

Uloga nekodirajuće transkripcije u regulaciji ekspresije gena PHO5 kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Ljubas, Jurica

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:177002>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Jurica Ljubas

7810/PT

**Uloga nekodirajuće transkripcije u regulaciji
ekspresije gena *PHO5* kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Uloga nekodirajuće transkripcije u regulaciji
ekspresije gena *PHO5* kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

Jurica Ljubas, 0058215745

Sažetak: *Antisense* RNA su nekodirajuće RNA koje nastaju inicijacijom transkripcije s 3' kraja kodirajućeg lanca gena. Ove su molekule kratkog vremena poluživota, budući da su ubrzo nakon početka transkripcije terminirane NNS kompleksom i degradirane RNA egzozomom. Brojna istraživanja pokazuju da se *antisense* RNA transkribiraju na velikom broju lokusa i da se njihova uloga povezuje s regulacijom ekspresije pripadajućih gena. Cilj ovog rada bio je istražiti ulogu *antisense* transkripcije u regulaciji ekspresije gena *PHO5* kvasca *S. cerevisiae*. Sustavom Anchor away postignut je rapamicinom-inducirani eksport RNA-vezujuće podjedinice NNS kompleksa Nrd1 iz jezgre, što je rezultiralo sporijom kinetikom aktivacije transkripcije gena *PHO5*. Nadalje, korišten je CRISPRi sustav sačinjen od katalički-inaktivne endonukleaze Cas9 (dCas9) i molekule *guide* RNA, koja navodi dCas9 na specifičnu regiju gena. CRISPRi sustavom ciljano je zaustavljena transkripcija *PHO5 antisense* RNA, što je rezultiralo bržom kinetikom aktivacije transkripcije gena *PHO5*. Dobiveni rezultati stoga upućuju na negativan regulatorni utjecaj *antisense* RNA na kinetiku ekspresije gena *PHO5*.

Ključne riječi: *antisense* RNA, regulacija ekspresije gena, gen *PHO5*, NNS kompleks, RNA egzozom

Rad sadrži: 30 stranica, 11 slika, 1 tablica, 37 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: 12. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

**Role of non-coding transcription in regulation of yeast *Saccharomyces cerevisiae*
PHO5 gene expression**

Jurica Ljubas, 0058215745

Abstract: Antisense RNAs are defined as non-coding RNAs which are made upon transcriptional initiation from the 3' ends of genes. These molecules have short half-lives considering that, soon after the start of their transcription, they are terminated by the NNS complex and degraded by the RNA exosome. However, numerous studies have shown that antisense RNAs are transcribed at a large number of loci and that they could play important roles in transcriptional regulation of corresponding genes. The aim of this work was to explore the role of antisense transcription in regulation of yeast *S. cerevisiae* *PHO5* gene expression. Using the Anchor away system, we achieved rapamycin-induced export of the NNS complex RNA-binding subunit Nrd1, which resulted in slower kinetics of *PHO5* gene transcriptional activation. Furthermore, we used CRISPRi system comprised of the catalitically-inactive endonuclease Cas9 (dCas9) and guide RNA, which guides dCas9 protein to a specific gene region. Using CRISPRi, we specifically blocked only antisense transcription at the *PHO5* gene locus, which resulted in more rapid kinetics of *PHO5* gene transcriptional activation. These results indicate that antisense transcription has a negative effect on *PHO5* gene expression kinetics.

Keywords: antisense RNAs, transcriptional regulation, *PHO5* gene, NNS complex, RNA exosome

Thesis contains: 30 pages, 11 figures, 1 table, 37 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: 12. July 2021

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.2. Transkripcija - ključni korak u regulaciji ekspresije gena.....	3
2.2.1. Nekodirajuće RNA.....	3
2.2.2. Antisense RNA - terminacija NNS kompleksom i degradiranje RNA egzosomom.....	4
2.2.3. Regulacija transkripcije gena putem antisense nekodirajućih RNA.....	
2.3 Porodica gena PHO - Gen PHO5.....	7
2.3.1. Regulacija ekspresije gena PHO5.....	7
2.4. Anchor away sustav - inducirani eksport proteina iz jezgre u citosol stanice.....	9
2.5. CRISPR/Cas9 sustav.....	9
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1 Materijal.....	11
3.1.1. Sojevi kvasca.....	11
3.1.3. Hranjive podloge za uzgoj kvasca.....	12
3.1.3.1. YNBP tekuća podloga (+P _i).....	13
3.1.3.2. Sintetska tekuća podloga (-P _i).....	13
3.1.4. Drop out.....	13
3.1.5. Otopina elemenata u tragovima.....	14
3.2. Kemikalije i enzimi.....	14
3.3. Otopine.....	14
3.4. Metode.....	15
3.4.1. Mjerenje aktivnosti enzima kisele fosfataze u suspenziji stanica kvasca.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. Eksport proteina Nrd1 iz jezgre dovodi do sporije kinetike aktivacije transkripcije gena <i>PHO5</i>	16
4.2. Sustavom CRISPRi ciljano je blokirana transkripcija <i>PHO5 antisense</i> RNA, što ima pozitivan utjecaj na kinetiku aktivacije transkripcije gena <i>PHO5</i>	21
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. POPIS LITERATURE.....	28

1. UVOD

Transkripcija je proces u kojem se nukleotidi u molekuli RNA povezuju prema informaciji sadržanoj u redosljedu baza DNA. Transkripcijom nastaju različiti RNA produkti, a budući da je genom eukariota pervazivno transkribiran, većina tih RNA produkata su nekodirajuće RNA. Njihove uloge prvenstveno ovise o vrsti RNA molekule. Tako su primjerice RNA poput rRNA ili tRNA dobro okarakterizirane te je njihova funkcija poznata, međutim druge nekodirajuće RNA poput *antisense* RNA slabo su istražene. Njihova se uloga najčešće povezuje uz *in cis* ili *in trans* regulaciju transkripcije, no povezanost brojnih *antisense* RNA sa procesima u kojima sudjeluju i uvjetima u kojima imaju ulogu je još uvijek nepoznata. Postoje jasne indikacije i rezultati koji upućuju na regulatorni utjecaj *antisense* RNA na pripadajuće gene na čijim lokusima se transkribiraju. Ipak, molekularni mehanizmi uključeni u regulaciju ostaju nedovoljno istraženi zbog nestabilnosti *antisense* RNA, a i činjenice da su ubrzo nakon inicijacije njihove transkripcije, *antisense* RNA terminirane NNS kompleksom i degradirane RNA egzosomom. U ovom radu, *antisense* RNA proučavane su koristeći kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao modelni organizam te gen *PHO5* kao model za praćenje njihovih učinaka. Razlog korištenja gena *PHO5* proizlazi iz dobro okarakterizirane regulacije njegove ekspresije, ali i činjenice da se uslijed izostanka katalitičke podjedinice RNA egzosoma, Rrp6, *antisense* RNA transkribirane s tog lokusa nakupljaju i stabiliziraju, što je omogućilo njihovo detaljnije istraživanje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ili poznatiji pod imenom "pekarski" odnosno "pivski kvasac", jednostanični je eukariotski organizam iz carstva Fungi. Promjera je veličine oko 5 do 10 μm i ovalnog je oblika. Svoju primjenu pronalazi u okvirima biotehnologije, molekularne genetike, industrije hrane i pića te farmaceutske industrije. Genom kvasca *S. cerevisiae* sekvenciran je u potpunosti 1996. godine, što ga čini prvim sekvenciranim eukariotskim organizmom (Goffeau i sur., 1996). To je uvelike pridonijelo korištenju kvasca *S. cerevisiae* kao modelnog organizma u svrhe raznih istraživanja. Uz to, prednosti su i kratko generacijsko vrijeme (oko 90 minuta za stanice divljeg tipa), jednostavan životni ciklus, ekonomičan uzgoj i laka genetička manipulacija. To potkrepljuje činjenica da se rekombinantna DNA vrlo efikasno ugrađuje u genom kvasca na temelju homologne rekombinacije, pri čemu je moguće konstruirati mnogo različitih mutanata koji posljedično imaju drugačija svojstva. Uz to, neki kvašćevi geni homologni su genima viših eukariota pa su shodno tome i procesi kao što su signalni sustav stanice, kompleksnost unutarstanične organizacije, mitohondrijski import, membranski transport i sl. oboma veoma slični (Karathia i sur., 2011). To kvasac *S. cerevisiae* čini izvrsnim modelom za proučavanje načina na koji funkcioniraju eukariotske stanice. No, osim za proučavanje molekularnih mehanizama, kvasac se kao modelni organizam koristi i za proučavanje staničnih struktura i njihovih funkcija. Temeljna saznanja o ekspresiji gena i ulogama različitih proteina dobivena su upravo proučavanjem stanica kvasca (Hereford i Hartwell, 1974).

