju na poteškoće pri dijeljenju i narušenu stabilnosti stanične stijenke. Budući da se mnoge funkcije Dis3 i Rrp6 međusobno preklapaju (Dziembowski i sur., 2007), osjetljivost barem jednog katalitičkog mutanta proteina Dis3 bila je u skladu s očekivanjima. U svrhu dodatne potvrde povezanosti fenotipa *dis3^{exo}* mutacije sa staničnom stijenkom, provedena je metoda testa rasta koja uz dodatak agensa sadrži i dodatak sorbitola. Sorbitol je osmotski stabilizator koji smanjuje stres stijenci uzrokovan uzgojem stanica u hipoosmolarnom okruženju. Dodatkom 1 M sorbitola u hranjivu podlogu, uz omogućavanje rasta (Slika 6, +sorbitol), volumen stanica se smanjuje te poprimaju stabilan oblik karakterističan stanicama divljeg tipa (Slika 7).



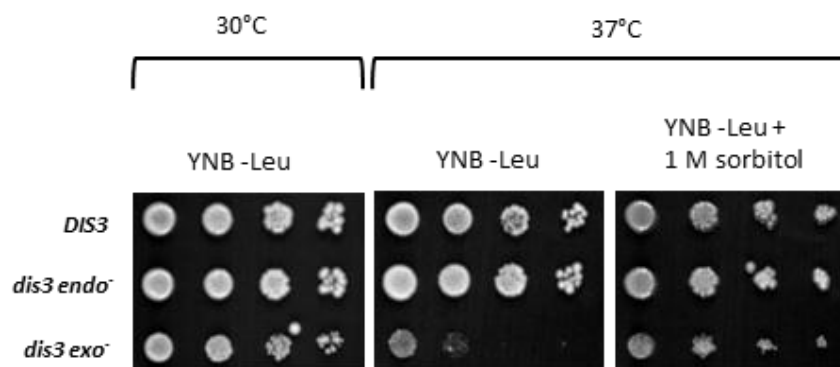
Slika 7. Morfologija stanica mutanta *dis3 exo* vizualiziranih svjetlosnim mikroskopom nakon 3 dana inkubacije na 30°C na krutim podlogama s 0,0075% SDS-om te 0,0075% SDS-om i 1 M sorbitolom. Preparati su pripremljeni od kultura poraslih testom rasta na YNB –Leu krutim podlogama (Slika 6).

Dakle, letalan fenotip koji nastaje kao posljedica narušenog integriteta stanične stijenke, suprimiran je dodatkom 1 M sorbitola u prisutnosti svih ispitanih agensa (Slika 6, YNB –Leu + agens + 1 M sorbitol). Rezultati ovog eksperimenta ukazuju na veću nestabilnost stanične stijenke stanica mutanta *dis3 exo* u odnosu na stanice divljeg tipa te stanice mutanta *dis3 endo*.

