

Međudjelovanje mRNA-vezujućeg proteina Ssd1 i 3'-5' egzoribonukleaze Rrp6 u održavanju stabilnosti stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Bekavac, Nikša

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:834967>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Nikša Bekavac

7749/PT

**Međudjelovanje mRNA-vezujućeg proteina Ssd1 i 3'-5'
egzoribonukleaze Rrp6 u održavanju stabilnosti stanične
stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

ZAVRŠNI RAD

Kolegij: Biokemija

Mentor: doc. dr. sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2021.

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

Međudjelovanje mRNA-vezujućeg proteina Ssd1 i 3'-5' egzoribonukleaze Rrp6 u održavanju stabilnosti stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Nikša Bekavac, 0058214818

Sažetak: RNA-vezujući protein Ssd1 regulira ekspresiju gena koji kodiraju za proteine uključene u stabilizaciju stanične stijenke kvasca. U očuvanju integriteta stanične stijenke bitnu ulogu ima i RNA egzosom, kompleks koji procesira i degradira RNA supstrate egzoribonukleaznom aktivnošću katalitičkih podjedinica Dis3 i Rrp6. Stanice mutanata *rrp6* pokazuju temperaturnu osjetljivost koja je posljedica kompromitirane stabilnosti stanične stijenke, a ovaj fenotip je najizraženiji kod linije sojeva kvasca W303. Budući da sojevi ove linije nose nefunkcionalnu inačicu alela koji kodira za Ssd1 (*ssd1-d*), ispitan je utjecaj ekspresije funkcionalnog alela *SSD1-V* s odgovarajućeg genomskog lokusa i centromernog plazmida u stanicama mutanata W303 *rrp6* i *dis3 exo*. Ekspresija *SSD1-V* suprimirala je defekte u rastu i morfologiji stanica ovih mutanata u odnosu na odgovarajuće *ssd1-d* stanice pri djelovanju povišene temperature i agenasa koji oštećuju staničnu stijenku. Ovi rezultati upućuju da RNA egzosom i Ssd1 djeluju sinergistički pri održavanju integriteta stanične stijenke kvasca.

Ključne riječi: kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, RNA egzosom, Rrp6, Ssd1, stanična stijenka

Rad sadrži: 35 stranica, 17 slika, 3 tablice, 69 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., Nada Šupljika, mag. oecol. et prot. nat.

Datum obrane: 17. lipnja 2021

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

Interplay of mRNA-binding protein Ssd1 and 3'-5' exoribonuclease Rrp6 in yeast cell wall stability maintenance

Nikša Bekavac, 0058214818

Abstract: The RNA-binding protein Ssd1 regulates the expression of genes encoding yeast cell wall morphogenesis proteins. Maintenance of yeast cell wall integrity is also mediated by the RNA exosome, a complex which processes and degrades RNA substrates through exoribonuclease activities of its catalytic subunits, Dis3 and Rrp6. Yeast *rrp6* mutant cells display a temperature-sensitive phenotype as a result of impaired cell wall stability, which is most pronounced in the W303 genetic background. Since strains of this background harbour a non-functional form of the allele encoding Ssd1 (*ssd1-d*), in this work we tested the effect of the expression of the active *SSD1-V* allele from its corresponding genomic locus and from a centromeric plasmid in W303 *rrp6* and *dis3 exo* mutant cells. Expression of *SSD1-V* suppressed growth and morphology defects upon exposure to high temperature and cell wall stressors compared with the corresponding *ssd1-d* cells. These results suggest that RNA exosome and Ssd1 act synergistically during the maintenance of cell wall integrity in yeast.

Keywords: cell wall, RNA exosome, Rrp6, Ssd1, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 35 pages, 17 figures, 3 tables, 69 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., Nada Šupljika, mag. oecol. et prot. nat.

Defence date: July 17th 2021

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1.1. Stanična stijenka kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. RNA egzosom	4
2.2.1. 3'-5' egzoribonukelaza Rrp6	5
2.3. mRNA-vezujući protein Ssd1	6
3. MATERIJALI I METODE.....	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Kemikalije i enzimi	9
3.1.2. Sojevi kvasca.....	10
3.1.3. Plazmidi	10
3.1.4. Početnice	11
3.1.5. Hranjive podloge	11
3.1.5.1. Hranjiva podloga za uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i>	11
3.1.5.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
3.1.6. Puferi.....	12
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Test rasta (engl. Plate assay).....	13
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	13
3.2.3. Gel elektroforeza DNA	13
3.2.4. Određivanje koncentracije DNA.....	14
3.2.5. Izolacija i taloženje genomske DNA kvasca.....	14
3.2.6. Izolacija plazmida iz stanica <i>E. coli</i>	15
3.2.7. Transformacija kvasca <i>S. cerevisiae</i> LiAc metodom	15

3.2.8. Mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Konstrukcija i genotipizacija mutanata <i>rrp6</i> sojeva W303 <i>SSD1-V</i> i W303 <i>ssd1-d</i>	18
4.2. Ispitivanje utjecaja povišene temperature i agenasa koji oštećuju staničnu stijenku na stanice sojeva W303 <i>SSD1-V rrp6</i> i W303 <i>ssd1-d rrp6</i>	20
4.3. Ispitivanje utjecaja povišene temperature na stanice mutanata za katalitičke podjedinice RNA egzosoma transformirane plazmidima koji nose alel <i>SSD1-V</i>	26
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA.....	32

1. UVOD

Stanična stijenka kvasca je esencijalna organela zaslužna za otpornost stanica na nepovoljne vanjske utjecaje, te su njena biosinteza i održavanje njenog integriteta esencijalni procesi za vijabilnost, rast i parenje stanica (Wei i sur., 2009; Feng i sur., 2018). Neki od ključnih proteina koji neizravno utječu na remodeliranje i održavanje stabilnosti stanične stijenke su RNA-vezujući proteini, koji imaju različite uloge u metabolizmu RNA molekula. Ovi proteini često su neophodni za vijabilnost stanica te izvršavaju ili reguliraju ključne funkcije u stanicama, uključujući transkripciju, *splicing*, translaciju i degradaciju RNA (Cech i Steitz, 2014). Jedan od njih je Ssd1, evolucijski očuvani mRNA-vezujući protein uključen u posttranskripcijsku regulaciju gena koji kodiraju za proteine uključene u održavanje integriteta stanične stijenke (Jansen i sur., 2009). Ssd1 stupa u interakcije s odgovarajućim mRNA molekulama, te ih pohranjuje u tzv. P-tjelešca, stanične nakupine proteina i RNA molekula u kojima se čuvaju do translacije ili degradacije (Xing i sur., 2020). U metabolizmu RNA važnu funkciju ima i RNA egzosom, kompleks od jedanaest podjedinica koji degradira i procesira brojne vrste RNA molekula uz pomoć 3'-5' egzoribonukleaznih aktivnosti dvije katalitičke podjedinice, Dis3 i Rrp6 (Allmang i sur., 1999). Rrp6 je jedina neesencijalna podjedinica RNA egzosoma, ali stanice mutanta *rrp6* pokazuju temperaturno osjetljivi fenotip, koji je posljedica narušavanja integriteta stanične stijenke (Briggs i sur., 1998; Novačić i sur., 2021). Međutim, temperaturna-osjetljivost stanica mutanta *rrp6* je različito izražena u različitim linijama sojeva kvasca *S. cerevisiae*, a najizraženija je kod stanica iz linije sojeva W303. U ovom radu je ispitano je li razlog jačeg temperaturno osjetljivog fenotipa mutanata *rrp6* i *dis3 exo* u liniji sojeva W303 nefunkcionalnost polimorfnog alela *SSD1* koji se u stanicama ove linije sojeva javlja kao inaktivna inačica *ssd1-d*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

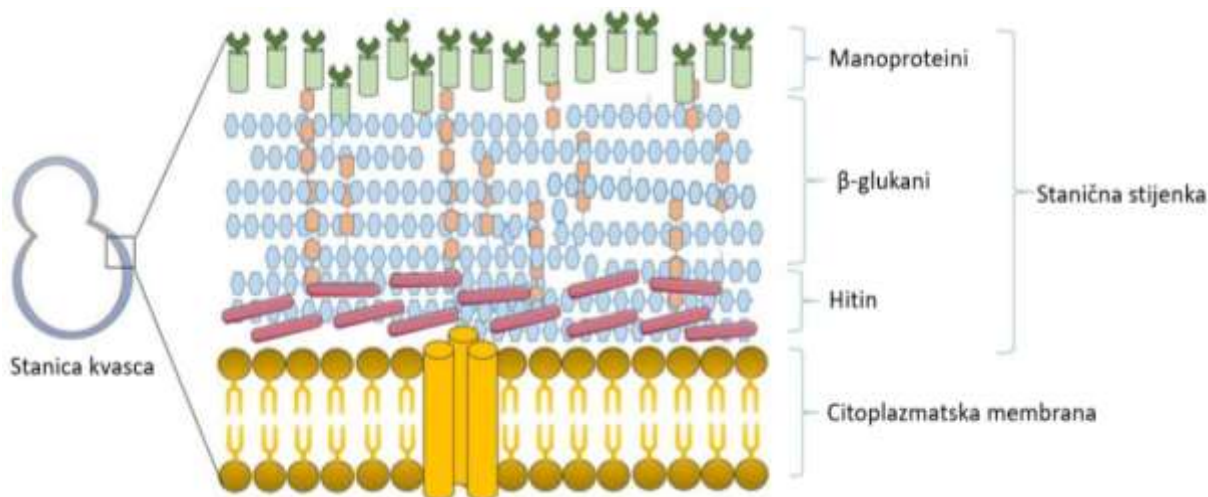
Saccharomyces cerevisiae poznatiji je kao pekarski ili pivski kvasac. Osim primjene u prehrambenoj industriji i industriji alkoholnih pića, u kojima se koristi zbog svoje mogućnosti pretvorbe šećera u etanol i ugljikov dioksid, koristi se i kao modelni organizam u istraživačke svrhe (Burgess i sur., 2017). Ono što ga čini dobrim modelnim organizmom u znanstvenim istraživanjima je što posjeduje veliki broj prednosti prokariotskih organizama, a pripada carstvu eukariota, zbog čega je pogodan za istraživanja procesa tipičnih za eukariotske stanice te se spoznaje dobivene sa stanicama kvasca mogu primijeniti na stanice ljudi i drugih viših eukariota. Poput prokariota, kvasci su jednostanični organizmi koji koriste jeftine i lako dostupne komponente za rast, imaju vrlo kratko generacijsko vrijeme i predstavljaju pogodne sustave za ekspresiju homolognih i heterolognih proteina, zbog prethodno razvijenih genetičkih sustava koji osiguravaju velik stupanj ekspresije željenih proteina. Kvasac, kao i ostali eukarioti, ima mogućnost izvršavanja velikog broja posttranslacijskih modifikacija proteina, koje su od velikog značaja za njihovu ekspresiju i funkciju, a ujedno i osiguravaju pravilno smatanje proteina (Gomes i sur., 2018).

Godine 1996. genom kvasca *S. cerevisiae* postao je prvi, u potpunosti, sekvenciran eukariotski genom. U tipičnoj haploidnoj stanici kvasca, oko 12 068 000 parova baza (pb) DNA, koje kodiraju za oko 6000 proteina, raspoređeno je na 16 kromosoma čija je veličina između 0.2 i 2.2 Mb (10^6 pb). Kao što se očekuje za eukariotske genome, geni kvasca *S. cerevisiae* sadrže dvije skupine sekvenci: kodirajuće sekvence (eksone) i nekodirajuće sekvence (introne). Takozvana „gustoća gena“, odnosno učestalost gena koji kodiraju za proteine u genomu ovog kvasca je prilično visoka, pri čemu se jedan ekson pojavljuje približno svakih 2 tisuće parova baza. S druge strane, broj gena koji sadrže introne je kod *S. cerevisiae* izrazito nizak, a iznosi oko 4% (Goffeau i sur., 1996; Spingola i sur., 1999).

2.1.1. Stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Stanična stijenka kvasca je dinamična struktura koja omogućuje preživljavanje u stresnim uvjetima, daje zaštitu, određuje oblik stanice te osigurava osmotsku stabilnost, te predstavlja selektivnu barijeru kroz koju različite molekule ulaze i izlaze iz stanice (Gow i sur., 2012). Ona je višeslojna struktura koja čini do 25% masenog udjela stanice. U sastavu stijenke, unutarnji

polisaharidni sloj je primarno odgovoran za mehaničku izdržljivost stijenke i osiguravanje veznih mjesta za proteine, koji čine vanjski sloj stijenke. Vanjski proteinski sloj također regulira propusnost stanične stijenke te štiti citoplazmatsku membranu i staničnu stijenku od degradacije stranim enzimima (Klis i sur., 2002). Bitno je istaknuti da mehanička izdržljivost stijenke ne dolazi od jedne specifične komponente, nego međudjelovanjem svih sastavnica iste (Tenhaken, 2015).



Slika 1 Građa stanične stijenke kvasca (prema Anwar i sur., 2017)

Unutarnji sloj, koji pruža mehaničku i osmotsku stabilnost, građen je od polisaharida β -1,3-glukana (50 %), β -1,6-glukana (5 %) i hitina (1-2 %). β -1,3-glukan je dugolančani polimer glukoze koji nastaje povezivanjem oko 1500 glukoznih jedinica u lance. Sintetizira se prvi prilikom sinteze stanične stijenke, nakon čega se na formirani glukanski sloj, kovalentno vežu β -1,6-glukan i hitin. Lanci β -1,3-glukana formiraju strukturu sličnu uzvojnici, čime se osigurava čvrstoća i osmotska stabilnost stanične stijenke (Gow i sur., 2012). Na vanjskoj strani mreže β -1,3-glukana nalaze se visoko razgranati, u vodi topljivi lanci β -1,6-glukana na koje mogu biti kovalentno vezani manoproteini (Klis i sur., 2002; Ruiz-Herrera i sur., 2006). Manoproteini su većinom glikozilirani i uključeni u specifične procese prepoznavanja među stanicama (Cappellaro i sur., 1994).