Stanice kvasca *S. cerevisiae* mogu egzistirati kao haploidi ili diploidi. Diploidne stanice imaju 32 kromosoma, dok haploidne stanice imaju 16 kromosoma. Ove se vrste stanica razlikuju i u tipu parenja. Diploidna stanica (**a/a**) nastaje parenjem odnosno fuzijom dvaju haploidnih stanica suprotnog tipa parenja. Haploidi mogu biti dva različita tipa parenja, **a** ili **α** , dok su diploidi **a/a** tipa parenja. Tip parenja određen je sekvencom u lokusu MAT, koji se nalazi na 3. kromosomu. Ukoliko se u lokusu MAT nalazi sekvenca MAT**a**, kvasac je **a** tipa parenja, a ukoliko se tamo nalazi sekvenca MAT α , kvasac je α tipa parenja (Tamarin, 1999). Stanice kvasca se razmnožavaju mitozom tj. pupanjem, no ukoliko se nađu u nepovoljnim uvjetima (pr. promjena pH, temperature ili sastava podloge) mogu se usmjeriti i u mejozu. Mejozom iz diploidne stanice mogu nastati četiri spore koje onda omogućavaju preživljenje stanice (Duina, Miller and Keeney, 2014).

2.2. Transkripcija - ključni korak u regulaciji ekspresije gena

Transkripcija je jedan od fundamentalnih procesa koji se odvijaju u stanici. Njome se uputa pohranjena u molekuli DNA prevodi u molekulu RNA. Radi se o izrazito dinamičnom procesu sačinjenom od nekoliko koraka. Počevši od inicijacije transkripcije i sastavljanja kompleksa RNA polimeraze pa sve do elongacije i konačno terminacije, proces transkripcije predstavlja izrazito složeni sustav čiji mehanizmi i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni (Hager, McNally i Misteli, 2009). Prva asocijacija na proces transkripcije upućuje na nastajanje molekule mRNA koja nosi uputu za sintezu barem jednog proteina. Budući da ovdje govorimo o transkripciji u eukariota, proces translacije, kojim se uputa pohranjena u mRNA prevodi u protein, prostorno je i vremenski odvojen od procesa transkripcije i odvija se u citoplazmi stanice (Iborra, Jackson i Cook, 2001). Međutim, transkripcijom ne nastaju isključivo kodirajuće RNA molekule. Čak štoviše, velika većina eukariotskog genoma pervazivno se transkribira, pri čemu nastaju mnogi nekodirajući RNA transkripti (engl. *noncoding* RNA) čije su uloge u stanici predmet mnogih istraživanja posljednjih godina (Ard, Allshire i Marquardt, 2017).

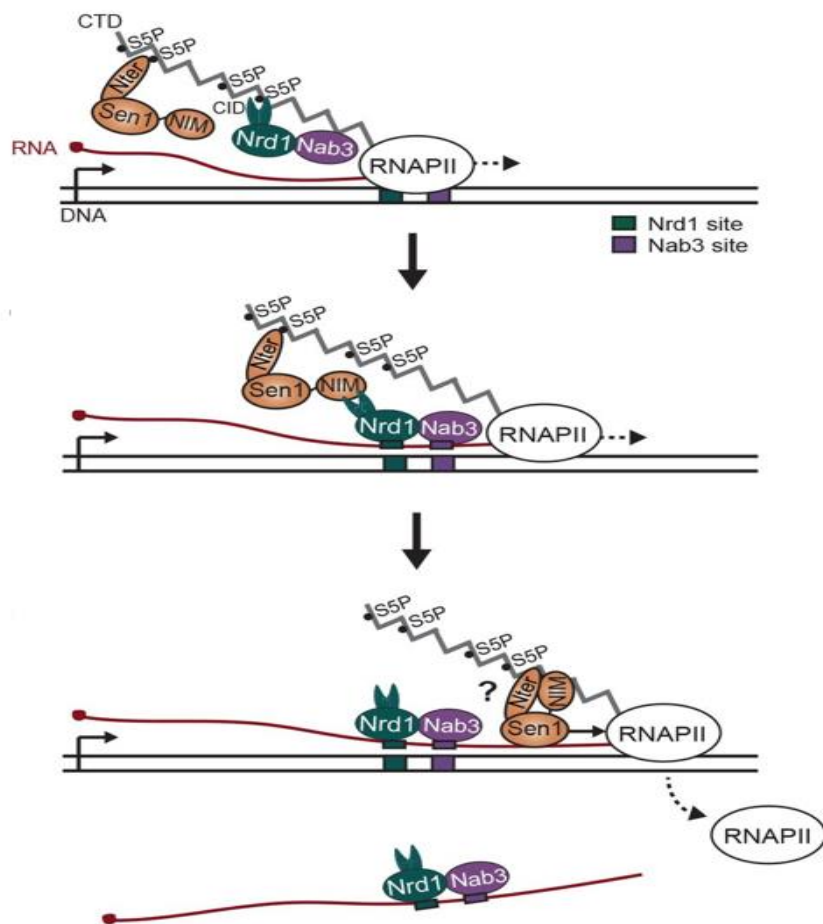
2.2.1. Nekodirajuće RNA

Nekodirajuće RNA su molekule koje nastaju procesom transkripcije, a da se pritom ne transliraju u proteine. Transkribiranje nekodirajućih RNA provodi enzim RNA polimeraza II na identičan način na koji se provodi i transkribiranje kodirajućih RNA. Nekodirajuće RNA se mogu raspodijeliti u nekoliko manjih grupa od kojih su najvažnije: rRNA, tRNA, miRNA (micro RNA), snRNA (engl. *small nuclear RNA*), *antisense* RNA i dr. (Eddy, 2001). Daljnja podjela može se provesti ovisno o stabilnosti tih transkripata ili ovisno o uvjetima u kojima se transkribiraju. Tako postoje stabilni nekodirajući transkripti, SUT (engl. *Stable Unannotated Transcripts*), koji se detektiraju u stanicama divljeg tipa, te transkripti CUT (engl. *Cryptic Unstable Transcripts*) koji se detektiraju u stanicama kvasca kod kojih je inaktivna ribonukleaza Rrp6 (Novačić i sur., 2020). Neke od nekodirajućih RNA poput rRNA i tRNA su dobro istražene i okarakterizirane, no velik broj ostalih nekodirajućih RNA, kao i njihove uloge u stanici, još uvijek su velika nepoznanica. Napretkom tehnologije, otkriveno je kako se veliki broj nekodirajućih RNA transkribira s nekodirajućih dijelova DNA koji su se dugi niz godina smatrali potpuno nevažnima (engl. *junk* DNA). Radi se zapravo o velikom otkriću, budući da su mutacije i promjene genetičke informacije u DNA koje uzrokuju bolesti usko povezane sa DNA regijama sa kojih se transkribiraju nekodirajuće RNA (Kaikkonen i Adelman, 2018), za koje se vjeruje