4.2 Utjecaj osmotske stabilizacije na katalitičke mutante Dis3 podjedinice pri povišenoj temperaturi

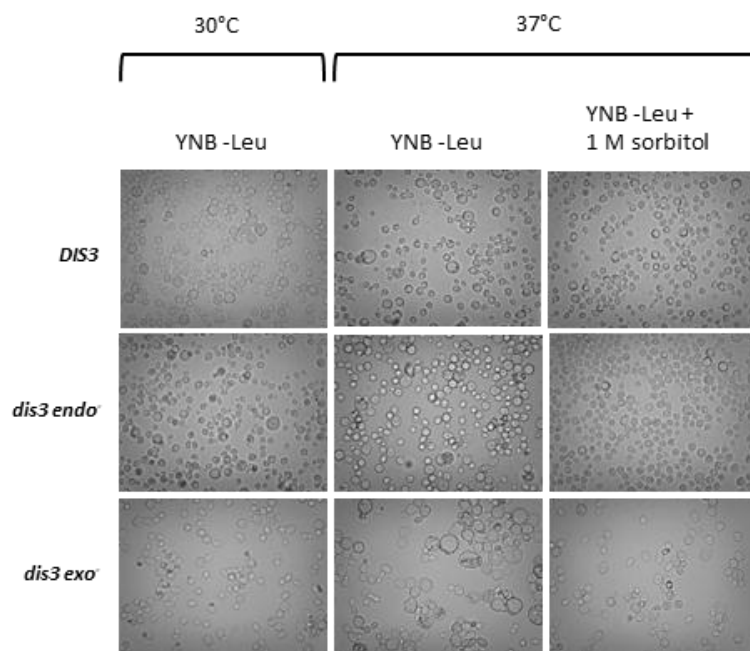
Stanice kvasca *S. cerevisiae* u laboratoriju se tipično uzgajaju pri 28°C do 30°C, dok neki radovi pokazuju da im je rast optimalan na 32,5°C (Munna i sur., 2015). Na temperaturama višim od 36 ili 37°C, aktivira se transkripcijski odgovor za temperaturni šok (engl. *heat shock response*, *HSR*). HSR karakteriziraju nagle promjene u fiziologiji stanice poput remodeliranja stanične stijenke (Yamamoto i sur., 2008). Također, aktivira se i CWI put, što dodatno ukazuje na destabilizaciju stanične stijenke povišenom temperaturom (Kamada i sur., 1995). Prethodni eksperimenti su pokazali destabilizaciju stanične stijenke mutanta *dis3 exo* pri fiziološkoj temperaturi od 30°C prilikom izlaganja agensima koji oštećuju stijenku, što je indiciralo da bi stanice ovog mutanta mogle pokazivati osjetljivost i prilikom izlaganja povišenoj temperaturi iz istog razloga.

U svrhu ispitivanja utjecaja povišene temperature na vijabilnost stanica kvasca *S. cerevisiae*, provedena je metoda testa rasta. Stanice sojeva *DIS3*, *dis3 endo* i *dis3 exo* uzgajane su na YNB –Leu podlogama pri 30°C ili 37°C sa ili bez osmotske stabilizacije podloga dodatkom 1 M sorbitola. Nakon tri dana rasta na 30°C, nije bilo razlike u rastu sojeva. No, rastom na 37°C na podlozi bez dodatka sorbitola uočljiv je slabiji rast stanica *dis3 exo* (Slika 8), što potvrđuje prethodno pokazanu temperaturnu-osjetljivost ovog mutanta (Milbury i sur., 2019). U skladu s pretpostavkom da je inhibicija rasta stanica ovog mutanta pri povišenoj temperaturi posljedica nestabilnosti stanične stijenke, dodatak osmotskog stabilizatora 1 M sorbitola u potpunosti omogućuje njegov rast pri 37°C (Slika 8).



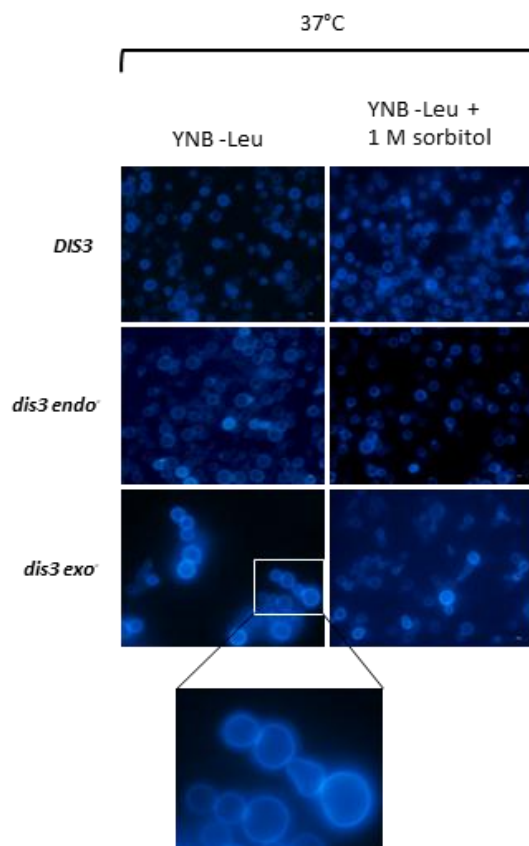
Slika 8. Vijabilnost sojeva *DIS3*, *dis3 endo*, *dis3 exo*. Stanice su uzgajane pri 30°C do logaritamske faze rasta u tekućoj YNB –Leu podlozi. Zatim su decimalna razrjeđenja takvih kultura nakapana na krute podloge sa ili bez dodatka 1 M sorbitola. Podloge s kolonijama fotografirane su nakon 3 dana inkubacije na 30°C ili 37°C.