Glavne karakteristike molekularne organizacije stanične stijenke kvasaca su poznate, međutim sastav i organizacija stanične stijenke mogu se razlikovati s obzirom na fazu staničnog ciklusa kvasca ili izlaganju stanice stresnim uvjetima. Sukladno tome, ugradnja proteina stanične stijenke je vremenski i prostorno kontrolirana i uvelike ovisi o okolišnim uvjetima. Zbog toga je potrebna precizna regulacija ekspresije gena, odnosno sinteze proteina koji utječu na građu

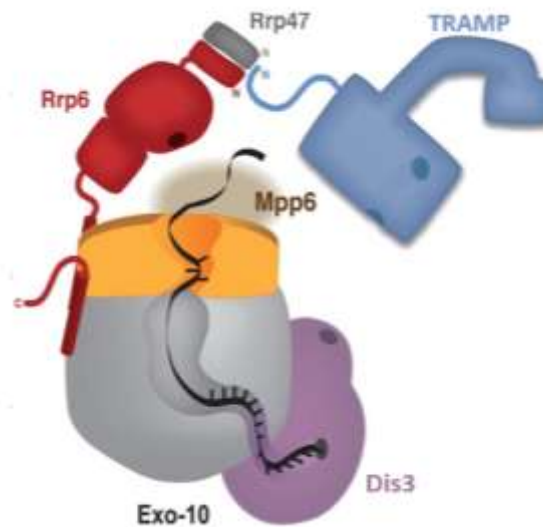
stanične stijenke, te će stanica kvasca potrošiti veliku količinu energije pri izgradnji i remodeliranju stanične stijenke (Klis i sur., 2002).

2.2. RNA egzozom

Metabolički putevi razgradnje RNA su kroz evoluciju očuvani u svim životnim oblicima, a pomoću njih se postiže regulacija količine RNA, degradacija nefunkcionalnih ili pogrešno procesiranih RNA, te procesiranje RNA molekula u zrele oblike (Chlebowski i sur., 2013). Eukariotski RNA egzozom je esencijalni evolucijski očuvani proteinski kompleks veličine oko 440 kDa koji ima središnju ulogu u degradaciji, sazrijevanju i kontroli kvalitete brojnih RNA molekula u jezgri i citoplazmi svojom 3'-5' egzoribonukleaznom i endoribonukleaznom aktivnosti (Januszyk i Lima, 2014). Uz to, ima funkciju u regulaciji ekspresije specifičnih mRNA kao odgovor na različite stresne okolišne uvjete, ali i tijekom normalnog staničnog rasta i razvoja (Kilchert i sur., 2016).

Eukariotski RNA egzozom, ovisno o lokalizaciji, se sastoji od 10 ili 11 podjedinica u koje ubrajamo jezgru prstenastog oblika od devet podjedinica (Exo9) koja je katalitički inaktivna. Exo9 jezgra se sastoji od devet proteina koji su esencijalni za vijabilnost kvasca: njih šest ima samo jednu domenu i homologni su fosforilitičkom enzimu RNaza PH (fosforilitička 3'-5' egzoribonukleaza), dok ostala tri sadrže RNA-vezujuće domene. RNazne PH podjedinice su Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 i Mtr3, dok su RNA-vezujuće podjedinice Rrp4, Rrp40 i Csl4. Iako prvih šest proteina ima veliku sličnost s RNazama PH, sve navedene podjedinice su katalitički inaktivne uslijed mutacija u ključnim aminokiselinskim ostacima (Liu i sur., 2006). Kroz središnji kanal Exo9 kompleksa mogu proći samo jednolančane RNA molekule, te se kroz njega RNA dovodi do katalitičke podjedinice Dis3 s kojom se tvori Exo10 kompleks (Bonneau i sur., 2009).

Katalitičku aktivnost RNA egzozom dobiva asocijacijom Exo9 jezgre s jednim ili dva hidrolitička enzima: esencijalnim proteinom Dis3 i neesencijalnim proteinom Rrp6 (Briggs i sur., 1998). Uz ove katalitičke podjedinice koje se vežu na suprotne krajeve Exo9 jezgre, na RNA egzozom se vežu i kofaktori koji reguliraju njegove katalitičke aktivnosti, a u njih pripadaju monomerni kofaktori Rrp47 i Mpp6 te TRAMP kompleks (Slika 2). Dis3 ima endoribonukleaznu i 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnosti te se nalazi u sastavu RNA egzozoma u jezgri i u citoplazmi, a okrenut je prema središtu prstena Exo9, dok Rrp6 posjeduje samo 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost i pojavljuje se isključivo u sastavu RNA egzozoma u jezgri te mu je aktivno mjesto okrenuto prema vanjskoj strani RNA egzozoma (Liu i sur., 2006).



Slika 2 Struktura nuklearnog RNA egzozoma s kofaktorima (prema Schuch i sur., 2014)

Proteini Dis3 su visokoočuvani u svim eukariotskim vrstama. Iako je prisutna razlika u aminokiselinskom slijedu, organizacija domena ovih proteina je identična. Sastoje se od tri RNA-vezujuće domene (dvije *cold shock* (CSD) i jedne S1), te jedne središnje katalitičke domene. Uz nabrojane, Dis3 kvasca *S. cerevisiae* na N-terminusu sadrži PIN domenu odgovornu za stabilizaciju povezivanja s Exo9 prstenom RNA egzozoma, što je esencijalno za endoribonukleaznu aktivnost Dis3 (Schneider i sur., 2009). Opseg RNA supstrata koje Dis3 prihvaća za hidrolizu je širok, ali pokazuje povećanu aktivnost kod RNA s povećanim udjelom adenina i uracila (Chen i sur., 2001). Dis3 je, kao i Exo9, esencijalan za vijabilnost stanica kvasca (Brouwer i sur., 2002).

2.2.1. 3'-5' egzoribonukelaza Rrp6

Druga katalitička podjedinica, te jedina neesencijalna komponenta RNA egzozoma prisutna isključivo u jezgri je protein Rrp6 (Ribosomal RNA-processing protein 6). Ovaj enzim posjeduje 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost koja sudjeluje u procesiranju 3' krajeva RNA, degradaciji nekodirajućih RNA (ncRNAs, engl. non-coding RNAs), odnosno kriptičkih nestabilnih transkripta (CUTs, engl. Cryptic unstable transcripts) te RNA molekula s preuranjenim STOP kodonom (Briggs i sur., 1998). Osim degradacije, sudjeluje i u dozrijevanju RNA prekursora poput snRNA (engl. small nuclear RNA – mala nuklearna RNA), snoRNA (engl. small nucleolar RNA – mala nukleolarna RNA) i 5.8S pre-rRNA (Allmang i sur., 1999; Fox i sur., 2015)

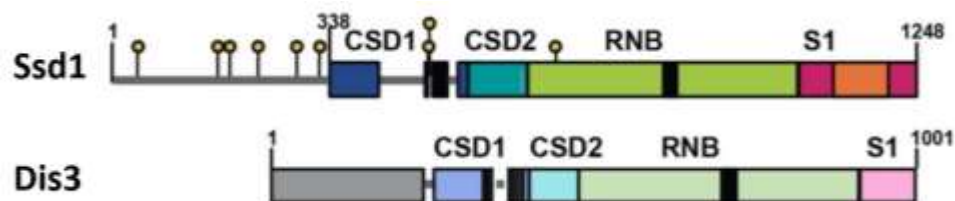
Protein Rrp6 veličine je 733 aminokiselinskih ostataka i molarne mase oko 84 kDa, a u građi su mu prisutne sljedeće domene karakteristične za obitelj egzonukleaznih RNaza D, u koju pripada: N-terminalna PMC2NT domena bitna za interakciju s kofaktorom Rrp47, EXO domena s egzoribonukleaznom aktivnosti, dvije HRDC domene i C-terminalna domena (CTD) bitna za povezivanje i aktivaciju Exo9 jezgre. Aminokiselinski motiv DEDD-Y unutar EXO domene uključuje tri aspartatna, jedan glutamatni i jedan tirozinski ostatak koji koordiniraju dva metalna iona za katalizu hidrolitičke reakcije (Stead i sur., 2007; Januszyk i sur., 2011; Callahan i Butler, 2010).

Rrp6 se u jezgri stanica asocira s Exo9 i Dis3 te tvore kompleks od jedanaest podjedinica. Rrp6 posjeduje aktivnosti koje su ovisne i neovisne o Exo9, međutim one neovisne o Exo9 obuhvaćaju interakcije s malim dijelom RNA molekula (Callahan i Butler, 2010). Osim katalitičke uloge u sklopu RNA egzosoma, Rrp6 ima i ulogu stimulacije aktivnosti Dis3 i proširivanja Exo9 prstena, pri čemu se obje katalitičke podjedinice mogu neovisno jedna o drugoj vezati na Exo9, ali će obostrana asocijacija dovesti do maksimalne razine njihovih enzimskih aktivnosti. Uvođenjem specifične točkaste mutacije Y361A unutar EXO domene Rrp6 dovodi do gubitka katalitičke aktivnosti proteina Rrp6, ali degradacija RNA se može nastaviti neovisno o inaktivaciji Rrp6 jer je i dalje funkcionalan Dis3 (Liu i sur., 2006; Wasmuth i Lima, 2012; Makino i sur., 2015). Iako je Rrp6 jedina neesencijalna podjedinica RNA egzosoma, delecija gena *RRP6* uzrokovat će sporiji rast, temperaturnu osjetljivost te nakupljanje specifičnih RNA supstrata Rrp6. Za pojavu ovih fenotipova je zaslužan nedostatak egzoribonukleazne aktivnosti Rrp6, ali i gubitak njegove nekatalitičke funkcije kojom stimulira aktivnost Dis3 (Phillips i Butler, 2003).

2.3. mRNA-vezujući protein Ssd1

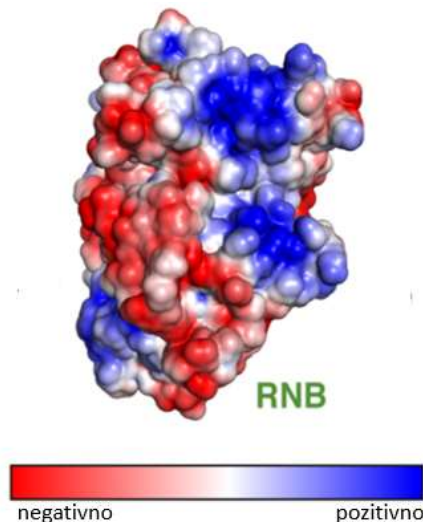
Protein Ssd1, kodiran genom *SSD1* sistematskog imena *YRD293C*, je mRNA-vezujući protein kvasca koji stupa u interakciju primarno s 5', ali i 3'-UTR (engl. Untranslated region) regijama mRNA, čime regulira njihovu translaciju (Bayne i sur., 2020). Molekule mRNA koje Ssd1 veže nose upute za sintezu proteina koji imaju ulogu u organizaciji stanične stijenke, stoga Ssd1 igra bitnu ulogu u održavanju integriteta stanične stijenke i njezinom remodeliranju. Remodeliranje stanične stijenke je proces koji je esencijalan za normalnu staničnu diobu i rast, a prvenstveno je lokaliziran na mjestima pupanja i citokineze tijekom mitoze (Hogan i sur., 2008; Kurischko i sur., 2011).

Kada uspoređujemo strukturu Ssd1 sa strukturom drugih enzima iz obitelji RNaza II kojoj pripada, najbližnja je strukturi Dis3, esencijalne katalitičke podjedinice RNA egzosoma. Oba proteina sadrže dvije *cold shock* domene na N-terminusu (CSD1 i CSD2), RNB domenu (engl. RNA-Binding domain, RNA-vezujuća domena) i S1 domenu na C-terminusu proteina (Slika 3) (Bonneau i sur., 2009). Međutim, dok u strukturi proteina Dis3 RNB domena sadrži aktivno egzoribonukleazno katalitičko mjesto, u strukturi proteina Ssd1 RNB domena je pseudonukleazna zbog mutacija koje inaktiviraju aktivno mjesto, te je ono dodatno blokirano fiksnim strukturnim elementima proteina. Smatra se da je u evolucijskoj prošlosti Ssd1 bio bifunkcionalna RNaza i RNA-vezujući protein, ali da je kroz evoluciju očuvana samo funkcija vezanja mRNA molekula, a gubitak katalitičke aktivnosti uzrokovan je promjenom u aminokiselinskom sastavu. U usporedbi s drugim proteinima iz obitelji RNaza II, kod proteina Ssd1 nedostaje klaster od četiri kisela aminokiselinska ostatka koji su odgovorni za katalizu, odnosno za usmjeravanje dvovalentnog kationa potrebnog za aktivaciju molekule vode (Bayne i sur., 2020; Uesono i sur., 1997). Drugi razlog nedostatka katalitičke aktivnosti Ssd1 je pojava α -uzvojnice unutar RNB domene koja blokira dio aktivnog mjesta i prolaz za RNA supstrata do istog (Faehnle i sur., 2014; Lorentzen i sur., 2008).



Slika 3 Usporedba struktura proteina Ssd1 i Dis3 (prema Bayne i sur., 2020)

Mehanizmi posttranskripcijske regulacije ekspresije gena pomoću RNA-vezujućih proteina (engl. RNA-binding proteins, RBPs) uključuju regulaciju translacije, procesiranja, transporta i razgradnje mRNA molekula. Obitelji RNA-vezujućih proteina se mogu naći u svim organizmima, gdje imaju ulogu u sazrijevanju i degradaciji RNA (Reis i sur., 2013). Način na koji Ssd1 prepoznaje svoje mRNA supstrate i regulira njihovu translaciju do nedavno nije bio u potpunosti razjašnjen, ali znalo se da mnoge mRNA molekule koje Ssd1 veže imaju zajednički motiv u svojoj sekvenci bogat citozinima i uracilima (Hogan i sur., 2008). Utvrđivanjem kristalne strukture proteina Ssd1 pokazano je da se na površini proteina nalazi područje bogato pozitivnim nabojem, što je povoljno za vezanje nukleinskih kiselina negativnog naboja (Slika 4) (Bayne i sur., 2020).



Slika 4 Kristalna struktura proteina Ssd1 s naznačenom raspodjelom naboja (prema Bayne i sur., 2020)

Protein Ssd1 kvasca *S. cerevisiae* je nukleocitoplazmatski protein. Primarno je smješten u citoplazmi, ali istraživanja pokazuju da se Ssd1 prolazno lokalizira i u jezgri, gdje kotranskripcijski veže ciljane mRNA tako da se sa svojim N-terminusom povezuje na C-terminus RNA polimeraze II. Kompleks mRNA-Ssd1 se eksportira iz jezgre u citoplazmu kroz pore jezgrine membrane (Terry i Went, 2009; Erkmann i Kutay, 2004).