da imaju ključnu ulogu u regulaciji nastanka tih bolesti. Iako je regulacija povezana sa tim DNA regijama još nedovoljno istražena, pretpostavlja se kako bi mogla imati značajnu ulogu u razjašnjavanju genetičkih i evolucijskih razlika između vrsta, ali i dati saznanja o suzbijanju i sprječavanju različitih genetski uvjetovanih bolesti (Mattick i Makunin, 2006). Tako postoje čvrsti dokazi da se velika većina nekodirajućih RNA, među kojima su i *antisense* RNA, mogu povezati sa regulacijom ekspresije pripadajućih gena. Ipak, usprkos činjenici da ovakvi nekodirajući RNA transkripti mogu imati regulatorne uloge, prekomjerna transkripcija nekodirajućih RNA može imati i nepoželjne učinke za stanicu, budući da takvi transkripti mogu interferirati na svim razinama ekspresije gena. Primjerice, može doći do komplementarnog vezanja nekodirajućih RNA i mRNA molekula, čime se udio mRNA dostupnih za translaciju smanjuje te se na taj način usporava proces translacije. Postoje i brojni drugi sustavi i načini putem kojih bi *antisense* RNA mogle interferirati i time utjecati na ekspresiju nekog gena, te je nužno da stanica pravilno kontrolira razinu ekspresije nekodirajućih RNA (Tudek, Candelli i Libri, 2015).

2.2.2. *Antisense* RNA - terminacija NNS kompleksom i degradiranje RNA egzozomom

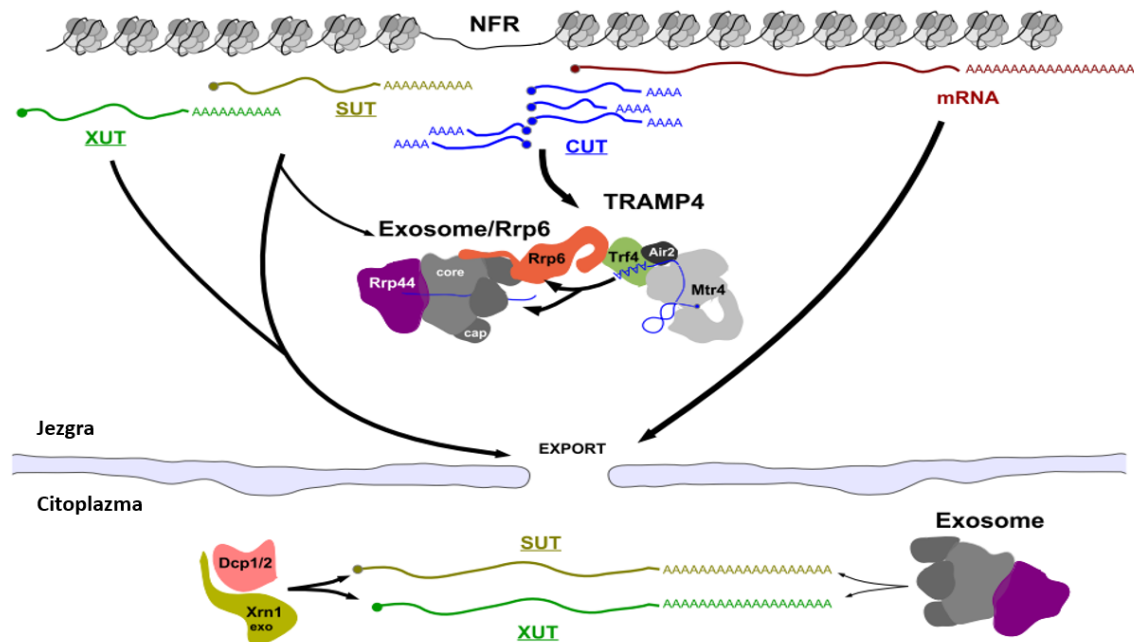
Antisense transkripti, kao posebna skupina nekodirajućih RNA, nastaju inicijacijom transkripcije s 3' kraja kodirajućeg lanca pripadajućeg gena (Khorkova i sur., 2014). Ovakvi su transkripti u stanici relativno nestabilni jer je njihova sinteza ubrzo nakon početka transkripcije terminirana putem NNS kompleksa, nakon čega su degradirani putem RNA egzozoma. To je uvelike otežalo njihovu identifikaciju i kvantifikaciju zbog čega se zapravo o njima, u odnosu na neke druge nekodirajuće RNA, zna jako malo. NNS kompleks, koji se sastoji od 3 podjedinice: Nrd1, Nab3 te Sen1, ima ključnu ulogu u terminaciji transkripcije *antisense* RNA (Arigo i sur., 2006). Transkripciju *antisense* RNA provodi enzim RNA polimeraza II, koja tijekom procesa transkripcije podliježe jednoj specifičnoj modifikaciji serinskog ostatka (Ser5) karboksiterminalne domene. Tu modifikaciju prepoznaju dvije RNA-vezujuće podjedinice NNS kompleksa Nrd1 i Nab3, nakon čega dolazi do njihova vezanja na *antisense* RNA (Han i sur., 2020). Sen1, ATP-azno ovisna helikazna podjedinica, ima ulogu u disocijaciji RNA polimeraze II sa RNA produkta, čime se posljedično inicira terminacija transkripcije *antisense* RNA (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz terminacije transkripcije *antisense* RNA putem NNS kompleksa. Slika preuzeta iz (Han i sur., 2020).

Antisense RNA su ubrzo nakon terminacije transkripcije i obavljanja svoje funkcije u stanici predmet degradacije koju provodi RNA egzozom (Arigo i sur., 2006; Camblong i sur., 2007). RNA egzozom je 3'-5' egzoribonukleazni proteinski kompleks koji posjeduje dvije katalitičke podjedinice, Rrp6 i Dis3, zaslužne za procesiranje i degradiranje RNA transkripata (Januszyk and Lima, 2014). Važan dio RNA egzozoma prilikom procesiranja RNA igra i TRAMP kompleks, koji u svom sastavu ima dvije poli(A) polimeraze Trf4 i Trf5 zaslužne za poliadeniliranje *antisense* RNA čime dolazi do njihove destabilizacije i posljedično, aktivacije ribonukleaze Rrp6 koja degradira takve transkripte (Callahan i Butler, 2010) (Slika 2). Za egzoribonukleaznu aktivnost Rrp6 zaslužna je EXO domena, a PMC2NT domena nužna je za ostvarivanje interakcija s nuklearnim kofaktorom Rrp47, koji u kompleksu s Rrp6 procesira RNA transkripte. Mpp6 je također važan nuklearni kofaktor egzozoma koji pripomaže u tom procesiranju (Stead i sur., 2007; Januszyk i Lima, 2014). U izostanku katalitičke podjedinice Rrp6 dolazi do stabilizacije i nakupljanja *antisense* RNA što se pokazalo ključnim za istraživanje

utjecaja nekodirajuće transkripcije na ekspresiju gena sa kojih se ove RNA transkribiraju (Camblong i sur., 2007).



Slika 2. Shematski prikaz degradacije nekodirajućih molekula RNA u jezgri i citosolu. Preuzeto iz (Tudek, Candelli and Libri, 2015).