Dok divlji tip i mutant *dis3 endo* nakon tri dana rasta na podlozi bez dodatka sorbitola na 37°C dijele morfologiju stanica uobičajenu stanicama kvasca, stanice mutanta *dis3 exo* povećanog su volumena, aberantnog oblika te tvore višestanične agregate (Slika 9). Nakupine neodvojenih stanica te povećan volumen ukazuju na poteškoće pri dijeljenju i narušen integritet stanične stijenke. Dodatkom 1 M sorbitola smanjuje se volumen stanica *dis3 exo*, koje generalno poprimaju morfologiju stanica kvasca koje rastu u optimalnim uvjetima (Slika 9). Smanjen volumen stanica i manjak pojave višestaničnih agregata ukazuju na poboljšanje integriteta stanične stijenke.



Slika 9. Morfologija stanica sojeva *DIS3*, *dis3 endo*, *dis3 exo* prikazana svjetlosnim mikroskopom nakon 3 dana inkubacije na 30°C ili 37°C sa ili bez dodatka 1 M sorbitola. Preparati su pripremljeni od kultura poraslih testom rasta na YNB –Leu krutim podlogama (Slika 8).

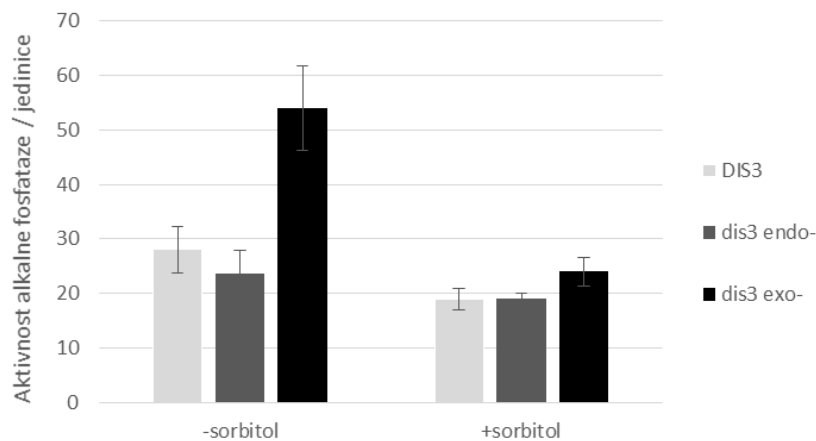
Aberantan fenotip stanica nastao kao posljedica osjetljivosti *dis3 exo* mutanta na povišenu temperaturu pokazan je i vizualizacijom fluorescentnim mikroskopom, gdje je kao bojilo za stanice korišten Calcofluor white. Calcofluor white ostvaruje međumolekulske interakcije s polisaharidima stijenke, osobito s hitinom. Hitin je tijekom pupanja koncentriran na vratu pupa i čini primarni septum između stanice majke i stanice kćeri. Budući da se hitin akumulira na mjestu odvajanja stanice majke i pupa, intenzitet bojanja je na tome mjestu veći. Izraženije bojanje vidljivo je na mjestima odvajanja nizova stanica nastalih uzgojem mutanta *dis3 exo* na 37°C bez dodatka sorbitola (Slika 10). U skladu s prethodno provedenim testom rasta, stanice divljeg tipa i *dis3 endo* mutanta na 37°C dijele fenotip jednak stanicama uzgojenim na 30°C (Slika 10). Također, stanice *dis3 exo* mutanta usprkos povišenoj temperaturi poprimaju uobičajeni oblik stanica kvasca dodatkom 1 M sorbitola (Slika 10). Prema tome, ovim eksperimentom je jasno pokazano da je jedna od morfoloških posljedica inaktivacije egzonukleazne aktivnosti podjedinice Dis3 defekt u odvajanju stanica nakon diobe.