Uloga Ssd1, ovisno o uvjetima u kojim se stanica nalazi, jest da mRNA transportira u citoplazmu ili na mjesta pupanja, dok je druga mogućnost da dostavi i pohrani mRNA u tjelešca za obradu mRNA (engl. P-bodies, mRNA-processing bodies; P-tjelešca). U P-tjelešcima se suprimira njihova translacija te se u njima mRNA molekule pohranjuju ili razgrađuju (Rodriguez i sur., 2008) u stresnim uvjetima poput manjka glukoze, hipertoničnog stresa ili toplinskog šoka (Parker i Sheth, 2007). Ako dođe do odvođenja u citoplazmu ili na mjesta pupanja, Ssd1 će biti supstrat enzimu Cbk1, kinazi koja fosforilira nestrukturiranu regiju Ssd1 i time inhibira njegovo djelovanje. Inhibicija Ssd1 dovodi do otpuštanja vezane mRNA u stanicama kćeri tijekom pupanja, čime se omogućava lokalizirana ekspresija tih mRNA. Gubitak aktivnosti Cbk1 vodi do smrti stanica, odnosno nekontrolirana aktivnost Ssd1 ima letalan učinak, obzirom na to da se brojne mRNA bitne za regulaciju stabilnosti stanične stijenke ne translatiraju ili degradiraju, što dovodi do narušavanja vijabilnosti stanica kvasca (Kurischko i sur., 2011). Ssd1 ima osam mjesta koja Cbk1 može fosforilirati, a *in vivo* je pokazano da dolazi do fosforilacije na najmanje šest njih (Jansen i sur., 2009).

Postoji oko 50 različitih vrsta mRNA molekula koje Ssd1 veže, a većina kodira za hidrolitičke enzime uključene u održavanje stabilnosti stanične stijenke, njezinu izgradnju ili remodeliranje septuma. U te proteine uključene su primarno glukanaze, ali još i hitinaze i drugi proteini stanične stijenke. Nedostatak ovih proteina dovodi do stvaranja neuobičajeno čvrste stijenke, pa sukladno tomu, suprimiranje ekspresije gena koji kodiraju za ove proteine dovodi do povećane otpornosti stijenke na enzimatsku razgradnju (Mouassite i sur., 2000; Yin i sur., 2005; Hogan i sur., 2008).

Gen koji kodira za ovaj protein je polimorfan kod različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae* s dvije česte genetičke varijante: alel *SSD1-V*, koji kodira za funkcionalni protein od 1251 aminokiseline, te alel *ssd1-d* u kojem se zbog preuranjenog STOP kodona sinteza proteina obustavlja na 698. aminokiselini i stoga kodira za protein dug 697 aminokiselina (Sutton i sur., 1991; Jorgensen i sur., 2002). Često korištena laboratorijska linija sojeva BY4741 sadrži alel *SSD1-V*, dok linija sojeva W303 i linije sojeva izvedene iz nje sadrže alel *ssd1-d* (Jorgensen i sur. 2002). Pokazano je da prisutnost alela *ssd1-d* ima pleiotropni učinak koji se iskazuje smanjenom tolerancijom na etanol (Avrahami-Moyal i sur., 2012), povišenu temperaturu (Mir i sur., 2009) i kafein (Parsons i sur., 2004).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i enzimi

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

Agar: Liofilchem (Conyers, SAD)

Adenin, aminokiseline, agaroz, etidij bromid, Calcofluor white, kafein: Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Glukoza: Gram Mol (Zagreb, Hrvatska)

Kvašćev ekstrakt: Biolife (Milano, Italija)

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

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

YNB: Difco (SAD)

Sve ostale kemikalije krutog agregatnog stanja koje su korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od proizvođača Acros Organics, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD), dok su kiseline i alkoholi nabavljeni od proizvođača Lach-Ner (Neratovice, Češka).

3.1.2. Sojevi kvasca

Tablica 1 Popis sojeva kvasca *S. cerevisiae* korištenih u radu

SOJ	GENOTIP	IZVOR
BY4741 divlji tip (wild type, wt)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann i sur., 1998
BY4741 <i>rrp6</i>	BY4741 s <i>rrp6::KanMX4</i>	Novačić i sur., 2021
BMA41 divlji tip (wild type, wt)	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100</i>	Baudin-Baillieu i sur., 1997
BMA41 <i>rrp6</i>	BMA41 s <i>rrp6::KanMX4</i>	Mosrin-Huaman i sur., 2009
<i>DIS3</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 dis3::KanMX4 [pBS3269-DIS3, LEU2]</i>	Stuparevic i sur., 2013
<i>dis3 exo</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 dis3::KanMX4 [pBS3270-dis3D551N, LEU2]</i>	Stuparevic i sur., 2013
W303 <i>SSD1-V</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 SSD1-V</i>	Li i sur., 2009
W303 <i>SSD1-V rrp6</i>	W303 <i>SSD1-V</i> s <i>rrp6::KanMX4</i>	Ovaj rad
W303 <i>ssd1-d</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 ssd1-d</i>	Li i sur., 2009
W303 <i>ssd1-d rrp6</i>	W303 <i>ssd1-d</i> s <i>rrp6::KanMX4</i>	Ovaj rad

3.1.3. Plazmidi

Plazmid korišten u radu pRS416 dio je pRS4xx serije plazmida koji se koriste za ekspresiju gena u *S. cerevisiae*, ali imaju mogućnost replikacije unutar stanice bakterije *Escherichia coli*. Centromerni je plazmid koji nosi *URA3* marker gen i veličine je 4898 parova baza. Plazmid pRS416-*SSD1-V* dodatno nosi funkcionalni gen *SSD1-V* pod regulacijom nativnog promotora (Avrahami-Moyal i sur., 2012).

Tablica 2 Popis plazmida korištenih u radu

PLAZMID	RELEVANTNE REGIJE	IZVOR
pRS416	<i>URA3, CEN6</i>	Christianson i sur., 1992
pRS416- <i>SSD1-V</i>	<i>URA3, CEN6, SSD1-V</i>	Avrahami-Moyal i sur., 2012

3.1.4. Početnice

Tablica 3 Popis početnica korištenih u radu

NAZIV	SEKVENCA	SVRHA
rrp6::Kan	fwd GATAGACGAAATAGGAACAACAAACAGCTT ATAAGCACCCAATAAGTGCGTTCCCGCCA GCGACATGGAGGCCAG	Umnažanje disrupcijske kazete <i>rrp6::KanMX4</i>
	rev GCCCTTGGTCCATTACTATCGCTAGATGAT GGGTCGAATCTCCTTTTCCGAATCGACAG CAGTATAGCGACCAGGCT	
RRP6	fwd CCCAAAAATATGAGGGCATCGG	Provjera delecije gena <i>RRP6</i>
	rev AAAATGGTGTGCATGGGGGA	
RRP6ORF	fwd AATAACCCCAGTCACTACCC	Provjera delecije gena <i>RRP6</i>
	rev ACAACACCGAAAACCTTTCC	

3.1.5. Hranjive podloge

3.1.5.1. Hranjiva podloga za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

Za uzgoj stanica bakterije *Escherichia coli* korištene su kruta i tekuća LB (Luria-Bertani) podloga uz dodatak antibiotika ampicilina. Tekuća LB podloga priprema se dodatkom 10 g/L baktotriptonu, 5 g/L kvašćeva ekstrakta i 5 g/L NaCl. Kruta LB podloga priprema se na isti način uz dodatak 16 g/L agara. Podloge se steriliziraju u autoklavu, te se nakon sterilizacije dodaje antibiotik ampicilin u finalnoj koncentraciji od 100 µg/mL. Kod pripreme krutih podloga ampicilin se dodaje prije izlivanja.

3.1.5.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* korištene su YNB i YPD hranjive podloge.

YNB (Yeast Nitrogen Base) hranjiva podloga

YNB podloge su korištene za test rasta i uzgoj stanica kvasca *S. cerevisiae*, a sastava su: YNB prah 6,7 g/L, smjesa aminokiselina i dušičnih baza (engl. drop-out) 2 g/L, triptofan, uracil i histidin svaki po 80 mg/L, leucin 160 mg/L. U tekuće hranjive podloge nakon sterilizacije autoklaviranjem se dodaje sterilizirana otopina 50% glukoze, a konačna koncentracija u podlozi joj iznosi 20 g/L, odnosno 2%. Za pripremu krute hranjive podloge, prije sterilizacije se dodaje uz glukozu dodaje i agar, čija koncentracija iznosi 16 g/L. U slučaju pripreme YNB -Ura podloge, ne dodaje se uracil u podlogu, a u slučaju pripreme YNB -Ura -Leu, izuzimaju se i uracil i leucin. Za pripremu krute podloge s kafeinom prije sterilizacije dodaje se potrebna masa krutog kafeina (Sigma) za postizanje željene koncentracije, dok se za podlogu s agensom Calcofluor White (CFW) dodaje otopina boje (Sigma, 1 mg/mL) sterilno nakon autoklaviranja za postizanje željene koncentracije.

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) hranjiva podloga

YPD podloge su korištene za uzgoj stanica kvasca prije i nakon transformacije. Sastav im je: pepton 20 g/L, kvašičev ekstrakt 10 g/L i adenin 0.1 g/L. U tekuće hranjive podloge, nakon sterilizacije autoklaviranjem, dodaje se sterilizirana otopina glukoze do finalne koncentracije 20 g/L. U krute hranjive podloge, prije sterilizacije, uz otopinu glukoze dodaje se i agar, koncentracije 16 g/L. Za pripremu YPD podloge s kanamicinom, nakon autoklaviranja se u sterilni medij dodaje aminoglikozidni antibiotik G418 (Geneticin®, Sigma) u finalnoj koncentraciji 200 µg/mL, te se pripremljena podloga koristi za selekciju transformanata.

3.1.6. Puferi

1x TAE pufer: 40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA

Pufer za razbijanje stanica za izolaciju genomske DNA: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl

TE pufer pH 7,5: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

3.2. Metode

3.2.1. Test rasta

Test rasta (engl. Plate assay) je metoda za određivanje vijabilnosti stanica. U radu je korištena za usporedbu rasta različitih mutanata u odnosu na divlje tipove stanica kvasca pri povišenoj temperaturi ili djelovanju različitih agensa koji oštećuju staničnu stijenku.

Za provođenje testa rasta potrebno je uzgojiti stanice kvasca do logaritamske faza rasta u tekućoj podlozi, nakon čega se spektrofotometrijski mjeri gustoća kultura izražena kao OD₆₀₀/mL. Gustoću kulture potrebno je prilagoditi na 1 OD₆₀₀/mL. Ako je gustoća veća od 1 OD₆₀₀/mL, potrebno je suspenziju kvasaca razrijediti, a ako je manja od 1 OD₆₀₀/mL, potrebno ju je centrifugirati pa talog stanica resuspendirati u sterilnoj destiliranoj vodi. Test se provodi s četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja, pri čemu se suspenzija priprema miješanjem 100 µL suspenzije kvasaca s 900 µL sterilne destilirane vode. Na odgovarajuću osušenu krutu podlogu potrebno je nakapati po 10 µL svakog decimalnog razrjeđenja, nakon čega slijedi inkubacija, a ovisno o eksperimentu, provodi se na 30°C i/ili 37°C tijekom 3 dana, nakon čega se podloge slikaju Uvidoc HD6 kamerom.

3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda koja omogućuje brzo i učinkovito umnažanje određenog fragmenta DNA molekule u *in vitro* uvjetima, čime se osigurava dovoljna količina DNA produkta za daljnje istraživanje. U ovom radu korištena je u svrhu sinteze disrupcijske kazete *rrp6::KanMX* i za genotipizaciju mutanata *rrp6*.

Reakcijska smjesa za PCR od 50 µL sadrži: 1 µL genomske DNA odgovarajućeg soja kvasca, 1 µL 10 mM otopine svakog od 4 dNTP-a, 2.5 µL 10 µM otopine svake od početnica *forward* (fwd) i *reverse* (rev), 1 µL Taq polimeraze, 5 µL 10x Taq reakcijskog pufera i 37 µL sterilne vode. Reakcija se odvija prema programu: 4' 95°C // 30x (30" 95°C/ 30" 59°C/ 1'/kb produkta 72°C) // 7' 72°C.

3.2.3. Gel elektroforeza DNA

Gel elektroforeza DNA je analitička metoda koja se zasniva na putovanju fragmenta DNA neto negativnog naboja u puferu prema pozitivnoj elektrodi (katodi) kroz agarozni gel. Metoda se

bazira na razdvajanju molekula DNA po veličini, pri čemu će veći linearni fragmenti putovati kroz gel sporije, a manji brže.

U radu je korištena horizontalna elektroforeza DNA u 0,8% agaroznom gelu pripremljenom otapanjem određene mase agaroze u 1x TAE puferu do vrenja, nakon čega se gel hladi i izlijeva u kalup s češljicom. Uzorci za elektroforezu se pripremaju miješanjem 1 μ L uzorka DNA s odgovarajućim volumenom 1x TAE pufera i bojom za elektroforezu (6x koncentriranom), tako da konačni volumen boje iznosi 1/6 ukupnog volumena smjese. Uzorci s bojom i puferom se injektiraju u jažice gela uronjenog u TAE pufer u kadici za elektroforezu. Nakon elektroforeze pri 90 V gel se namače u otopiti etidijevog bromida 15 minuta. DNA u gelu je slikana Uvidoc HD6 kamerom uz UV svjetlo.

3.2.4. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija genomske DNA izmjerena je uz fluorimetar „Qubit 3,0“ i set kemikalija dsDNA Broad Range Assay Kit prema uputama proizvođača (Invitrogen, Life Technologies).