2.2.3. Regulacija transkripcije gena putem *antisense* nekodirajućih RNA

Ekspresija *antisense* RNA je uočena još prije trideset godina, no mehanizam putem kojeg ove molekule djeluju i utječu na ekspresiju pripadajućih gena, nije u potpunosti razjašnjen. *Antisense* RNA ili njihova neposredna transkripcija mogle bi imati značaj na svim razinama ekspresije nekog gena, tako da ne postoji jedinstveni mehanizam kojim ovakvi transkripti reguliraju ekspresiju (Pelechano i Steinmetz, 2013). Većina nekodirajućih RNA u kvascu, uključujući i *antisense* RNA, djeluju *in cis*. Takav način djelovanja podrazumijeva da nekodirajuće RNA reguliraju ekspresiju gena sa kojih se transkribiraju ili da se njihovi regulatorni učinci očituju u blizini na istom kromosomu. S druge strane, regulacijom *in trans* nekodirajuće RNA regulirale bi ekspresiju udaljenih gena ili istih lokusa na homolognom kromosomu (Till, Mach i Mach-Aigner, 2018). Neka su istraživanja kroz godine pokazala da bi *antisense* RNA mogle djelovati npr. putem kompleksa koju remodeliraju i modificiraju strukturu kromatina (Novačić i sur., 2020). Tome u prilog ide i činjenica da promotori određenih gena sa kojih se transkribira velik broj *antisense* RNA imaju tendenciju da su više "zatvoreni" tj. da

je DNA gušće pakirana u strukturi kromatina (Gill i sur., 2020). Također je i na genu *PHO84* pokazan značajan utjecaj *antisense* RNA na regulaciju *sense* transkripcije. U izostanku katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6, dolazi do stabilizacije dva *antisense* transkripta. Takva stabilizacija dovodi do privlačenja kromatin-modificirajućih kompleksa, konkretno histon-deacetilaza na promotor gena *PHO84*, što se očituje represijom transkripcije tog gena (Camblong i sur., 2007).

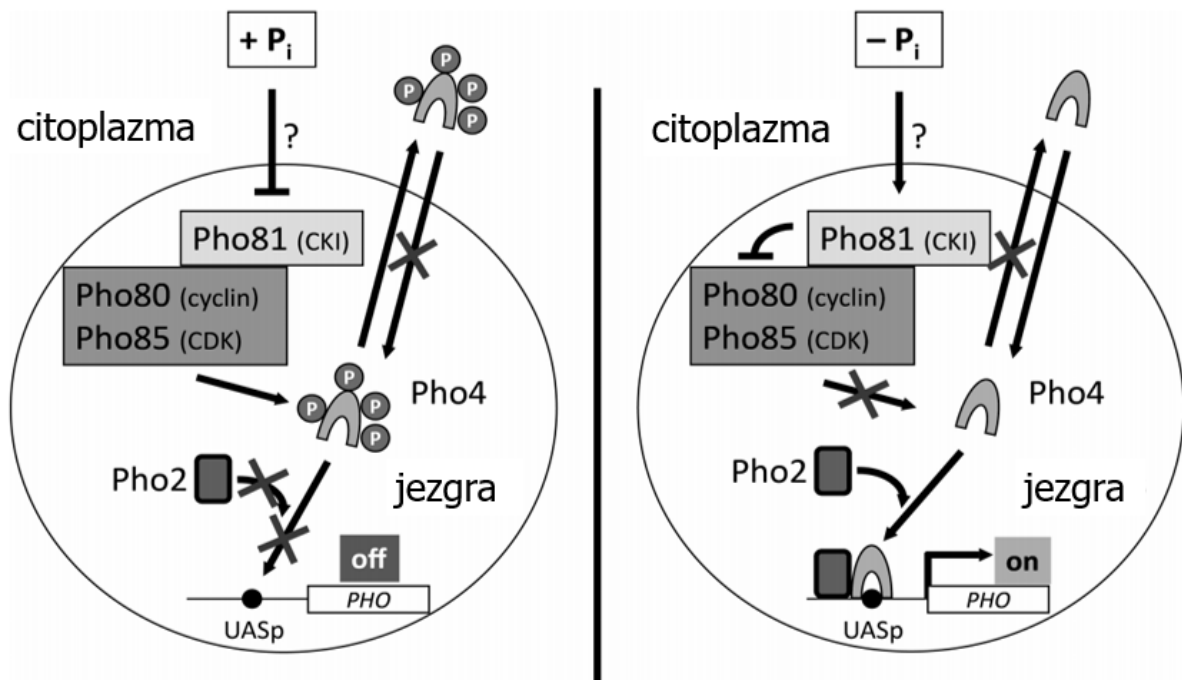
2.3 Porodica gena PHO - Gen *PHO5*

Dio porodice PHO, gen *PHO5*, korišten je kao predmet proučavanja odnosno model u ovome radu. Radi se o genu koji kodira za protein kiselu fosfatazu, čija se transkripcija aktivira u uvjetima kada stanica nema dovoljno fosfata anorganskog podrijetla u svojoj okolini (Oshima, 1997). Uz *PHO5*, istoj porodici pripada i još 20-ak gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u staničnom transportu i metabolizmu fosfata. Gen *PHO5* nije konstitutivno eksprimiran već do indukcije njegove transkripcije dolazi uslijed potpunog izostanka fosfata. No, čak ni to nije dovoljno budući da stanice sadrže određene količine fosfata u obliku zalihe. Do njegove potpune indukcije doći će tek u uvjetima kada je i ta zaliha potrošena za potrebe drugih straničnih procesa (npr. replikacija DNA) (Auesukaree i sur., 2004; Korber i Barbaric, 2014).

2.3.1. Regulacija ekspresije gena *PHO5*

Budući da gen *PHO5* nije konstitutivno eksprimirani gen, njegova ekspresija zahtjeva specifičan mehanizam regulacije. Tako u regulaciji ekspresije gena *PHO5* sudjeluje nekoliko proteina i enzima. Kako bi stanica mogla prepoznati treba li joj kisela fosfataza ili ne, potrebno je generiranje staničnog signala koji će posljedično dati uputu stanici treba li eksprimirati kiselu fosfatazu. Mehanizmi koji slijede nakon tog signala su jasni, međutim njegov molekularni karakter ostaje nerazjašnjen. Prva reakcija u nizu podrazumijeva aktivaciju regulatornog proteina Pho4 koji je u najvećoj mjeri zaslužan za aktivaciju gena *PHO5*. Pho4 je protein koji ima karakteristični zavojnica-okret-zavojnica motiv (engl. *helix-turn-helix*) i veže se na specifičnu sekvencu promotora gena *PHO5* zvanu E-box čiji je slijed nukleotida CACGTG (Vogel, Hörz i Hinnen, 1989; Münsterkötter, Barbaric i Hörz, 2000). Pho4 svojim vezanjem na promotor gena *PHO5* aktivira transkripciju gena, a ona se još dodatno pojačava vezanjem koaktivatora Pho2 na blisko mjesto u promotoru (Vogel, Hörz i Hinnen, 1989). Pho4 se, za

razliku od gena *PHO5*, konstitutivno eksprimira, no ipak postoji mehanizam regulacije Pho4 preko para ciklin/ciklin-ovisnih kinaza Pho80/Pho85. Pho85 nije specifična kinaza budući da djeluje i na druge supstrate, no kada je u paru sa Pho80 takav kompleks ima veliki afinitet upravo za Pho4, pri čemu se protein Pho4 fosforilira ovisno o raspoloživosti fosfata u stanici (Korber i Barbaric, 2014). Par ciklin/ciklin-ovisnih kinaza Pho80/Pho85 se nalazi još pod dodatnom regulacijom proteina Pho81, koji se veže na par Pho80/Pho85 neovisno o koncentraciji fosfata u stanici. No, tek kada je ta koncentracija niska, odnosno kada vanjskog fosfata uopće ni nema, Pho81 inhibitorски djeluje na kompleks Pho80/Pho85. To će spriječiti kinaznu aktivnost kompleksa Pho80/Pho85 i neće doći do fosforilacije Pho4. Tada će se Pho4 sa svojim koaktivatorom Pho2 vezati na UASp (engl. *Upstream Activating Sequence phosphate*) mjesto promotora *PHO5*, pri čemu dolazi do indukcije transkripcije gena *PHO5* kao što je prethodno i opisano. S druge strane, kada je u stanici koncentracija fosfata relativno visoka, Pho81 neće djelovati kao inhibitor para kinaza Pho80/Pho85, uslijed čega se Pho4 fosforilira te je tada inhibiran i nema sposobnost vezanja na UASp. Samim time, neće doći ni do vezanja njegova koaktivatora Pho2, čime se reprimira ekspresija gena *PHO5* i ne dolazi do sinteze proteina kisele fosfataze. Fosforilirani Pho4 nakon toga biva transportiran iz jezgre u citosol stanice (Nakao i sur., 1986; Svaren i Hörz, 1997). Opisani signalni put koji regulira transkripciju gena *PHO5* prikazan je na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz signalnog puta koji regulira transkripciju gena *PHO5* u uvjetima kada je u stanici prisutan (+Pi) ili nije prisutan (-Pi) fosfat. Preuzeto iz (Korber i Barbaric, 2014).