Slika 10. Morfologija stanica sojeva *DIS3*, *dis3 endo*, *dis3 exo* vizualizirana fluorescencijskim mikroskopom nakon 3 dana inkubacije na 30°C ili 37°C sa ili bez dodatka 1 M sorbitola. Preparati su pripremljeni od kultura poraslih testom rasta na YNB –Leu krutim podlogama.

Kako bi se dodatno utvrdilo da je inhibirani rast u prethodno provedenom testu vijabilnosti *dis3 exo* mutanta pri povišenoj temperaturi posljedica oslabljene stijenke, odnosno da pri ovim uvjetima dolazi do pucanja stanica, provedeno je mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze u podlozi nakon uzgoja stanica. Alkalna fosfataza je unutarstanični enzim, tako da se mjerenje njene aktivnosti u podlozi za uzgoj zasniva se ekstracelularnoj prisutnosti enzima koja je posljedica pucanja stanica uslijed destabilizacije stanične stijenke. Stanice sojeva *DIS3*, *dis3 endo* i *dis3 exo* uzgajane su na 30°C u tekućoj YNB –Leu podlozi do logaritamske faze, a zatim precijepljene u istovjetnu tekuću podlogu sa ili bez dodatka 1 M sorbitola. Nakon 3 dana inkubacije na 37°C, izmjerena je aktivnost alkalne fosfataze u podlozi. Rezultati su pokazali kako je aktivnost alkalne fosfataze izmjerena u podlozi nakon uzgoja *dis3 exo* mutanta bez dodatka sorbitola najveća od ispitanih sojeva, s dvostruko većim vrijednostima u odnosu na divlji tip i *dis3 endo* mutant (Slika 11, -sorbitol). Budući da su prethodni eksperimenti ukazali na defektnu staničnu stijenku *dis3 exo* mutanta, povećana aktivnost

alkalne fosfataze u tekućoj podlozi je u skladu s očekivanjima. Također, dodatkom 1 M osmotskog stabilizatora sorbitola, aktivnost *dis3 exo* mutanta znatno se smanjuje te poprima vrijednost divljeg tipa i *dis3 endo* mutanta (Slika 11, +sorbitol) koji bez i sa dodanim sorbitolom daju slične vrijednosti.



Slika 11. Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze u podlozi nakon uzgoja stanica. Stanice sojeva *DIS3*, *dis3 endo* i *dis3 exo* uzgajane su na 30°C u tekućoj YNB –Leu podlozi do logaritamske faze, a zatim precijepljene u podlogu sa ili bez dodatka 1 M sorbitola. Nakon 3 dana inkubacije na 37°C, proveden je postupak mjerenja aktivnosti alkalne fosfataze u podlozi nakon izdvajanja stanica. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Prilikom izlaganja stanica specifičnim agensima i povišenoj temperaturi dobiveni su rezultati koji povezuju fenotip *dis3 exo* mutanta sa oslabljenom staničnom stijjenkom. Aberantan fenotip stanica te inhibiciju rasta ovog mutanta u stresnim uvjetima, moguće je povezati sa zabilježenim poteškoćama *dis3-54* (mutant za egzoribonukleaznu aktivnost Dis3) u odvijanju mitoze, formiranju diobenog vretena te lokalizaciji mikrotubula (Smith i Kiss, 2011). Dakle, postoji mogućnost da je fenotip poput višestaničnih agregata *dis3 exo* mutanta, osim same destabilizacije stanične stijjenke, posljedica navedenih defekata staničnog ciklusa. Bitno je i istaknuti kako akumulacijom molekula RNA dolazi do promjena u ekspresiji gena koje rezultiraju nepravilnom regulacijom procesa održavanja stabilnosti genoma, poput mitoze te mehanizma za popravak DNA. Zbog toga se smatra kako akumulacija molekula RNA *dis3 exo*