3.2.5. Izolacija i taloženje genomske DNA kvasca

Kvasac je potrebno uzgojiti u 10 mL podloge do stacionarne faze rasta, nakon čega se cijeli volumen centrifugira 5 minuta na 3000 o/min. Supernatant se uklanja i talog se resuspendira u 1 mL sterilne destilirane vode, nakon čega se prenosi u sterilnu Eppendorfovnu epruvetu. Suspenzija se centrifugira 1 minutu na 8000 o/min, te se nastali talog resuspendira u 200 μ L pufera za razbijanje stanica, čemu dodajemo 300 μ l staklenih kuglica. U digestoru je potrebno dodati 200 μ l otopine fenol/kloroform (1:1), te vorteksirati 4 minute, nakon čega se dodaje 200 μ l TE pufera i centrifugira 5 min na 13000 o/min. Gornja vodena faza s DNA se izdvaja i pretaloži dodatkom 1 mL (2,5x vol) hladnog apsolutnog EtOH, te se inkubira barem 15 min na -20°C. DNA se pretaloži centrifugiranjem 10 minuta pri 11000 o/min. Supernatant se odbacuje, te se talog ispire s 0.5 mL 70% hladnog etanola, nakon čega slijedi ponovno centrifugiranje 2 minute pri 11000 o/min. Supernatant se ponovno odbacuje i talog DNA se otapa u 400 μ l TE pufera te se dodaje 5 μ l RNaze A (5 mg/ml) i inkubira 30 min na 37 °C.

Dobivenoj otopini DNA se doda 1/25 vol. 5 M NaCl, konačne koncentracije 0,2 M i 2,5x volumena hladnog apsolutnog EtOH, te se naglo pomiješa okretanjem Eppendorfove epruvete, te se inkubira na -20 °C barem 15 minuta. Suspenzija se centrifugira (10'/11000 o/min) pri +4°C,

supernatant odbacuje, a talog ispire s 0.5 ml 70%-tnog hladnog etanola. Nakon centrifugiranja (2'/11000 rpm) pri +4°C ponovno se odbacuje supernatant. Talog se suši na zraku 15 minuta uz plamen otvorenog plamenika, te otapa u 500 µL TE pufera u termobloku pri 45°C uz povremeno protresanje.

3.2.6. Izolacija plazmida iz stanica *E. coli*

Iz kulture stanice *E. coli* koje nose željeni plazmid se izoliraju plazmidi koristeći set „Plasmid DNA purification NucleoSpin® Plasmid“ (Macherey-Nagel) prema uputama proizvođača.

3.2.7. Transformacija kvasca *S. cerevisiae* LiAc metodom

Za provođenje transformacije potrebno je kvasac uzgojiti do logaritamske faze rasta, te izdvojiti 5 OD jedinica stanica centrifugiranjem 5 min na 3000 o/min. Supernatant se ukloni, te se provodi još jedno ispiranje sterilnom destiliranom vodom, a zatim s 0,7 mL 0,1 M litijevog acetata. Na talog stanica dodaju se, sljedećim redom, 240 µL 50%-tnog PEG-a, 36 µL 1 M LiAc, 25 µL jednolančane DNA („DNA carrier“), te ukupno 50 µL transformirajuće DNA i sterilne destilirane vode. Smjesa se zatim vorteksira do homogenosti i inkubira u termobloku 30 minuta na 30 °C nakon čega slijedi temperaturni šok na 42 °C u trajanju od 20 minuta. Uzorak se zatim centrifugira 15 sekundi na 8000 o/min i supernatant se uklanja. Ako se selekcija temelji na antibiotskoj rezistenciji, potrebno je talog resuspendirati u 3 mL tekuće neselektivne podloge. Nakon inkubacije kvasca na tresilici pri 30 °C tijekom 3 sata stanice kvasca se centrifugiraju 5 minuta na 3000 o/min, resuspendiraju u 100 µL sterilne destilirane vode te se nacijepu na krutu YPD podlogu koja sadrži antibiotik i inkubiraju pri 30 °C do porasta kolonija (3-5 dana).

Ako se selekcija temelji na auktrotrofnoj komplementaciji, nakon toplinskog šoka i centrifugiranja pri 8000 o/min, talog se resuspendira u 1 mL sterilne vode, te se iscrpljivanjem nacijepi 100 µL na odgovarajuću selektivnu podlogu, nakon čega se inkubira pri 30 °C do porasta kolonija (3-5 dana).

3.2.8. Mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom

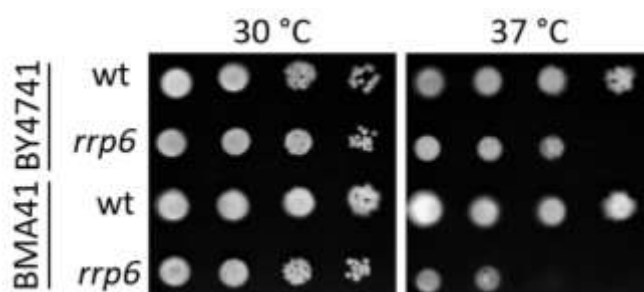
Za mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom korištena je boja Calcofluor White, koja se kao nespecifični fluorokrom veže na molekule hitina stanične stijenke kvasca. Preparat se priprema kapanjem vode na predmetnicu i resuspendiranjem kvasca s podloge ezom, nakon čega se dodaje jednak volume boje Calcofluor White (masene koncentracije 1 mg/mL, Sigma).

Predmetnica se prekriva pokrovnicom i dodaje se kap imerzijskog ulja. Stanice su vizualizirane uz pomoć fluorescentnog optičkog mikroskopa Olympus BX51 pri povećanju 1000x. Budući da su prikladne valne duljine za ekscitaciju boje 300 - 440 nm, korišten je DAPI filtar.

4. REZULTATI I RASPRAVA

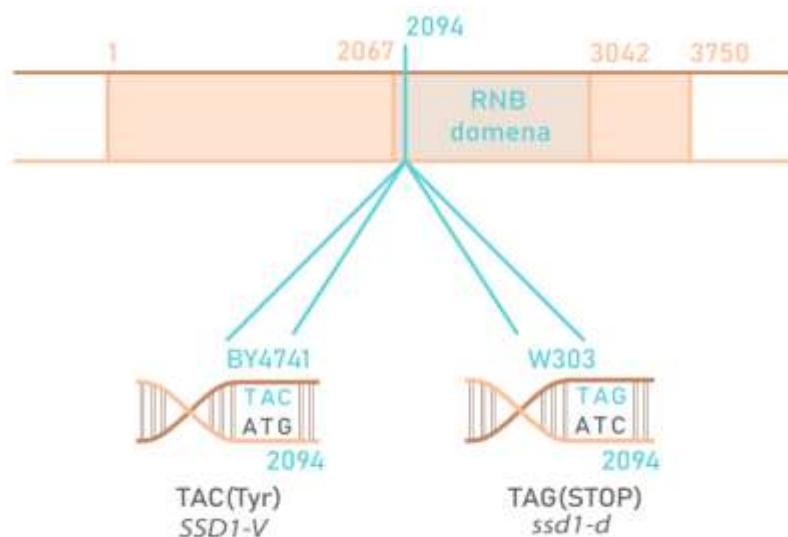
Eukariotski RNA egzozom katalizira 3'-5' procesiranje i degradaciju širokog raspona RNA supstrata (Januszyk i Lima, 2014; Kilchert i sur., 2016). U jezgri, Exo10^{Dis3} se asocira s drugom 3'-5' egzozonukleazom Rrp6 (Feigenbutz i sur., 2013). Podjedinica Rrp6 nije esencijalna, međutim mutanti s deletiranim genom *RRP6* pokazuju sporiji rast, temperaturno-osjetljivi fenotip i defekte u procesiranju RNA molekula (Briggs i sur., 1998; Allmang i sur., 1999.).

Nedavno je pokazano da je temperaturno-osjetljivi fenotip mutanta *rrp6* povezan s kompromitiranom stabilnosti stanične stijenke, zbog čega se defekt u rastu ovog mutanta pri povišenoj temperaturi može u potpunosti suprimirati dodatkom osmotskog stabilizatora (Novačić i sur., 2021). Stanice mutanata kod kojih nije prisutan protein Rrp6 (*rrp6*) ili je inaktivna egzozonukleazna domena proteina Dis3 (*dis3 exo*) su osjetljive na agense koji oštećuju stijenku te ne mogu rasti pri povišenoj temperaturi, budući da zbog oslabljene stanične stijenke dolazi do lize stanica (Novačić i sur., 2021). Pokazano je da je takav fenotip posljedica u promjeni ekspresije gena koji kodiraju za proteine uključene u proces glikozilacije proteina, koji je bitan za održavanje stabilnosti stanične stijenke (Novačić i sur., 2021). Međutim, primijećeno je da je temperaturna osjetljivost mutanta *rrp6* različito izražena u različitim linijama sojeva. Sukladno tome, kada uspoređujemo rast mutanta *rrp6* iz linije sojeva BMA41, izvedene iz linije sojeva W303, te odgovarajućeg soja divljeg tipa, s rastom ekvivalentnih sojeva iz linije sojeva BY4741, temperaturno-osjetljivi fenotip mutanta *rrp6* je bitno naglašeniji kod linije sojeva BMA41 (Slika 5)



Slika 5 Vijabilnost stanica kvasca linija sojeva BY4741 i BMA41 (W303) za stanice divljeg tipa i mutanta *rrp6* pri povišenoj temperaturi, analizirana testom rasta.

Kada je utvrđeno da je za temperaturnu osjetljivost mutanta *rrp6* odgovorna destabilizacija stanične stijenke, postavljena je hipoteza da je za razliku u jačini temperaturno-osjetljivog fenotipa mutanata *rrp6* različitih linija sojeva odgovorna određena mutacija, odnosno razlika u genotipu koja je također povezana sa stabilnošću stanične stijenke. Za povećanu temperaturnu osjetljivost mutanata *rrp6* linije sojeva BMA41 u usporedbi s BY4741 kao potencijalni uzrok razlike u jačini fenotipa je izdvojena mutacija u genu *SSD1*, koji kodira za protein Ssd1. Ovaj gen je polimorfan u različitim linijama sojeva kvasca *S. cerevisiae*, te se u BY4741 javlja kao varijanta *SSD1-V* koja kodira za funkcionalan protein, dok se u liniji sojeva W303 i onim izvedenim iz nje, poput BMA41, javlja kao varijanta *ssd1-d* kod koje se uslijed C→G mutacije na 2094. nukleotidu javlja preuranjeni STOP kodon, što vodi do obustave sinteze proteina Ssd1 prije RNB domene, a nastali protein je nefunkcionalan (Slika 6) (Sutton i sur., 1991; Jorgensen i sur., 2002).



Slika 6 Prikaz alela gena *SSD1* u različitim linijama sojeva kvasca *S. cerevisiae*

Ssd1 je mRNA-vezujući protein koji stupa u interakciju s molekulama mRNA koje kodiraju za proteine bitne za održavanje stabilnosti stanične stijenke i njezino remodeliranje, a uključuju hitinaze, glukanaze i proteine stanične stijenke (Wanless i sur., 2014; Mouassite i sur., 2000). Uloga proteina Ssd1 je da mRNA molekule pohrani u P-tjelešca, gdje se reprimira njihova translacija (Kurischko i sur., 2017). Stanice kvasca s inaktivnim Ssd1 imaju smanjenju toleranciju na etanol (Avrahami – Moyal i sur., 2012), povišenu temperaturu (Mir i sur., 2009) i kafein (Parsons i sur., 2004). Sukladno tome, protein Ssd1 ima bitnu ulogu u održavanju stabilnosti stanične stijenke.

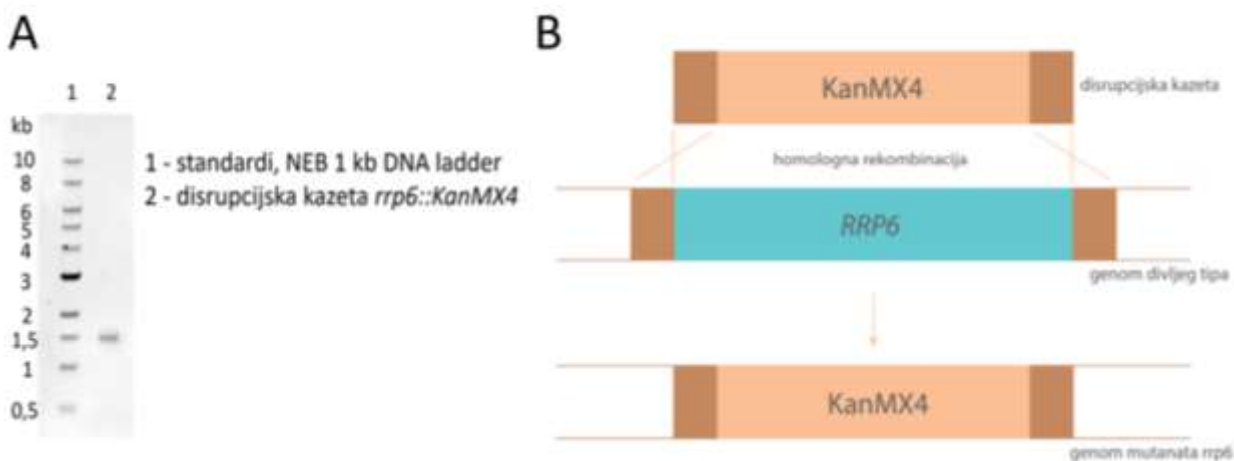
Cilj ovog rada bio je ispitati je li mutacija *ssd1-d* uzrok povećane destabilizacije stanične stijenke mutanta *rrp6* u liniji sojeva BMA41 (W303), odnosno dobiti uvid u međudjelovanje proteina Rrp6 i Ssd1 pri održavanju stabilnosti stanične stijenke kvasca.