2.4. Anchor away sustav - inducirani eksport proteina iz jezgre u citosol stanice

Anchor away sustav je specifični genetički alat kojim se veoma brzo i učinkovito mogu proučavati uloge određenih proteina, odnosno posljedice njihove inaktivacije (Haruki, Nishikawa i Laemmli, 2008). Koristeći ovaj sustav moguće je eksportirati protein od interesa iz jezgre u citosol dodatkom vanjskog liganda rapamicina u medij za uzgoj. Ideja tj. potreba za kreiranjem i razvijanjem ovog sustava nastala je uslijed proučavanja različitih temperaturno-osjetljivih mutanata kvasca, kod kojih se nije moglo jasno odrediti je li sama promjena temperature ili inaktivacija određenog proteina ispoljavala negativne/pozitivne učinke na određeni proces. Shodno tome, znanstvenici koji su kreirali ovaj sustav počeli su s idejom u kojoj bi se protein eksportirao van svoje native lokacije u stanici te bi time gubio svoju funkciju. To su nastojali osigurati dodavanjem vanjskog liganda rapamicina. Ranija su istraživanja pokazala kako u prisustvu rapamicina, protein FKBP12 i specifična FRB domena dimeriziraju, što je iskorišteno kao okosnica ovog sustava. Jednostavnim genetičkim manipulacijama bilo je moguće vezati protein na FRB domenu, međutim pronalazak odgovarajućeg *anchora* predstavljao je problem. U tu svrhu, ribosomalni proteini koji nakon vlastite sinteze u citosolu u velikoj mjeri tranzijentno prolaze kroz jezgru gdje s ostalim ribosomalnim proteinima i rRNA formiraju ribosome, iskorišteni su za vezanje odnosno stupanje u interakciju sa FKBP12 proteinom. Promatrajući niz ribosomalnih proteina, protein Rpl13a pokazao se kao najbolji izbor. Ipak, ključ cijelog sustava bio je u vanjskom ligandu rapamicinu. Njegovim dodavanjem, dolazi do hetero-dimerizacije između proteina od interesa, Rpl13a, FKBP12 te FRB domene. Takav kompleks potom prolazi kroz jezgru u citosol što posljedično dovodi do gubitka funkcije proteina koji je eksportiran (Haruki, Nishikawa i Laemmli, 2008). Testirana su 43 različita gena različite funkcije te je za svaki od njih, uspješno proveden eksport produkta njihove ekspresije iz jezgre u citosol. Također, važno je napomenuti kako je taj eksport bio brz i davao je iznimno dobre rezultate već nakon par minuta od dodatka rapamicina (Haruki, Nishikawa i Laemmli, 2008).

2.5. CRISPR/Cas9 sustav

CRISPR sustav (engl. *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*) predstavlja modernu tehnologiju genetičkog inženjerstva koja se danas koristi za brojna temeljna i biomedicinska istraživanja. CRISPR sustav originalno je detektiran u bakterijama i arhejama, kao stečeni imunski odgovor stanice na ulazak bakteriofaga ili stranih plazmida. Ovaj sustav sačinjen je prvenstveno od endonukleaze Cas9 i molekule gRNA (engl. *Guide RNA*), koja navodi

Cas9 na specifičnu regiju genoma. Svojom djelovanjem Cas9 uvodi dvolančane lomove u DNA na mjestima koja su komplementarna molekuli gRNA (Wang, La Russa i Qi, 2016). Postoje brojne primjene ovog sustava, a neke od njih podrazumijevaju mogućnost ispravljanja mutacija u genomu, kao i deleciju/aktivaciju pojedinih gena (Redman i sur., 2016). Međutim, novija istraživanja pokazuju kako se CRISPR/Cas9 sustav ne mora nužno koristiti kao genetički alat za modifikaciju sekvence gena, već da uz određene modifikacije može poslužiti i kao regulator transkripcije. Osnovna ideja tzv. CRISPRi sustava je da se inaktivira endonukleazna aktivnost koju posjeduje Cas9, ali da je takav protein dCas9 (engl. *dead* Cas9) i dalje privučen na određeno mjesto genoma putem odgovarajuće gRNA. Ovakvo vezanje dCas9 na točno određenom mjestu u genomu može poslužiti kao sterička prepreka RNA polimerazi prilikom transkripcije, što bi rezultiralo njezinom disocijacijom s DNA i posljedično, terminacijom transkripcije (Qi i sur., 2013).