mutanta uzrokuje nestabilnost genoma, koja bi mogla predstavljati dodatni faktor za fenotipove primijećene u ovom radu.

Međutim, primarna uloga proteina Dis3 je degradacija i procesiranje RNA, tako da je najvjerojatniji razlog nestabilnosti stanične stijenke prilikom inaktivacije njegove katalitičke aktivnosti utjecaj na metabolizam RNA, odnosno promjene razina RNA koje kodiraju za proteine bitne za integritet stanične stijenke. U provedenim metodama rada, stanice divljeg tipa i *dis3 endo* mutanta, na 37°C i rastom uz prisutnost agenasa u hranjivoj podlozi, dijele fenotip jednak stanicama uzgojenim u optimalnim uvjetima. Obzirom na rezistenciju *dis3 endo* mutanta, možemo pretpostaviti kako samo egzoribonukleazna aktivnost Dis3 u značajnoj mjeri sudjeluje u degradaciji ili procesiranju RNA zaslužnih za održavanje stabilnosti stijenke. Prisutnost ovakve osjetljivosti isključivo kod *dis3 exo* mutanta otvara pitanje razlike u funkciji egzoribonukleazne i endoribonukleazne aktivnosti Dis3. Poznato je kako su egzo- i endoribonukleazna aktivnost zasebno evoluirale, i kako pojedinačno nisu esencijalne za RNA egzosomi za vijabilnost stanica kvasca. Međutim, iako je prethodno pokazano kako u usporedbi s endoribonukleaznom, egzoribonukleazna domena značajnije doprinosi oblikovanju transkriptoma, njihovi supstrati i mehanizam obrade supstrata nisu u potpunosti razjašnjeni (Schaeffer i sur., 2009).

Kontradiktorno s rezultatima ovog rada, koji jasno pokazuju izrazito važnu ulogu Dis3 u stabilizaciji stanične stijenke i odgovoru stanice na stres, nedavno je predstavljena uloga proteina Rrp6 u CWI putu, odnosno očuvanju integriteta stanične stijenke pri povišenoj temperaturi, koja je neovisna o RNA egzosomu (Wang i sur., 2020). No, ovdje jasno pokazana mogućnost suprimiranja temperature-osjetljivosti i pucanja stanica osmotskom stabilizacijom, te osjetljivost na specifične agense *dis3 exo* mutanta, direktno ukazuju na sudjelovanje podjedinice RNA egzosoma Dis3 u održavanju integriteta stanične stijenke, odnosno u odgovoru stanice na stres uzrokovan nepovoljnim uvjetima. U prilog tome govori i činjenica da delecija EAR domene Rrp6, putem koje stupa u interakciju s RNA egzosomom, dovodi do temperature osjetljivosti (Wasmuth i Lima, 2017), što indicira na bitnu nekatalitičku ulogu Rrp6 kao alosteričkog aktivatora RNA egzosoma pri stresnim uvjetima. Sljedeći korak u dodatnom razjašnjenju nestabilnosti stijenke *dis3 exo* mutanta bilo bi pronaći supstrate egzoribonukleazne domene Dis3 podjedinice, čija je obrada potrebna za održavanje stabilnosti stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*.