4.1. Konstrukcija i genotipizacija mutanata *rrp6* sojeva W303

SSD1-V i W303 *ssd1-d*

Kako bi se provjerilo ima li prisutnost mutacije *ssd1-d* utjecaj na jačinu temperaturno-osjetljivog fenotipa mutanta *rrp6*, bilo je potrebno uvesti mutaciju *rrp6* u izogene sojeve iz W303 koji se razlikuju samo po varijanti alela *SSD1-V* ili *ssd1-d* na genomskom lokusu *SSD1*. Za konstrukciju mutanata *rrp6* korištena je disrupcijska kazeta *rrp6::KanMX4* koja se ugrađuje u genom kvasca *S. cerevisiae* homolognom rekombinacijom. Disrupcijsku kazetu je bilo potrebno najprije umnožiti PCR metodom, čija se uspješnost provjerava DNA gel elektroforezom. Za PCR reakciju je kao kalup korištena genomna DNA izolirana iz stanica mutanta BMA41 *rrp6*, uz odgovarajući par početnica koje se hibridiziraju uzvodno i nizvodno od lokusa *rrp6*, pri čemu dolazi do umnažanja fragmenta DNA koji sadrži marker gen KanMX4 omeđen sekvencama homolognima s genomom kvasca. Rezultati DNA gel elektroforeze pokazuju da je sintetizirani fragment DNA očekivane veličine od 1478 parova bara, odnosno da je disrupcijska kazeta uspješno umnožena (Slika 7A).

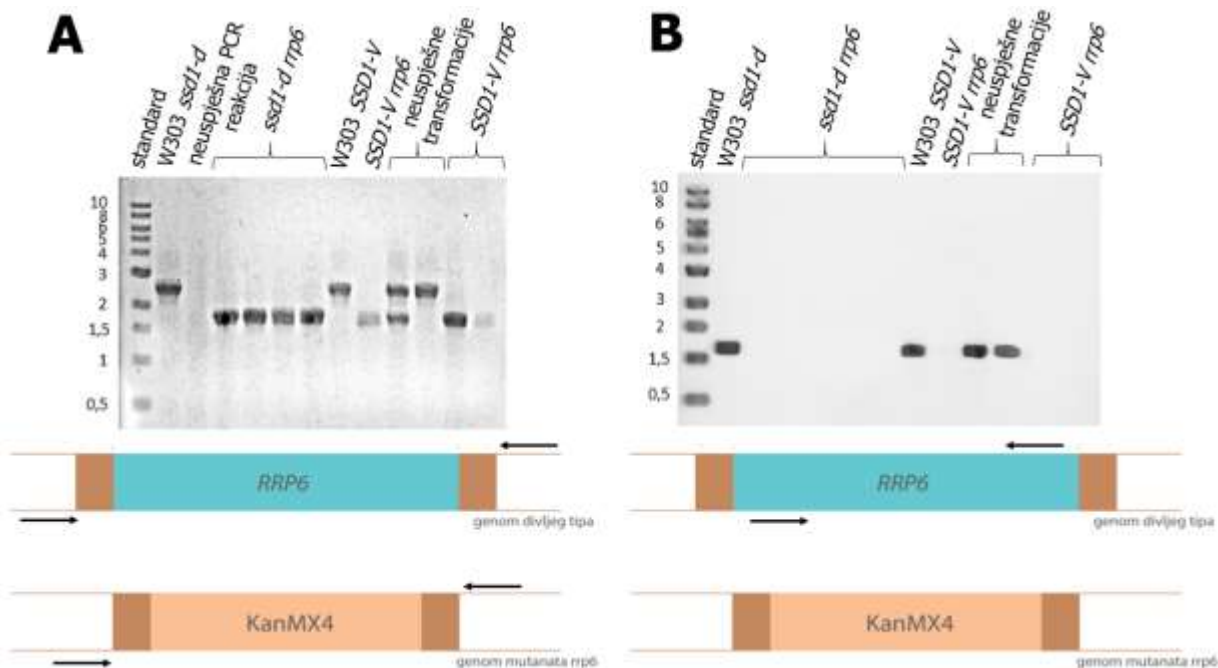
Homologna rekombinacija je izmjena genetičke informacije između homolognih, odnosno identičnih ili vrlo sličnih sekvenci DNA. Budući da disrupcijska kazeta *rrp6::KanMX4* sadrži krajeve homologne sekvencama koje se u genomu kvasca nalaze neposredno prije i nakon otvorenog okvira čitanja (engl. Open reading frame, ORF) gena *RRP6*, ugrađuje se u taj dio genoma i dovodi do zamjene gena *RRP6* marker genom KanMX4. Dakle, kod ishodnih sojeva (npr. divljeg tipa kvasca) ovaj lokus kodirat će za funkcionalan protein Rrp6, dok će kod mutanata *rrp6* sadržavati gen odgovoran za rezistenciju na antibiotik kanamicin, na temelju čega će se vršiti selekcije uspješno transformiranih stanica. ORF gena KanMX4 kraći je u odnosu na ORF gena *RRP6* (Slika 7B).



Slika 7 (A) DNA gel elektroforeza za provjeru uspješnosti sinteze fragmenta DNA vršene PCR metodom. U usporedbi sa standardima, disrupcijska kazeta *rrp6::KanMX4* je očekivane veličine od 1478 parova baza. (B) Shema ugrađivanja disrupcijske kazete *rrp6::KanMX4* u genom divljeg tipa kvasca *S. cerevisiae*, pri čemu dolazi do zamjene gena *RRP6* marker genom KanMX4

Selekcija transformanata se vrši na YPD hranjivoj s dodatkom 200 µg/mL kanamicina. Kako bi se potvrdila uspješnost delecije gena *RRP6*, odnosno ispravne ugradnje disrupcijske kazete, potrebno je provesti genotipizaciju poraslih kolonija. Genotipizaciji prethodi izolacija genomske DNA iz ishodnih sojeva i konstruiranih mutanata kvasca, nakon čega se izolirana DNA umnaža PCR metodom uz odgovarajuće parove početnica zahvaljujući kojima će doći do umnažanja fragmenata različitih duljina ovisno o genotipu stanice, a nastali PCR produkti se analiziraju DNA gel elektroforezom. Korištena su dva seta početnica u svrhu potvrđivanja uspješnosti konstrukcije mutanata *rrp6* (Slika 8). Set početnica korišten u prvoj genotipizaciji se veže uzvodno i nizvodno od lokusa *RRP6*, zbog čega će tijekom odvijanja PCR reakcije biti umnoženi fragmenti DNA koji sadrže sekvencu gena *RRP6*, odnosno KanMX4. Za produkt umnožen iz genomske DNA divljeg tipa očekivana veličina produkta je 2434 pb, dok je za mutanta *rrp6* 1716 pb, što odgovara rezultatima dobivenima za određene kolonije transformanata (Slika 8A). U drugoj genotipizaciji korišten je set početnica koje se hibridiziraju unutar ORF-a gena *RRP6*, što će dovesti do umnažanja PCR produkta od 1138 pb s genomskom DNA ishodnih sojeva te sojeva kod kojih nije uspješno deletiran gen *RRP6*. S genomskom DNA uspješno konstruiranih mutanata *rrp6* neće doći do umnažanja PCR produkta s obzirom na to da se početnice ne mogu vezati unutar ORF-a gena *RRP6* jer je isti zamijenjen genom KanMX4 (Slika 8B). Na temelju

rezultata obje genotipizacije, potvrđena je uspješna delecija gena *RRP6* u stanicama mutanata W303 *ssd1-d rrp6* (kolonije 2-5) i W303 *SSD1-V rrp6* (kolonije 1, 4 i 5) (Slika 8).

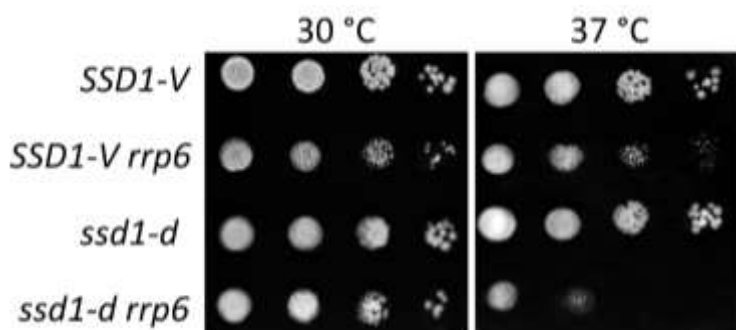


Slika 8 Genotipizacija DNA mutanata *rrp6* vršena je PCR metodom s dva seta početnica (A i B), a provjera uspješnosti umnažanja produkata odgovarajućih veličina se vršila DNA gel elektroforezom u usporedbi sa standardima. Označene su jažice sa standardima, produktima umnoženima iz genomske DNA ishodnih sojeva W303 *SSD1-V* i W303 *ssd1-d*, te uspješne i neuspješne konstrukcije mutanata. Mjesta hibridizacije početnica naznačena su crnim strelicama.

4.2. Ispitivanje utjecaja povišene temperature i agenasa koji oštećuju staničnu stijenku na stanice sojeva W303 *SSD1-V rrp6* i W303 *ssd1-d rrp6*

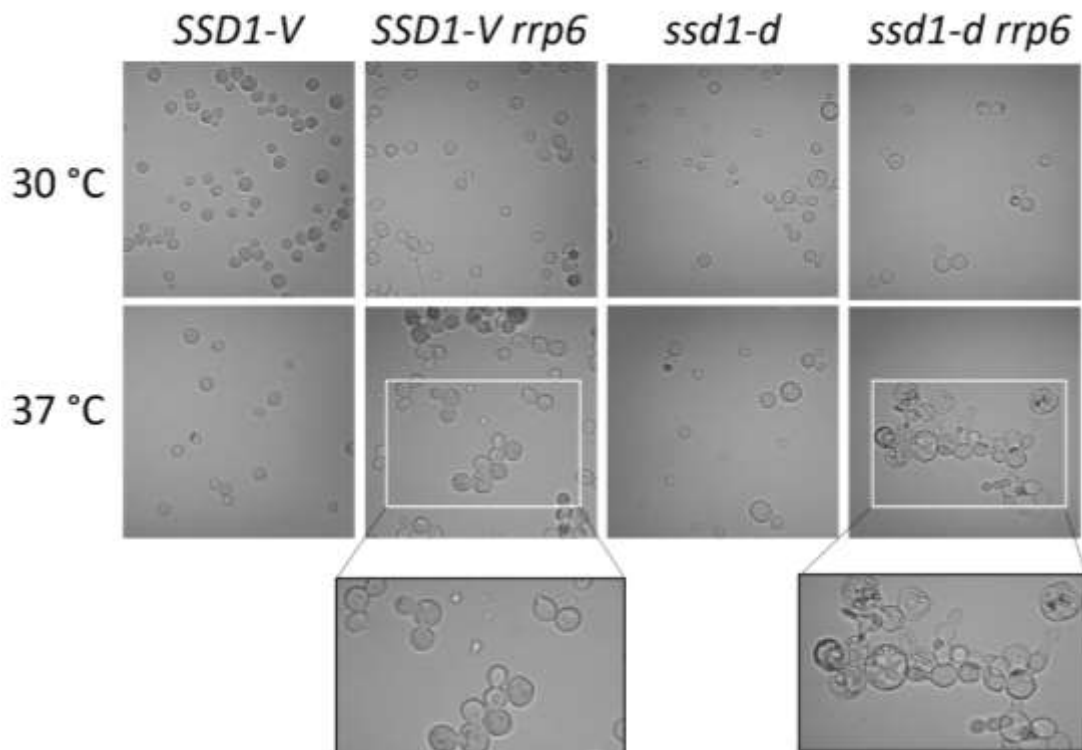
Kako bi se utvrdilo je li za temperaturno-osjetljiviji fenotip mutanta *rrp6* kod linije sojeva W303 odgovoran nefunkcionalni alel *ssd1-d*, proveden je test rasta, odnosno ispitana je vijabilnost stanica kvasca uzgojenih pod utjecajem povišene temperature. Testom rasta se omogućuje usporedba rasta stanica uzgojenih u fiziološkim uvjetima u odnosu na one u stresnim uvjetima, u ovom slučaju temperaturi od 37 °C. Na YNB podlogama uspoređen je rast stanica kvasca *S. cerevisiae* divljeg tipa iz linije sojeva W303 (*ssd1-d*), izogenog soja W303 koji nosi funkcionalan

gen *SSD1-V*, te prethodno konstruiranih ekvivalentnih mutanata *rrp6*. Kao kontrola isti sojevi su rasli na YNB podlozi pri 30 °C. Nakon 3 dana rasta pri 30 °C nije uočena razlika u rastu stanica među sojevima (Slika 9). Kao što je i očekivano, sojevi W303 *SSD1-V* i W303 *ssd1-d* uspješno su porasli i pri povišenoj temperaturi. Međutim, pri 37 °C može se uočiti da mutanti *rrp6* s obje inačice alela *SSD1* pokazuju slabiji rast (Slika 9). Bitno je istaknuti da jačina temperaturno-osjetljivog fenotipa mutanta *rrp6* soja W303 uistinu ovisi o funkcionalnosti alela *SSD1* - u usporedbi s mutantom *rrp6* koji nosi funkcionalnu varijantu *SSD1-V*, dvostruki mutant *ssd1-d rrp6* pokazuje puno jaču temperaturnu osjetljivost (Slika 9).



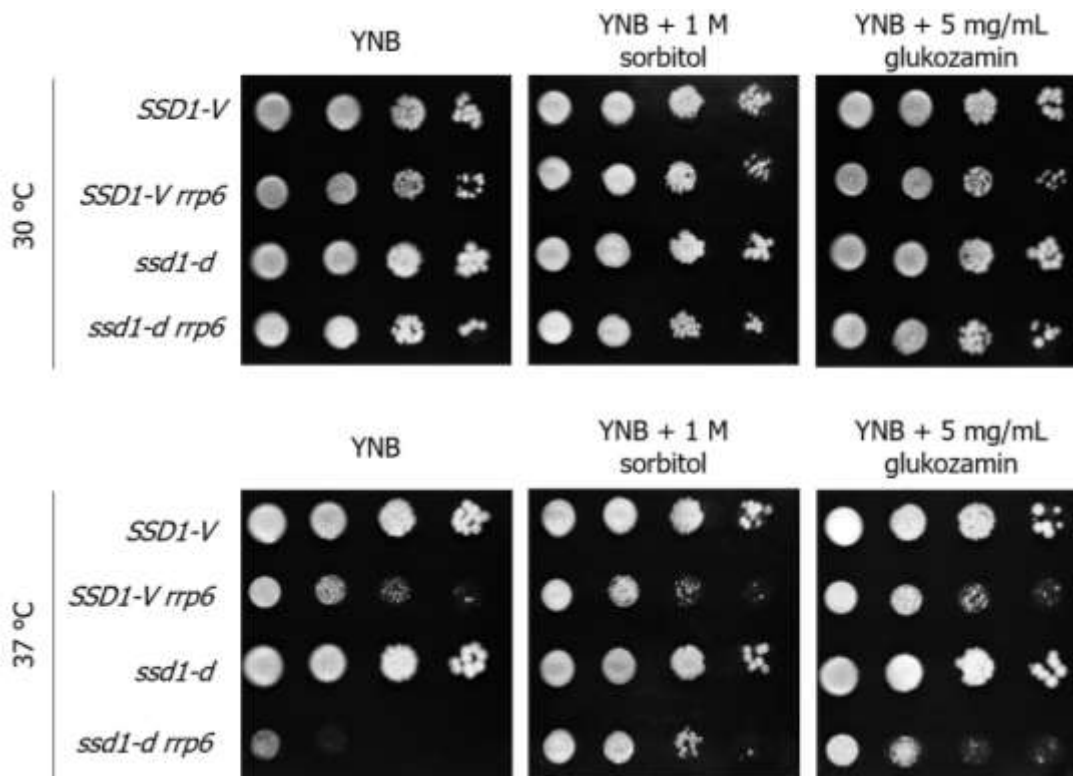
Slika 9 Vijabilnost stanica kvasca ispitana testom rasta. Stanice kvasca su uzgojene u tekućoj YNB podlozi do koncentracije od 1 OD₆₀₀/mL te su četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja nacijepljena na krutu YNB podlogu i ostavljena na rast 3 dana pri 30 °C i 37 °C.