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Materijal

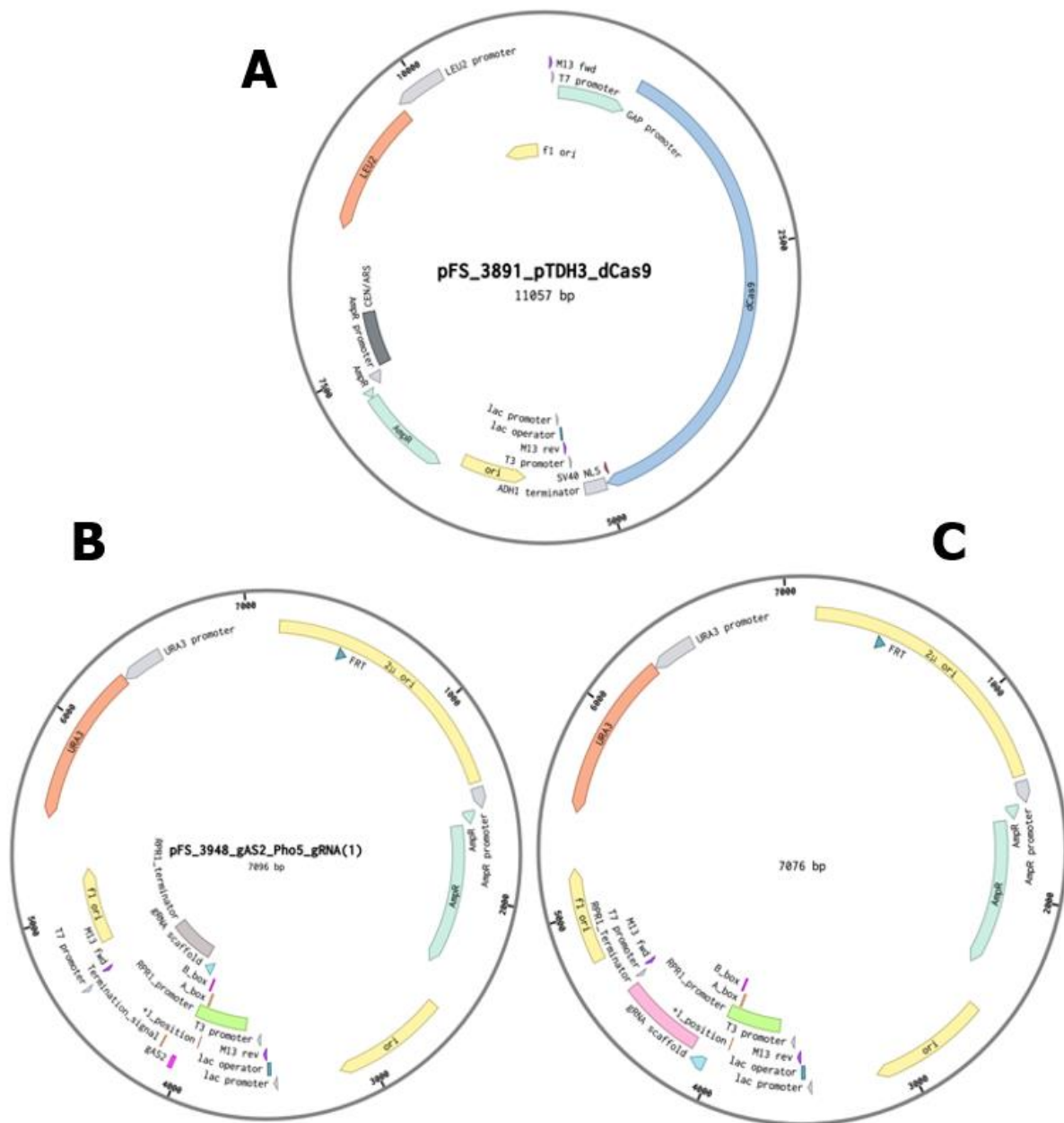
3.1.1. Sojevi kvasca

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

SOJ	GENOTIP	IZVOR
FSY5065 Nrd1 - AA	<i>MATα tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKB12::TRP1 Nrd1-FRB::kanMX6</i>	Castelnuovo i sur., 2014
BMA41 wt + p3891 (dCas9) + p3948 (gRNA)	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100</i> [p3891; dCas9; <i>CEN LEU2</i>] [p3948; gRNA-PHO5; 2 μ <i>URA3</i>]	Laboratorij za biokemiju, PBF
BMA41 wt + p3891(dCas9) + p3892 (empty)	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100</i> [p3891; dCas9; <i>CEN LEU2</i>] [p3892; 2 μ <i>URA3</i>]	Laboratorij za biokemiju, PBF
BMA41 <i>rrp6</i> + p3891 (dCas9) + p3948 (gRNA)	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp6::KanMX4</i> [p3891; dCas9; <i>CEN LEU2</i>] [p3948; gRNA-PHO5; 2 μ <i>URA3</i>]	Laboratorij za biokemiju, PBF
BMA41 <i>rrp6</i> + p3891 (dCas9) + p3892 (empty)	<i>MATα ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp6::KanMX4</i> [p3891; dCas9; <i>CEN LEU2</i>] [p3892; 2 μ <i>URA3</i>]	Laboratorij za biokemiju, PBF

3.1.2. Plazmidi

U ovom su radu korišteni plazmidi za ekspresiju komponenti CRISPRi sustava. Plazmid p3891 centromerni je plazmid za ekspresiju katalitički-inaktivne inačice proteina Cas9, dCas9, koji nosi marker gen *LEU2* (slika 4A). Plazmid p3948 je 2 μ plazmid za ekspresiju gRNA čija sekvenca je komplementarna regiji genoma na kojoj se transkribira *PHO5 antisense* RNA, koji nosi marker gen *URA3* (slika 4B), a plazmid p3892 je odgovarajući prazni plazmid (slika 4C). Ovi plazmidi konstruirani su u laboratoriju F. Stutz (Sveučilište u Ženevi, Švicarska).



Slika 4. Mape plazmida za ekspresiju komponenti CRISPRi sustava. Sa centromernog plazmida p3891 koji ima *LEU2* marker eksprimira se dCas9. Plazmid p3948 je 2 μ plazmid za ekspresiju gRNA te ima *URA3* marker dok je plazmid p3892 odgovarajući prazni plazmid.

3.1.3. Hranjive podloge za uzgoj kvasca

Hranjive podloge pripremaju se vaganjem potrebnih komponenata koje se otapaju u deioniziranoj vodi. Tako pripremljene hranjive podloge steriliziraju se u autoklavu pri tlaku od 1 atm i na temperaturi od 121°C u periodu od 45 minuta. U podloge se prije korištenja dodaje sterilna 50%-tna otopina glukoze do finalne masene koncentracije glukoze 20 g/L.

3.1.3.1. YNBP tekuća podloga (+P_i)

YNB 6,7 g/L; drop out 2 g/L; KH₂PO₄ 1 g/L

Ovisno o auksotrofности soja, u podlogu se dodaju tvari rasta histidin (80 mg/L), uracil (80 mg/L), triptofan (80 mg/L) i leucin (160 mg/L). Nakon autoklaviranja, u podlogu se dodaje sterilizirana otopina glukoze do konačne masene koncentracije od 20 g/L. Ova podloga modifikacija je standardne YNB podloge za uzgoj kvasca, s dodatkom 1 g/L KH₂PO₄ u svrhu potpune represije PHO promotora (+P_i).

3.1.3.2. Sintetska tekuća podloga (-P_i)

drop out 2 g/L; asparagin 2 g/L; MgSO₄ x 7 H₂O 0,5 g/L; NaCl 0,1 g/L; CaCl₂ x 2 H₂O 0,1 g/L; Na-citrat 5,88 g/L; KCl 1 g/L; otopina elemenata u tragovima φ = 0,002

Ovisno o auksotrofности soja, u podlogu se dodaju tvari rasta histidin (80 mg/L), uracil (80 mg/L), triptofan (80 mg/L) i leucin (160 mg/L). Nakon autoklaviranja, u podlogu se dodaju sterilizirana otopina glukoze do konačne masene koncentracije od 20 g/L te filtracijom sterilizirane otopine 1 (φ = 0.004) i 2 (φ = 0.0001).

Otopina 1 - riboflavin 0,05 g/L, p-aminobenzojeva kiselina 0,05 g/L, inozitol 0,5 g/L

Otopina 2 - biotin 0,02 g/L, Ca-pantotenat 4 g/L, nikotinska kiselina 4 g/L, piridoksal 4 g/L, tiamin 4 g/L, folna kiselina 0,02 g/L

Ova podloga ne sadrži fosfat (-P_i) i korištena je za indukciju PHO promotora.

3.1.4. 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; inozitol 2 g ;L-izoleucin 2 g; L-lizin 4 g; L-metionin 2 g; 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

3.1.5. Otopina elemenata u tragovima

borna kiselina 0,25 g/L; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L; KI 0,05 g/L; $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L; $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L

3.2. Kemikalije i enzimi

Agar, kvašćev ekstrakt: Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)

Aminokiseline (histidin, leucin, triptofan), p-nitrofenilfosfat, natrijev citrat, rapamicin: Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)

D (+) glukoza bezvodna: Gram-Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Kvašćeva dušična baza bez aminokiselina (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).