5. ZAKLJUČCI

1. Inaktivacija egzoribonukleazne, ali ne i endoribonukleazne domene proteina Dis3 kvasca *S. cerevisiae* dovodi do osjetljivosti stanica na specifične agense Calcofluor white, Congo red, SDS i kafein koji oštećuju staničnu stijenku. Ovaj efekt suprimira se osmotskom stabilizacijom medija za uzgoj.
2. Mutant za egzoribonukleaznu aktivnost proteina Dis3 pri povišenoj temperaturi ima manju vijabilnost zbog pucanja stanica, aberantnu morfologiju i defekt u separaciji stanica nakon diobe, koji se mogu suprimirati osmotskom stabilizacijom medija za uzgoj.
3. Egzoribonukleazna aktivnost proteina Dis3 ima bitnu ulogu u održavanju stabilnosti stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* pri stresnim uvjetima.

6. POPIS LITERATURE

- Aguilar-Uscanga, B., François, J.M., (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 268–274.
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., Tollervey, D., (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* **18**, 5399–5410.
- Arroyo, J., Bermejo, C., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., (2009) Genomics in the detection of damage in microbial systems: Cell wall stress in yeast. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 44–46.
- Basquin, C., Conti, E., Makino, D.L., Schuch, B., Stegmann, E., Baumga, M., (2015) RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature.* **524**, 54-58.
- 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.
- Butler, J.S., Mitchell, P., (2010) Rrp6, Rrp47 and cofactors of the nuclear exosome. *Adv. Exp. Med. Biol.* **702**, 91–104.
- Calvo, I.A., Gabrielli, N., Iglesias-Baena, I., García-Santamarina, S., Hoe, K.L., Kim, D.U., Sansó, M., Zuin, A., Pérez, P., Ayté, J., Hidalgo, E., (2009) Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast. *PLoS One* **4**. 1-10
- Cao, C., Cao, Z., Yu, P., Zhao, Y., (2020) Genome-wide identification for genes involved in sodium dodecyl sulfate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol.* **20**, 1–11.
- Czarnecki, J., Tchoukov, P., Dabros, T., (2012) Possible role of asphaltenes in the stabilization of water-in-crude oil emulsions. *Energy and Fuels* **26**, 5782–5786.
- Davis, C.A., Ares, M., (2006) Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3262–3267.
- Delan-Forino, C., Schneider, C., Tollervey, D., (2017) Transcriptome-wide analysis of alternative routes for RNA substrates into the exosome complex. *PLoS Genet.* **13**, 1–25.

- Duina, A.A., Miller, M.E., Keeney, J.B., (2014) Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* **197**, 33–48.
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., Séraphin, B., (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 15–22.
- Falk, S., Bonneau, F., Ebert, J., Kögel, A., Conti, E., (2017) Mpp6 Incorporation in the Nuclear Exosome Contributes to RNA Channeling through the Mtr4 Helicase. *Cell Rep.* **20**, 2279–2286.
- Fessler, Michael B.; Rudel, Lawrence L.; Brown, M., (2008) Pronounced and Extensive Microtubule Defects in a *Saccharomyces cerevisiae* DIS3 Mutant. *Bone* **23**, 1–7.
- Frazão, C., McVey, C.E., Amblar, M., Barbas, A., Vonrhein, C., Arraiano, C.M., Carrondo, M.A., (2006) Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex. *Nature* **443**, 110–114.
- Free, S.J., (2013) Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. 1st ed., Elsevier Inc.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., (1996). *Science (80-)*. **274**, 546–567.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., Reid, B.J., (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science (80-)*. **183**, 46–51.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., Jensen, T.H., (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**, 538–542.
- Hohmann, S., (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Protoplasma* **66**, 301–339.
- Imai, K., Noda, Y., Adachi, H., Yoda, K., (2005) A Novel Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Rcr1 Regulates Chitin Deposition in the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae* *. **280**, 8275–8284.
- Jigami, Y., Odani, T., (1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1426**, 335–345.
- Kamada, Y., Un Sung Jung, Piotrowski, J., Levin, D.E., (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat

- shock response. *Genes Dev.* **9**, 1559–1571.
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W.J., (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185–202.
- Kopecká, M., Gabriel, M., (1992) The influence of Congo red on the cell wall and (1 → 3)- β -d-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **158**, 115–126.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., François, J., (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol. Microbiol.* **61**, 1147–1166.
- Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J.D., François, J., (2003) Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 20345–20357.
- Levin, D.E., (2005) Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol* **69**, 262–291.
- Levin, D.E., (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**, 1145–1175.
- Linder, T., (2018) Evaluation of the chitin-binding dye Congo red as a selection agent for the isolation, classification, and enumeration of ascomycete yeasts. *Arch. Microbiol.* **200**, 671–675.
- Lipke, P.N., Ovalle, R., (1998) Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**, 3735–3740.
- Lodish Harvey, Berk Arnold, A. Kaider Chris, Bretcher Anthony, Ploegh Hidde, Amon Angelika, C.M.K., (2016) *Molecular Cell Biology*. **8**, 19 - 22
- Lorentzen, E., Basquin, J., Tomecki, R., Dziembowski, A., Conti, E., (2008) Structure of the Active Subunit of the Yeast Exosome Core, Rrp44: Diverse Modes of Substrate Recruitment in the RNase II Nuclease Family. *Mol. Cell* **29**, 717–728.
- Lussier, M., White, A.M., Sheraton, J., Di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S.B., Horenstein, C.I., Chen-Weiner, J., Ram, A.F.J., Kapteyn, J.C., Roemer, T.W., Vo, D.H., Bondoc, D.C., Hall, J., Zhong, W.W., Sdicu, A.M., Davies, J., Klis, F.M., Robbins, P.W., Bussey, H., (1997) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and

- architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435–450.
- Malet, H., Topf, M., Clare, D.K., Ebert, J., Bonneau, F., Basquin, J., Drazkowska, K., Tomecki, R., Dziembowski, A., Conti, E., Saibil, H.R., Lorentzen, E., (2010) RNA channelling by the eukaryotic exosome. *EMBO Rep.* **11**, 936–942.
- Messina, C.M., Faggio, C., Laudicella, V.A., Sanfilippo, M., Trischitta, F., Santulli, A., (2014) Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on stress response in the Mediterranean mussel (*Mytilus Galloprovincialis*): Regulatory volume decrease (Rvd) and modulation of biochemical markers related to oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* **157**, 94–100.
- Midtgaard, S.F., Assenholt, J., Jonstrup, A.T., Van, L.B., Jensen, T.H., Brodersen, D.E., (2006) Structure of the nuclear exosome component Rrp6p reveals an interplay between the active site and the HRDC domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11898–11903.
- Milbury, K.L., Paul, B., Lari, A., Fowler, C., Montpetit, B., Stirling, P.C., (2019) Exonuclease domain mutants of yeast DIS3 display genome instability. *Nucleus* **10**, 1–12.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., Tollervey, D., (1997) The exosome: A conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**, 457–466.
- Mortimer, R.K., (2000) Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* **10**, 403–409.
- Munna, M.S., Humayun, S., Noor, R., (2015) Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01 Microbiology. *BMC Res. Notes* **8**, 1–8.
- Murzin, A.G., (1993) OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* **12**, 861–867.
- Neil, H., Malabat, C., D'Aubenton-Carafa, Y., Xu, Z., Steinmetz, L.M., Jacquier, A., (2009) Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* **457**, 1038–1042.
- Ogami, K., Chen, Y., Manley, J.L., (2018) RNA surveillance by the nuclear RNA exosome: Mechanisms and significance. *Non-coding RNA* **4**, 2-21
- Pringle, J.R., (1991) Staining of bud scars and other cell wall chitin with Calcofluor. *Methods Enzymol.* **194**, 732–735.