Ispitivanjem morfologije stanica mikroskopiranjem svjetlosnim mikroskopom vidljivo je da su stanice dvostrukog mutanta *ssd1-d rrp6* nepravilnog oblika, povećanih dimenzija i pokazuju defekte u dijeljenju stanica u odnosu na one divljeg tipa. Ovi efekti su izraženi pri 37 °C, ali pri istim uvjetima prisutnost aktivnog alela *SSD1-V* uzrokuje značajno poboljšanje u morfologiji stanica mutanta *rrp6*, odnosno stanice tog mutanta su normalne veličine, a problemi u segregaciji su manje izraženi (Slika 10).



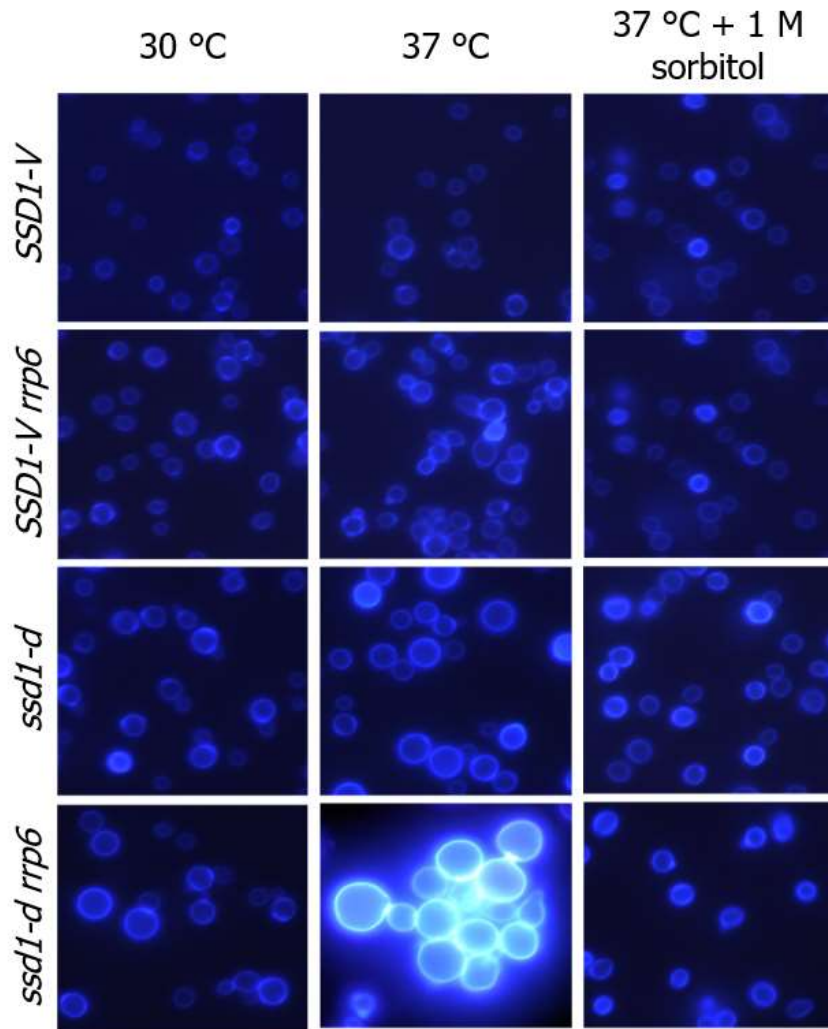
Slika 10 Morfologija stanica kvasca ispitana je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa, a vizualizirana je Dino-Lite digitalnom kamerom pri povećanju 400x.

Prethodno je pokazano da se dodatkom osmotskog stabilizatora sorbitola u 1 M koncentraciji u hranjivu podlogu može suprimirati temperaturna osjetljivost mutanata *rrp6* pri 37 °C (Novačić i sur., 2021). Pri 30 °C, neovisno o korištenoj podlozi, stanice svih ispitanih sojeva kvasca rastu pri svim decimalnim razrjeđenjima (Slika 11). Ako se uspoređuje rast stanica kvasca pri 37 °C na YNB podlozi bez i s dodatkom sorbitola, jasno se vidi da dodatak osmotskog stabilizatora u potpunosti suprimira temperaturno-osjetljivi fenotip i omogućuje rast stanica mutanata *rrp6* (Slika 11). S obzirom na to da je temperaturna osjetljivost mutanata *rrp6* povezana s nestabilnošću stanične stijenke, ispitan je i utjecaj dodatka glukozamina u hranjivu podlogu na njihov rast pri 37 °C. Glukozamin je prekursor hitina, komponente unutarnjeg sloja stanične stijenke s bitnom ulogom u pupanju stanica kvasca (Klis i sur., 2006). Dodatak glukozamina u koncentraciji od 5 mg/mL daje rezultate slične onima koje daje dodatak sorbitola kao osmotskog stabilizatora, što potvrđuje da je za temperaturnu osjetljivost mutanata *rrp6* odgovorna narušena stabilnost stanične stijenke i da kod ovih stanica dolazi do defekta u biosintezi hitina ili njegovoj lokalizaciji u stijenci (Slika 11).



Slika 11 Vijabilnost stanica kvasca ispitana testom rasta. Stanice kvasca su uzgojene u tekućoj YNB podlozi do koncentracije od 1 OD₆₀₀/mL te su četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja naciepljena na krutu YNB podlogu. U krutu podlogu je dodan 1 M sorbitol ili 5 mg/mL glukozamin. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta.

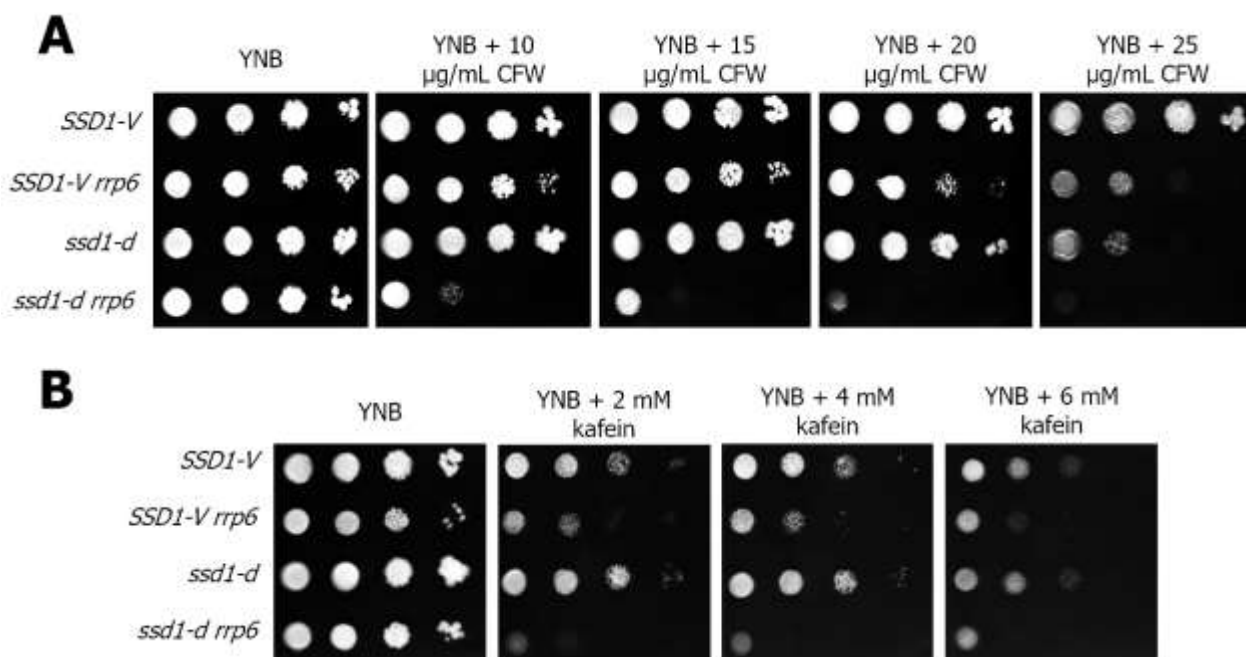
Dodatak sorbitola kao osmotskog stabilizatora, osim što utječe na rast mutanata *rrp6* pri 37 °C, također utječe i na morfologiju istih. Stanice kvasca su vizualizirane fluorescentnim mikroskopom, pri čemu je korištena boja Calcofluor White, koja se veže na hitin stanične stijenke kvasca (Rasconi i sur., 2009). Mutanti *SSD1-V rrp6* pokazuju defekte u segregaciji stanica, ali su stanice normalne veličine i okruglog oblika. Dodatkom 1 M sorbitola je taj defekt u potpunosti suprimiran (Slika 12). Dvostruki mutant *ssd1-d rrp6* pri 37 °C pokazuje jako obojenje, što ukazuje na defekte u odvajanju stanica na septumu, a stanice su značajno uvećane i nepravilnog oblika. Sorbitol u potpunosti suprimira aberantni fenotip ovih stanica, one postaju simetričnog oblika i normalne veličine, te nakupine stanica nisu prisutne (Slika 12).



Slika 12 Morfologija stanica kvasca *S. cerevisiae*. Stanice su uzgajane na odgovarajućoj hranjivoj podlozi, te je nakon 3 dana uzgoja pripremljen mikroskopski preparat. Stanice su obojene bojom Calcofluor White i vizualizirane fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51 uz DAPI filtar.

Budući da je utvrđeno da je kod mutanta *rrp6* kompromitirana stabilnost stanične stijenke, ispitan je utjecaj re-aktivacije gena *SSD1-V* na vijabilnost i morfologiju mutanta *rrp6* pri djelovanju agensa koji oštećuju staničnu stijenku: boje Calcofluor White i kafeina. Calcofluor White je fluorokromna boja koja pokazuje antifungalnu aktivnost, odnosno negativno utječe na rast stanica kvasca budući da se veže na hitin, što dovodi do destabilizacije stanične stijenke (Roncero i sur., 1988). Kafein je agens koji ima pleiotropni učinak na stanice kvasca uzrokujući promjene u morfologiji stanica i sporiji rast (Kuranda i sur., 2006). Vijabilnost stanica je ispitana pri temperaturi od 30 °C, a u hranjive podloge su dodane određene koncentracije agensa Calcofluor White, odnosno kafeina. Može se uočiti da vijabilnost stanica dvostrukog mutanta *ssd1-d rrp6* pri

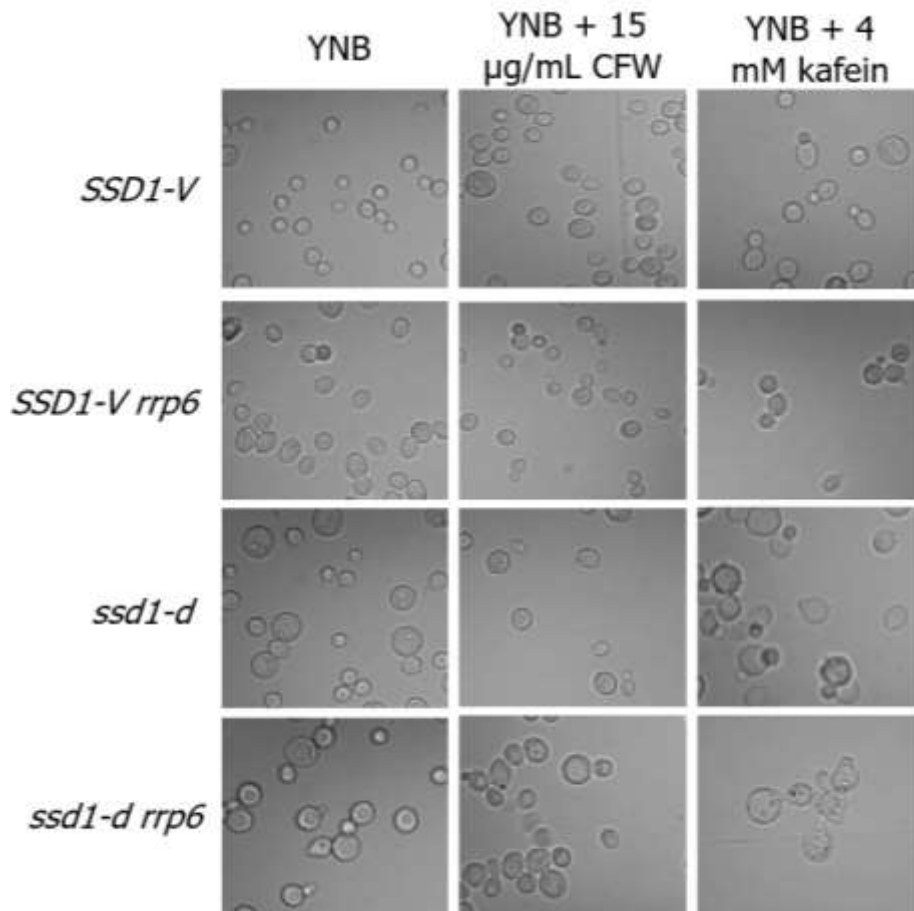
izlaganju ovim agensima značajno smanjena u odnosu na stanice mutanta *rrp6* koje nose aktivan alel *SSD1-V* (Slika 13). Stanice iz soja W303 *SSD1-V* rastu pri svim ispitanim koncentracijama CFW, dok stanice kvasca W303 *ssd1-d* ne mogu rasti pri svim decimalnim razrjeđenjima pri koncentraciji CFW od 25 $\mu\text{g/mL}$, što je i očekivano s obzirom na nedostatak funkcije proteina Ssd1 (Slika 13A). Sličan učinak je primijećen i kada je u hranjivoj podlozi prisutan kafein. Stanice sojeva W303 *SSD1-V* i W303 *ssd1-d* pokazuju bolji rast u odnosu na mutante *rrp6*, ali su problemi u rastu posebice prisutni kod dvostrukog mutanta *ssd1-d rrp6* (Slika 13B). Pojačana osjetljivost dvostrukog mutanta na agense stanične stijenke, u odnosu na stanice odgovarajućih jednostrukih mutanata, upućuje na to da Ssd1 i Rrp6 djeluju sinergistički pri održavanju integriteta stanične stijenke, što je tipično za proteine koji imaju uloge u paralelnim putevima.