3.3. Otopine

Za mjerenje aktivnosti kisele fosfataze:

0,1 M Na-acetatni pufer (pH = 3,6)

0,1 M ledena octena kiselina, pH se podešava dodatkom NaOH

20 mM otopina p-nitrofenilfosfata

7,425 g/L p-nitrofenilfosfata otapa se u 0,1 M Na-acetatnom puferu (pH = 3,6), priprema se neposredno prije mjerenja

1 M NaOH

3.4. Metode

3.4.1. Mjerenje aktivnosti enzima kisele fosfataze u suspenziji stanica kvasca

Stanice kvasca uzgajane su u tekućoj YNBP hranjivoj podlozi (visoka koncentracija fosfata - uvjeti represije PHO promotora) na rotacijskoj tresilici pri 30°C do logaritamske faze rasta. Odgovarajući volumen suspenzije je centrifugiran (5'/3000 rpm), talog stanica ispran je sterilnom vodom radi potpunog ispiranja fosfata iz podloge, te su stanice resuspendirane u tekućoj sintetskoj hranjivoj podlozi (ne sadrži fosfat - uvjeti indukcije PHO promotora) na koncentraciju 0,3 OD/mL i inkubirane na rotacijskoj tresilici na 30°C. Alikvot suspenzije stanica za mjerenje aktivnosti enzima određen je uzimajući u obzir koncentraciju suspenzije stanica (OD_{600}), očekivanu vrijednost aktivnosti te predviđeno vrijeme trajanja reakcije (5-15 minuta), kako bi izmjerena apsorbancija konačnog produkta bila u području linearnog očitavanja spektrofotometra (0,1-2). Alikvot je centrifugiran (5'/3000 rpm), a zatim ispran deioniziranom vodom (u slučaju da je korištena suspenzija u YNBP podlozi - 0h indukcije). Talog stanica kvasca resuspendiran je u 4,2 mL 0.1 M Na-acetatnog pufera (pH = 3,6). Pripremljene su dvije paralele uzorka od 1 mL te je uzet alikvot za mjerenje OD_{600} vrijednosti suspenzije stanica u puferu. U međuvremenu je pripremljena 20 mM otopina p-nitrofenilfosfata u Na-acetatnom puferu. Uzorci i supstrat inkubirani su 10 minuta u vodenoj kupelji pri 30°C, nakon čega je reakcija započeta dodatkom 1 mL otopine supstrata u svaku od dvije paralele. Po isteku vremena, reakcija je zaustavljena dodatkom 1 mL 1 M otopine NaOH, čime se denaturira enzim. Slijepa proba sadržavala je sve komponente reakcije, ali je NaOH dodan prije supstrata pa je enzimska reakcija odmah zaustavljena, kako bi dobivena količina produkta u slijepoj probi bila rezultat isključivo spontanog raspada supstrata. Epruvete su centrifugirane (5'/3000 rpm), nakon čega je supernatant korišten za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije produkta reakcije (p-nitrofenol) koji u lužnatom pH području daje žuto obojenje. Izmjerena apsorbancija uzorka pri 410nm proporcionalna je koncentraciji produkta, a specifična aktivnost enzima računa se prema formuli:

$$A = \frac{A_{410} * 1000}{OD_{600} * \text{vrijeme reakcije (min)}}$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

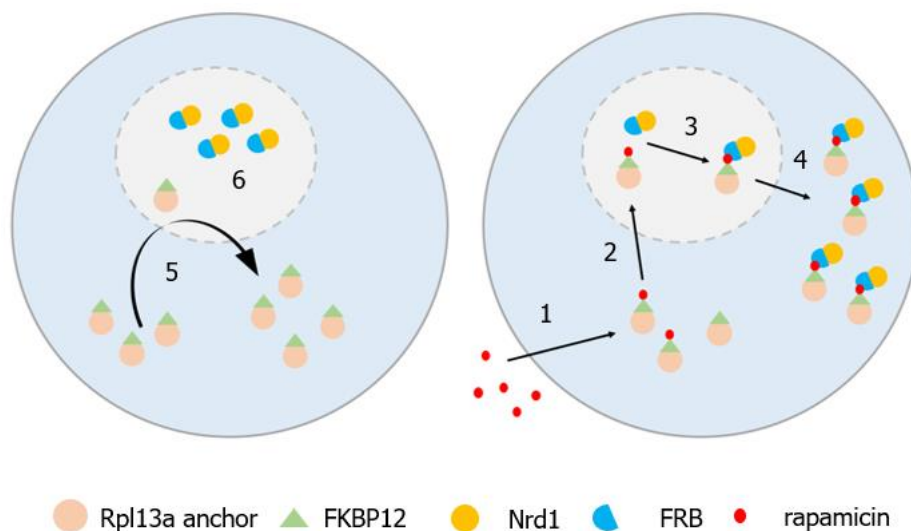
Transkripcija je proces u kojem se uputa sadržana u molekuli DNA prevodi u molekulu RNA. Međutim, produkt transkripcije nije uvijek molekula RNA koja nosi uputu za sintezu određenog proteina. Štoviše, većina eukariotskog genoma se transkribira, pri čemu nastaju nekodirajuće RNA. Postoje brojne vrste nekodirajućih RNA, od kojih su neke dobro okarakterizirane i opisane, npr. tRNA ili rRNA, međutim veoma se malo zna o specifičnim vrstama nekodirajućih RNA kojima pripadaju i *antisense* RNA molekule. *Antisense* RNA su nekodirajuće RNA koje nastaju inicijacijom transkripcije s 3' kraja kodirajućeg lanca gena. Ove su molekule u pravilu kratkog vremena poluživota, budući da su ubrzo nakon početka transkripcije terminirane NNS kompleksom i degradirane RNA egzosomom. To je uvelike otežalo njihovo istraživanje, no razvitkom novijih osjetljivijih metoda sekvenciranja RNA koje su specifične obzirom na transkribirani lanac DNA, danas je omogućena bolja karakterizacija nekodirajuće transkripcije.

Budući da su novija istraživanja pokazala kako se uloge *antisense* RNA povezuju s regulacijom ekspresije pripadajućih gena, cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj *antisense* transkripcije na ekspresiju kvašćevog gena *PHO5*. Na lokusu gena *PHO5* prethodno je pokazano da dolazi do nakupljanja *antisense* RNA kao posljedica inaktivacije katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6, koja ukoliko je aktivna, degradira takve transkripte (neobjavljeni rezultati iz Laboratorija za biokemiju). Eksperimentalna strategija ovog rada bila je pomoću različitih stanica mutanata postići nakupljanje ili obustavljanje sinteze *PHO5 antisense* RNA, kako bi se istražio njen utjecaj na razinu ekspresije gena *PHO5*. Razina ekspresije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze, za koji kodira ovaj gen. Nakupljanje *PHO5 antisense* RNA postignuto je pomoću inaktivacije NNS kompleksa sustavom Anchor away, a ciljano obustavljanje sinteze *PHO5 antisense* RNA postignuto je CRISPRi sustavom.

4.1. Eksport proteina Nrd1 iz jezgre dovodi do sporije kinetike aktivacije transkripcije gena *PHO5*

Nrd1 je esencijalni RNA-vezujući protein koji se nalazi u sastavu NNS (Nrd1-Nab3-Sen1) kompleksa, čija je funkcija povezana uz regulaciju terminacije transkripcije. Njegova se uloga očituje putem činjenice da Nrd1 posjeduje amino-terminalnu domenu putem koje stupa u