- Ram, A.F.J., Wolters, A., Hoopen, R. Ten, Klis, F.M., (1994) A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**, 1019–1030.
- Ram, A.F.J., Klis, F.M., (2006) Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat. Protoc.* **1**, 2253–2256.
- Rey, F. Del, Gil, C., Arroyo, J., Garcá, J.C., Klis, F.M., (2001) A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*., *Comp Funct Genom* **2**, 124–142.
- Roncero, C., Duran, A., (1985) Effect of Calcofluor White and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.* **163**, 1180–1185.
- Roncero, C., Valdivieso, M.H., Ribas, J.C., Durán, A., (1988) Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **170**, 1945–1949.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F.P., Dastidar, E.G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C.M., Van Hoof, A., (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 56–62.
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., Tollervey, D., (2009) The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1127–1140.
- Schneider, C., Tollervey, D., (2013) Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 485–493.
- Schroeder, L., Ikui, A.E., (2019) Tryptophan confers resistance to SDS-associated cell membrane stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **14**, 1–16.
- Schuch, B., Feigenbutz, M., Makino, D.L., Falk, S., Basquin, C., Mitchell, P., Conti, E., (2014) The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *EMBO J.* **33**, 2829–2846.
- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Duran, A., Cabib, E., (1991) The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* **114**, 111–123.
- Singer, M.M., Tjeerdema, R.S., (1993) Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl

- sulfate. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **133**, 95–149.
- Stuparevic, I., Mosrin-Huaman, C., Hervouet-Coste, N., Remenaric, M., Rahmouni, A.R., (2013) Cotranscriptional recruitment of RNA exosome cofactors Rrp47p and Mpp6p and two distinct Trf-Air-Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complexes assists the exonuclease Rrp6p in the targeting and degradation of an aberrant messenger ribonucleoprotein particle (mRNO) in yeast. *J. Biol. Chem.* **288**, 31816–31829.
- Torchet, C., Bousquet-Antonelli, C., Milligan, L., Thompson, E., Kufel, J., Tollervey, D., (2002) Processing of 3'-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Mol. Cell* **9**, 1285–1296.
- Vannini, G.L., Poli, F., Donini, A., Pancaldi, S., (1983) Effects of Congo red on wall synthesis and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Sci. Lett.* **31**, 9–17.
- Vincent, H.A., Deutscher, M.P., (2006) Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *J. Biol. Chem.* **281**, 29769–29775.
- Waehneltd, T. V., (1975) Sodium dodecyl sulfate in protein chemistry. *BioSystems* **6**, 176–187.
- Wang, C., Liu, Y., DeMario, S.M., Mandric, I., Gonzalez-Figueroa, C., Chanfreau, G.F., (2020) Rrp6 Moonlights in an RNA Exosome-Independent Manner to Promote Cell Survival and Gene Expression during Stress. *Cell Rep.* **31**, 107754.
- Wasmuth, E. V., Lima, C.D., (2012) Exo- and Endoribonucleolytic Activities of Yeast Cytoplasmic and Nuclear RNA Exosomes Are Dependent on the Noncatalytic Core and Central Channel. *Mol. Cell* **48**, 133–144.
- Wasmuth, E. V., Lima, C.D., (2017) The Rrp6 C-terminal domain binds RNA and activates the nuclear RNA exosome. *Nucleic Acids Res.* **45**, 846–860.
- Wedlich-Soldner R., L.R., (2008) Yeast and Fungal Morphogenesis: Evolution of Morphologic Diversity. *Bone* **23**, 1–7.
- Yamamoto, N., Maeda, Y., Ikeda, A., Sakurai, H., (2008) Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **7**, 783–790.
- Zinder, J.C., Lima, C.D., (2017) Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev.* **31**, 88–100.

Zlotnik, H., Pilar Fernandez, M., Bowers, B., Cabib, E., (1984) Saccharomyces cerevisiae mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J. Bacteriol.* **159**, 1018–1026.

Izjava o izvornosti

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

Lucija Štrbac