Slika 13 Vijabilnost stanica kvasca ispitana testom rasta. Stanice kvasca su uzgojene u tekućoj YNB podlozi do koncentracije od 1 $\text{OD}_{600}/\text{mL}$ te su četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja nacijepljena na krutu YNB podlogu. U krutu podlogu je dodan CFW ili kafein u odgovarajućim koncentracijama. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta.

Mikroskopiranjem stanica kvasca nakon izlaganja djelovanju agensa koji oštećuju staničnu stijenk, može se uočiti da stanice pokazuju ekvivalentne defekte u morfologiji koji se pojavljuju i pri djelovanju povišene temperature. Kod dvostrukog mutanta *ssd1-d rrp6* izloženog 15 $\mu\text{g/mL}$ CFW se pojavljuju nakupine stanica kvasca koje upućuju na probleme u segregaciji. Ovaj učinak

je suprimiran prisutnošću aktivnog alela *SSD1-V* (Slika 14). Dodavanje kafeina u podlogu također je dovelo do toga da stanice dvostrukog mutanta *ssd1-d rrp6* imaju povećani volumen i nepravilne oblike te rastu u nakupinama. Međutim, uz inačicu alela *SSD1-V*, mutanti *rrp6* zadržavaju normalan oblik, ali su defekti u odvajanju stanica i dalje prisutni. Vidljivo je da su stanice kvasca osjetljivije na djelovanje ovih agensa kada nose alel *ssd1-d* (Slika 14).



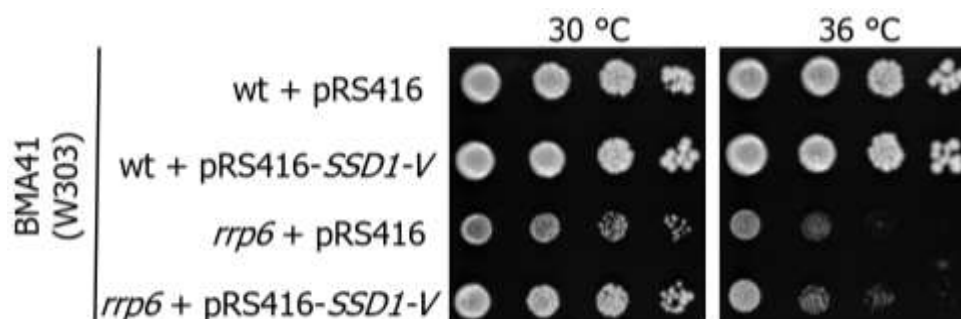
Slika 14 Morfologija stanica kvasca pri djelovanju agensa stanične stijenke ispitana je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa, a vizualizirana je Dino-Lite digitalnom kamerom pri povećanju 400x.

4.3. Ispitivanje utjecaja povišene temperature na stanice mutanata za katalitičke podjedinice RNA egzosoma transformirane plazmidima koji nose alel *SSD1-V*

Prethodnim eksperimentima potvrđeno je da je za veću temperaturnu osjetljivost mutanata *rrp6* soja W303, u odnosu na BY4741, zaista odgovorna mutacija u genu *SSD1*. U

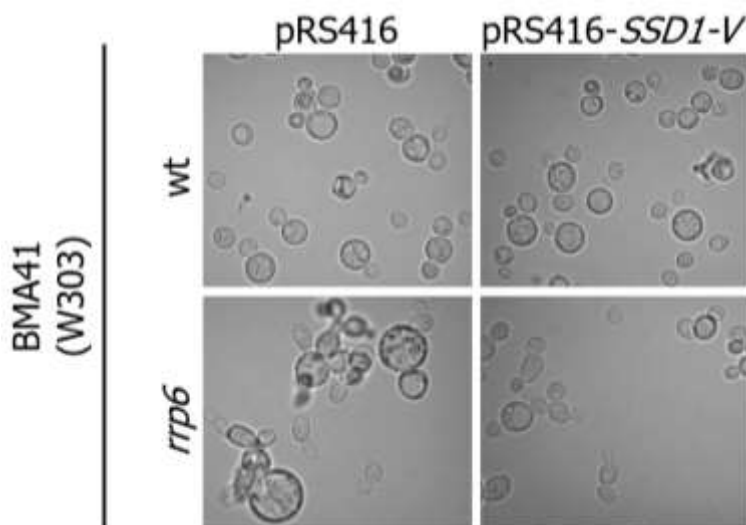
idućim eksperimentima je sa stanicama divljeg tipa (wt, wild type) i mutanta *rrp6* soja BMA41 (W303, *ssd1-d*) ispitan utjecaj uvođenja centromernog plazmida pRS416-*SSD1-V*, koji nosi aktivnu inačicu alela *SSD1-V*. Ispitano je hoće li ekspresija *SSD1-V*s plazmida pokazati isti učinak na stanice mutanta *rrp6* na razini morfologije i rasta pri povišenoj temperaturi kao ekspresija alela *SSD1-V*s genomskog lokusa. Osim za mutanta *rrp6*, ispitan je utjecaj ekspresije alela *SSD1-V*s plazmida pri uvjetima povišene temperature za katalitičkog mutanta druge egzoribonukleazne podjedinice RNA egzosoma, Dis3. Dis3 je esencijalan protein, pa delecija odgovarajućeg gena *DIS3* nije moguća, no budući da njegova endo- i egzoribonukleazna aktivnost zasebno nisu esencijalne, korišten je mutant *dis3 exo*. Ovaj mutant ima uvedenu točkastu mutaciju *dis3-D511N*, koja dovodi do inaktivacije egzoribonukleazne aktivnosti proteina Dis3. Ovim stanicama je deletiran gen *DIS3* te su preko plazmida uvedene inačice gena *DIS3* (ekvivalent divljem tipu) i *dis3 exo* (Stuparevic i sur., 2013). Plazmidi pRS416 (prazni plazmid) i pRS416-*SSD1-V* su umnoženi u stanicama bakterije *Escherichia coli*, nakon čega su izolirani, te je vršena transformacija litij acetatnom metodom kako bi se plazmidi unijeli u stanice kvasca. Stanice kvasca divljeg tipa i mutanta *rrp6* s plazmidima pRS416 i pRS416-*SSD1-V* uzgajane su na YNB podlozi bez uracila, s obzirom na to da se na plazmidu nalazi marker gen *URA3* u svrhu selekcije stanica s plazmidom. Za uzgoj sojeva *DIS3* i *dis3 exo* je korištena YNB hranjiva podloga bez uracila i leucina. Uracil nije dodan zbog marker gena *URA3* na plazmidima pRS416 i pRS416-*SSD1-V*, a leucin je izostavljen kako bi se osigurala selekcija stanica s plazmidom koji ima i marker gen *LEU2*, a njegova uloga je ekspresija funkcionalne kopije gena *DIS3*, odnosno inačice koja ima mutaciju za egzoribonukleaznu aktivnost proteina Dis3, *dis3 exo*.

Rast ovih stanica ispitan je pri temperaturama od 30 °C i 36 °C. Kod stanica mutanta *rrp6*, uočljivo je da s ekspresijom *SSD1-V* preko plazmida pri 36 °C dolazi do djelomične supresije temperaturno-osjetljivog fenotipa u odnosu na stanice mutanta *rrp6* koje su nosile prazan plazmid pRS416 (Slika 15). Ovaj rezultat je u skladu s prethodnim rezultatima, pri čemu je ekspresija aktivne inačice *SSD1-V*s genoma pokazala sličan učinak za mutanta *ssd1-d rrp6*.



Slika 15 Vijabilnost stanica kvasca ispitana testom rasta. Stanice kvasca su uzgojene u tekućoj YNB -Ura podlozi do koncentracije od 1 OD₆₀₀/mL te su četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja nacijepljena na krutu YNB -Ura podlogu. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta.

Promatranjem fenotipa, za mutant *rrp6* u soju BMA41 (*ssd1-d*) pri 36 °C, kao što je očekivano, vide se agregati stanica asimetričnog oblika i povećanog volumena (Slika 16). Ekspresija gena *SSD1-V* s plazmida za mutante *rrp6* pri povišenoj temperaturi pokazuje ekvivalentan učinak onome kada je *SSD1-V* aktivan u genomu, odnosno aberantni fenotip stanica mutanta *rrp6* suprimiran je prisutnošću plazmida pRS416-*SSD1-V*. U prisutnošću plazmida stanica su pravilnije morfologije s očekivanim defektima u separaciji stanica (Slika 16)

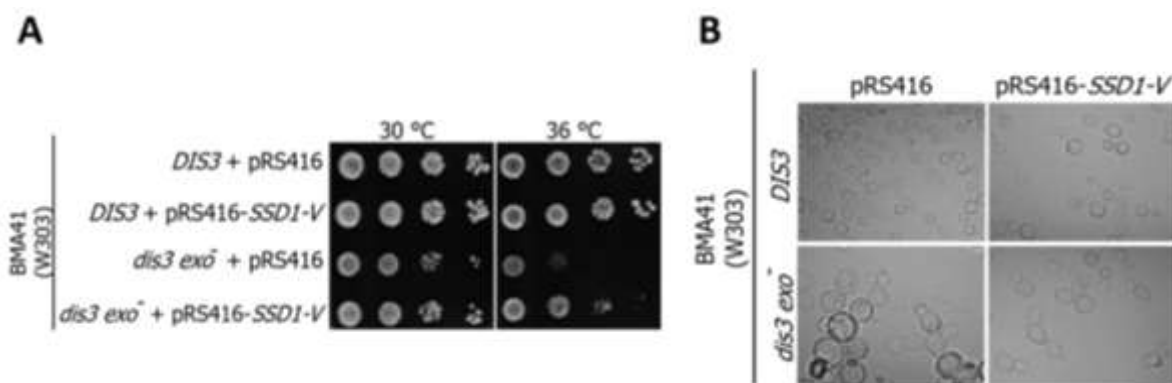


Slika 16 Morfologija stanica kvasca pri 36 °C ispitana je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa, a vizualizirana je Dino-Lite digitalnom kamerom pri povećanju 400x.

S obzirom na to da je potvrđeno da je mutant *dis3 exo* također osjetljiv na agense koji oštećuju staničnu stijenku i povišenu temperaturu, ispitan je i utjecaj centromernog plazmida pRS416-*SSD1-V* na stanice kvasca koje imaju uvedenu točkastu mutaciju u egzoribonukleaznoj

domeni Dis3 zbog koje gube egzoribonukleaznu aktivnost Uočljivo je da ekspresija alela *SSD1-V* s plazmida djelomično suprimira temperaturno-osjetljivi fenotip mutanata *dis3 exo⁻* (Slika 17A), kao i u slučaju mutanta *rrp6*.

Narušavanje integriteta stanične stijenke pri 36 °C za mutante *dis3 exo⁻* uočljivo je i uz pomoć svjetlosnog mikroskopa. Kao posljedica njezine destabilizacije, uslijed inaktivacije egzoribonukleazne aktivnosti Dis3 dolazi do defekata u odjeljivanju pupova, sukladno tomu stvaranja nakupina stanica, povećane propusnosti što vodi do rasta volumena i promjene oblika stanica. Kada se preko plazmida eksprimira alel *SSD1-V*, ovakav fenotip je manje izražen (Slika 17B).



Slika 17 (A) Vijabilnost stanica kvasca ispitana testom rasta. Stanice kvasca su uzgojene u tekućoj YNB - Ura -Leu podlozi do koncentracije od 1 OD₆₀₀/mL te su četiri sukcesivna decimalna razrjeđenja naciepljena na krutu YNB -Ura -Leu podlogu. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta. **(B)** Morfologija stanica kvasca pri 36 °C ispitana je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa, a vizualizirana je Dino-Lite digitalnom kamerom pri povećanju 400x.

Postaje sve jasnije da su regulacija translacije i degradacije mRNA molekula ključni procesi uključeni u održavanje stabilnosti stanične stijenke kvasca (Crawford i Pavitt, 2019). U ovom radu potvrđeno je da je za razliku u temperaturnoj osjetljivosti mutanata katalitičkih podjedinica RNA egzosoma, koja je posljedica narušavanja integriteta stanične stijenke u različitim sojevima odgovorna funkcionalnost mRNA-vezujućeg proteina Ssd1. Naime, u soju BMA41 (W303) uslijed mutacije na lokusu *SSD1* se javlja preuranjeni STOP kodon unutar dijela gena koji kodira za RNB domenu proteina Ssd1, čime se obustavlja njegova sinteza i nastali protein je nefunkcionalan. Iako je Ssd1 evolucijski srodan obitelji proteina Dis3L2, kroz evoluciju je izgubio funkciju degradacije RNA molekula, ali je očuvana mogućnost vezanja mRNA molekula i pohranjivanja u P-tjelešca, u kojima se njihova translacija onemogućava ili odgađa (Decker i Parker, 2012). Obitelj Dis3L2 u svojem sastavu ne sadrži PIN domenu odgovornu za vezanje na jezgru RNA egzosoma,

stoga proteini Dis3L2 djeluju neovisno o tom kompleksu (Lubas i sur., 2013). Fenotipska obilježja stanica dvostrukog mutanta *ssd1-d rrp6* u usporedbi sa stanicama odgovarajućih jednostrukih mutanata upućuju da ova dva proteina djeluju sinergistički pri održavanju stabilnosti stanične stijenke, što je sukladno činjenici da je Ssd1 evolucijski srodan Dis3L2 i da djeluje neovisno o RNA egzozomu (Ballou i sur., 2020).

Prethodno je pokazano da uvođenje funkcionalnog alela gena *SSD1-V* u stanice W303 (*ssd1-d*) omogućuje poboljšani rast i morfologiju stanica mutanata kvasca za druge bitne proteine koji imaju funkciju u održavanju integriteta stanične stijenke i vijabilnosti stanica u stresnim uvjetima. Više je takvih primjera, pa tako *SSD1-V* alel ima mogućnost održavanja vijabilnosti mutanata *sit4*, dok je *ssd1-d* alel u kombinaciji s delecijom gena *SIT4* letalan. Sit4 je protein uključen u puteve organizacije citoskeleta i stanične stijenke (Sutton i sur., 1991). Također, ekspresija alela *SSD1-V* s plazmida je dovoljna za rast pri 37 °C za stanice kvasca W303 koji nemaju funkcionalan protein Bck1, kinazu zaduženu za regulaciju organizacije komponenti stanične stijenke (Costigan i sur., 1992). Sukladno tome, navedena istraživanja i eksperimenti napravljeni u ovom radu ukazuju na bitnu razliku između stabilnosti stanične stijenke često korištenih laboratorijskih sojeva kvasca te time važnost odabira odgovarajuće linije sojeva za istraživanje.

5. ZAKLJUČCI

- 1.** Temperaturno-osjetljivi fenotip mutanta za katalitičke podjedinice RNA egzozoma Dis3 i Rrp6 ovisi o funkcionalnosti alela *SSD1*, te je stoga različito izražen u različitim linijama sojeva kvasca.
- 2.** Funkcionalna inačica alela *SSD1-V* suprimira defekte u rastu i morfologiji mutanata za katalitičke podjedinice RNA egzozoma u soju W303 (*ssd1-d*) koji se javljaju pri povišenoj temperaturi i izlaganju agensima koji oštećuju staničnu stijenku. Do supresije dolazi neovisno eksprimira li se alel *SSD1-V*s odgovarajućeg genomskog lokusa ili s centromernog plazmida.
- 3.** Ssd1 i RNA egzozom djeluju različitim putevima pri održavanju stabilnosti stanične stijenke kvasca, te njihovo međudjelovanje ima sinergistički učinak koji se pokazuje u stresnim uvjetima.

6. LITERATURA

- Allmang C., Petfalski E., Podtelejnikov A., Mann M., Tollervey D., Mitchell P. (1999) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes and Development* **13(16)**: 2148–2158.
- Anwar M.I., Muhammad F., Awais MM (2017) A review of β -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *World's Poultry Science Journal* **73(03)**: 1-11.
- Avrahami-Moyal L., Braun S., Engelberg D. (2012) Overexpression of PDE2 or SSD1-V in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A strain renders it ethanol-tolerant. *FEMS Yeast Research* **12(4)**: 447-455
- Avrahami-Moyal L., Engelberg D., Wenger J. W., Sherlock G., Braun S. (2012) Turbidostat Culture of *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A under Selective Pressure Elicited by Ethanol Selects for Mutations in SSD1 and UTH1. *FEMS Yeast Research* **23(1)**, 1–7.
- Ballou E., Cook A., Wallace E. (2020) Repeated Evolution of Inactive Pseudonucleases in a Fungal Branch of the Dis3/RNase II Family of Nucleases. *Molecular Biology and Evolution* **10.1093**
- Baudin-Baillieu A., Guillemet E., Cullin C., Lacroute F. (1997) Construction of a yeast strain deleted for the TRP1 promoter and coding region that enhances the efficiency of the polymerase chain reaction-disruption method. *Yeast* **13(4)**: 353-356
- Bayne R. A., Jayachandran U., Kasprovicz A., Bresson S., Tollervey D., Wallace E., Cook A. (2020) Yeast Ssd1 is a non-enzymatic member of the RNase II family with an alternative RNA recognition interface. *bioRxiv* **350314**
- 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(3)**: 547-559
- Brachmann C.B., Davies A., Cost G.J., Caputo E., Li J., Hieter P., Boeke J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14(2)**: 115-132
- Briggs M.W., Burkard K.T., Butler J.S. (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 13255–13263
- Brouwer R., Vree Egberts W.T., Hengstman G.J., Raijmakers R., van Engelen B.G., Seelig H.P., Renz M., Mierau R., Genth E., Pruijn G.J. (2002) Autoantibodies directed to novel components of the PM/Scl complex, the human exosome. *Arthritis Research & Therapy* **4(2)**:134-138
- Burgess S.M., Powers T., Mell J.C. (2017) Budding Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* as a Model Genetic Organism. *eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.)*
- Callahan K.P. i Butler J.S. (2010) TRAMP complex enhances RNA degradation by the nuclear exosome component Rrp6. *Journal of Biological Chemistry* **285(6)**: 3540-3547
- Cech, T. R. i Steitz, J. A. (2014). The noncoding RNA revolution - Trashing old rules to forge new ones. *In Cell* **157(1)**: 77-94
- Chen C.Y., Gherzi R., Ong S.E., Chan E.L., Raijmakers R., Pruijn G.J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M., Karin M. (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107(4)**: 451-464
- Chlebowski A., Lubas M., Jensen T. H., Dziembowski A. (2013) RNA decay machines: The exosome. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1829(6-7)**: 552-560
- Christianson T.W., Sikorski R.S., Dante M., Shero J.H., Hieter P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttlevectors. *Gene* **110(1)**: 119-122

- Costigan C., Gehrung S., Snyder M. (1992) A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Molecular and Cellular Biology* **12(3)**: 1162-1178
- Crawford R.A. i Pavitt G.D. (2019) Translational regulation in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **36**: 5-21
- Decker C.J. i Parker R. (2012) P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4(9)**: a012286
- Erkmann J.A. i Kutay U. (2004) Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Experimental Cell Research* **296(1)**: 12-20
- Faehnle C. R., Walleshauser J, Joshua-Tor L. (2014) Mechanism of Dis3l2 substrate recognition in the Lin28-let-7 pathway. *Nature* **514**: 252–256
- Feigenbutz M., Garland W., Turner M., Mitchell P. (2013) The exosome cofactor Rrp47 is critical for the stability and normal expression of its associated exoribonuclease Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one* **8(11)**: e80752
- Fox M.J., Gao H., Smith-Kinnaman W.R., Liu Y., Mosley A.L. (2015) The Exosome Component Rrp6 Is Required for RNA Polymerase II Termination at Specific Targets of the Nrd1-Nab3 Pathway. *PLoS Genetics* **11(2)**: e100499
- 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) Life with 6000 genes. *Science* **274(5287)**: 563-567
- Gow N. A. R., Van De Veerdonk F. L., Brown A. J. P., Netea, M. G. (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology* **10(2)**: 112–122
- Hogan D. J., Riordan D. P., Gerber A. P., Herschlag D., and Brown P. O. (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biology* **6(10)**: e255
- Jansen J. M., Wanless A. G., Seidel C. W., Weiss E. L. (2009) Cbk1 Regulation of the RNA-Binding Protein Ssd1 Integrates Cell Fate with Translational Control. *Current Biology* **19(24)**: 2114–2120
- Januszyk K. i Lima C. D. (2014) The eukaryotic RNA exosome. *Current Opinion in Structural Biology* **24**: 132-140
- Januszyk K., Liu Q., Lima C. D. (2011) Activities of human RRP6 and structure of the human RRP6 catalytic domain. *RNA* **17(8)**: 1566-1577
- Jorgensen P., Nelson B., Robinson M. D., Chen Y., Andrews B., Tyers M., Boone C. (2002) High-resolution genetic mapping with ordered arrays of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants. *Genetics* **162(3)**: 1091–1099.
- Jos J., Ruiz-Herrera J., Victoria Elorza M., Valentín E., Sentandreu R. (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Research* **6**: 14–29
- Kilchert C., Wittmann S., Vasiljeva L. (2016) The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17(4)**: 227–239
- Klis F.M., Boorsma A., De Groot P.W.J. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *In Yeast* **23(3)**: 185-202
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **26(3)**: 239-256

- 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. *Molecular Microbiology* **61(5)**: 1147-1166
- Kurischko C. i Broach J.R. (2017) Phosphorylation and nuclear transit modulate the balance between normal function and terminal aggregation of the yeast RNA-binding protein Ssd1. *Molecular Biology of the Cell* **28(22)**: 3057–3069
- Kurischko C., Kim H. K., Kuravi V. K., Pratzka J., Luca F. C. (2011) The yeast Cbk1 kinase regulates mRNA localization via the mRNA-binding protein Ssd1. *Journal of Cell Biology* **192(4)**: 583–598
- Kurischko C., Kuravi V. K., Herbert C. J., Luca F. C. (2011) Nucleocytoplasmic shuttling of Ssd1 defines the destiny of its bound mRNAs. *Molecular Microbiology* **81(3)**: 831-849
- Lorentzen E., Basquin J, Tomecki R., Dziembowski A., Conti E. (2008) Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Molecular Cell* **29(6)**: 717-728
- Lubas M., Damgaard C. K., Tomecki R., Cysewski D., Jensen T. H., Dziembowski A. (2013) Exonuclease hDIS3L2 specifies an exosome-independent 3'-5' degradation pathway of human cytoplasmic mRNA. *The EMBO journal* **32(13)**: 1855–1868
- Makino D. L., Schuch B., Stegmann E., Baumgartner M., Basquin C., Conti E. (2015) RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* **523(7563)**: 54-58
- Mir S. S., Fiedler D., Cashikar, A. G. (2009) Ssd1 Is Required for Thermotolerance and Hsp104-Mediated Protein Disaggregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **29(1)**: 187-200
- Mosrin-Huaman C., Honorine R., Rahmouni A.R. (2009) Expression of Bacterial Rho Factor in Yeast Identifies New Factors Involved in the Functional Interplay between Transcription and mRNP Biogenesis. *Molecular and cellular biology* **29**: 4033-4044
- Mouassite M., Camougrand N., Schwob E., Demaison G., Laclau M., Guerin M. (2000) The 'SUN' family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation. *Yeast* **16(10)**: 905-919
- Novačić A., Beauvis V., Oskomić M., Štrbac L., Le Dantec A., Rahmouni A.R., Stuparević I. (2021) Yeast RNA exosome activity is necessary for maintaining cell wall stability through proper protein glycosylation. *Molecular Biology of the Cell* **32(5)**: 363-375
- Parker R. i Sheth U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular Cell* **25(9)**: 634-646
- Parsons A. B., Brost R. L., Ding H., Li Z., Zhang C., Sheikh B., Brown G. W., Kane P. M., Hughes T. R., Boone C. (2004) Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nature Biotechnology* **22**: 62-69
- Phillips S., Butler J.S. (2003) Contribution of domain structure to the RNA 3' end processing and degradation functions of the nuclear exosome subunit Rrp6p. *RNA* **9(9)**: 1097-1107
- Rasconi S., Jobard M., Jouve L., Sime-Ngando T. (2009) Use of calcofluor white for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Applied and Environmental Microbiology* **75(8)**: 2545-2553
- Liu Q., Greimann J.C. Lima C.D. (2006) Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome. *Cell* **127(6)**: 1223-1237
- Reis V. R., Bassi A. P. G., da Silva J. C. G., Ceccato-Antonini S. R. (2013) Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* **44(4)**: 1121–1131
- Rodriguez A.J., Czaplinski K., Condeelis J.S., Singer R.H. (2008) Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology* **20(2)**: 144-149

- Roncero C., Valdivieso M.H., Ribas J.C., Durán A. (1988) Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **174**(4): 1945-1949
- Schneider C., Leung E., Brown J., Tollervey D. (2009) The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Research* **37**(4): 1127-1140
- 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. *The EMBO Journal* **33**(23): 2829–2846
- Spingola M., Grate L., Haussler D., Ares M. Jr. (1997) Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **5**(2): 221-234
- Stead J.A., Costello J.L., Livingstone M.J., 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* **35**(16): 5556-5567
- 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 (mRNP) in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **288**(14): 31816-31829
- Sutton A., Immanuel D., Arndt K.T. (1991) The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Molecular and Cellular Biology* **11**(4): 2133-2148
- Tenhaken R. (2015) Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* **5**:771
- Terry L.J. i Wente S.R. (2009) Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocy- toplasmic transport. *Eukaryot Cell* **8**(12): 1814-1827
- Uesono Y., Toh-e A., Kikuchi Y. (1997) Ssd1p of *Saccharomyces cerevisiae* associates with RNA. *Journal of Biological Chemistry* **272**(26): 16103-16109
- Gomes V.A., Souza C. T., Carvalho S. L., Bahia M. F., Parachin N. (2018) Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms* **6**(2): 38
- Wanless A. G., Lin Y., Weiss E.L. (2014) Cell morphogenesis proteins are translationally controlled through UTRs by the Ndr/LATS target Ssd1. *PLoS One* **9**(1): e85212
- Wasmuth E.V. i Lima C.D. (2012) Exo- and endoribonucleolytic activities of yeast cytoplasmic and nuclear RNA exosomes are dependent on the noncatalytic core and central channel. *Molecular Cell* **48**(1): 133-144
- Wei H., Xu Q., Taylor L. E., Baker J. O., Tucker M. P., Ding S. Y. (2009) Natural paradigms of plant cell wall degradation. *In Current Opinion in Biotechnology* **20**(3): 330-338
- Xing W., Muhrad D., Parker R., Rosen M. K. (2020) A quantitative inventory of yeast P body proteins reveals principles of composition and specificity. *Elife* **19**(9): e56525
- Yin Q.Y., de Groot P.W., Dekker H.L., de Jong L., Klis F.M., de Koster, C.G. (2005) Comprehensive proteomic analysis of *Saccharo- myces cerevisiae* cell walls: Identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *Journal of Biological Chemistry* **280**(21): 20894-20901

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.



Nikša Bekavac