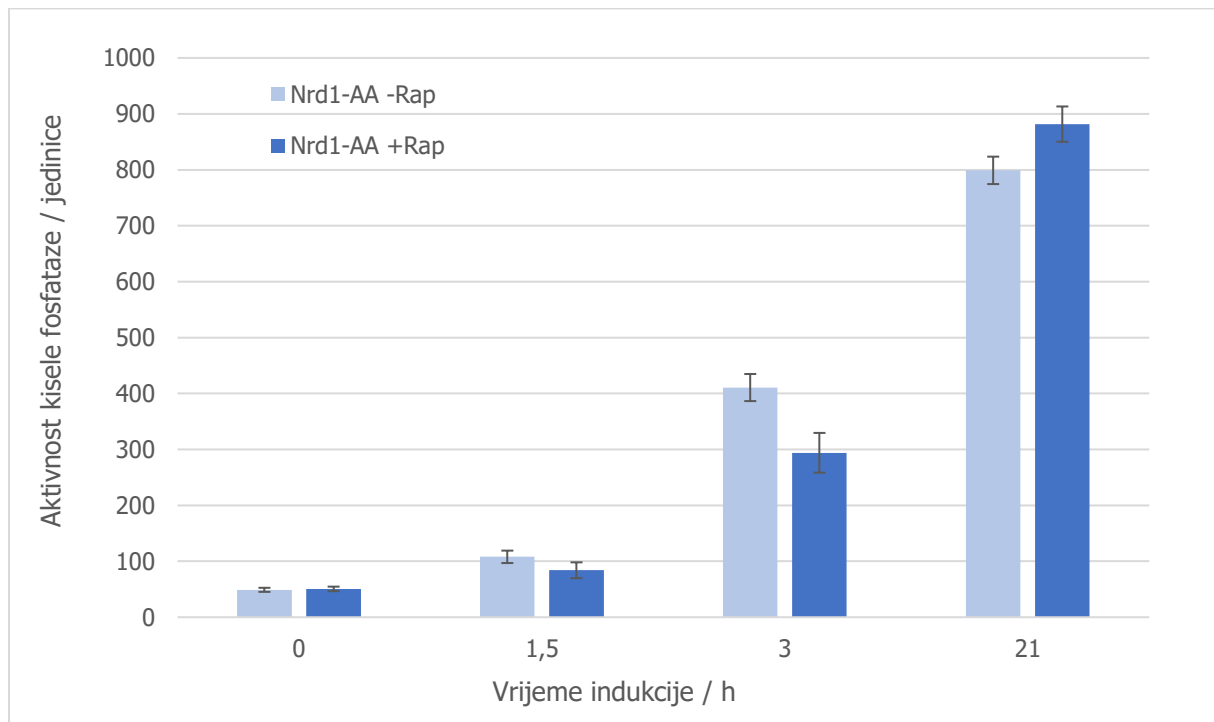
interakciju sa karboksi-terminalnom domenom RNA polimeraze II, što posljedično rezultira terminacijom transkripcije. Također, u tom procesu sudjeluju Nab3, koji je kao i Nrd1, RNA-vezujuća podjedinica NNS kompleksa te Sen1, koji je helikazna podjedinica (Steinmetz i sur., 2001). Postoje indicacije kako je upravo Nrd1 zaslužan za usmjeravanje RNA egzosoma na procesiranje ili degradaciju različitih nekodirajućih RNA supstrata (Vasiljeva i Buratowski, 2006). Ipak, njegovo proučavanje otežano je činjenicom da mutacija *nrd1* rezultira letalnim fenotipom, budući da je Nrd1 esencijalan za vijabilnost stanica (Vasiljeva i Buratowski, 2006). Iz tog razloga, u ovom je radu korišten je tzv. Anchor away soj Nrd1-AA. U soju Nrd1-AA, na FRB domenu je vezan esencijalni protein od interesa, Nrd1, koji nakon dodavanja rapamicina, tvori kompleks sa pripadajućim anchorom i FKBP12 proteinom te se eksportira van jezgre (slika 5). Ukoliko rapamicin nije prisutan, FKBP12-Rpl13a prolazi kroz jezgru, ali ne dimerizira sa FRB-Nrd1 (slika 5: 5) pa ne dolazi do eksporta proteina Nrd1 (slika 5: 6).



Slika 5. Shematski prikaz djelovanja sustava Anchor away, pri čemu se protein od interesa Nrd1 iz jezgre eksportira u citosol prilikom dodatka vanjskog liganda rapamicina, dok se u njegovu izostanku protein i dalje nalazi u jezgri te obnaša svoju funkciju.

Stanice mutanta kvasca Nrd1-AA uzgajane su u podlozi sa visokom koncentracijom fosfata (uvjeti represije gena *PHO5*, +P_i) do logaritamske faze rasta. Zatim je odgovarajući alikvot stanica precijepljen u podlogu bez fosfata (uvjeti indukcije gena *PHO5*, -P_i), pri čemu je svaka kultura podijeljena na dva alikvota, od kojih je u jedan dodan ligand rapamicin u finalnoj koncentraciji od 1 μg/mL (+Rap), a u drugi nije (-Rap). Nakon toga se u određenim

vremenskim intervalima mjerila aktivnost enzima kisele fosfataze, produkta ekspresije gena *PHO5*.

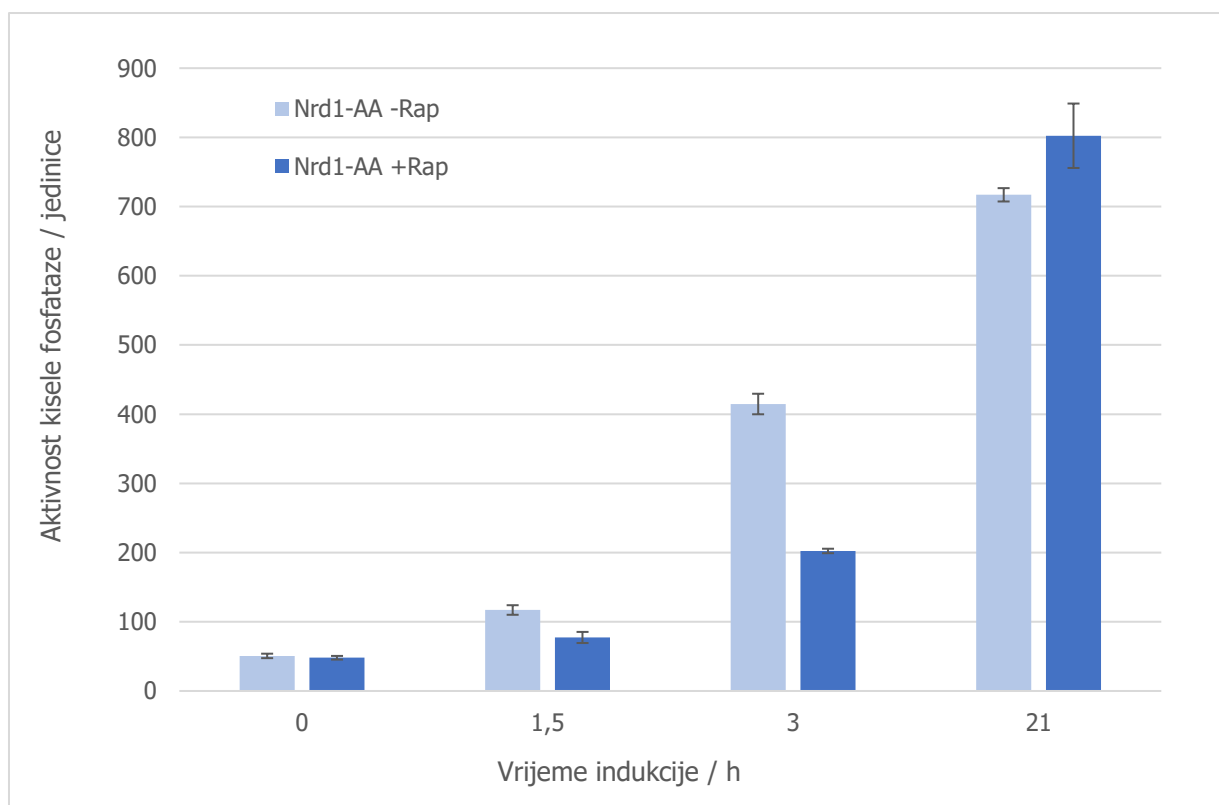


Slika 6. Aktivacija transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama kvasca Nrd1-AA bez (-Rap) i sa dodatkom rapamicina (+Rap). Stanice su uzgajane pri 30°C na rotacijskoj tresilici u uvjetima represije gena *PHO5* nakon čega su prebaćene u podlogu koja ne sadrži fosfat (inducibilni uvjeti). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Na slici **6** prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti enzima kisele fosfataze. Stanice Nrd1-AA u odsustvu liganda rapamicina (-Rap) predstavljaju ekvivalent stanica divljeg tipa, budući da ne dolazi do eksporta esencijalnog proteina Nrd1 iz jezgre u citosol. S druge strane, prilikom inkubacije tog istog soja u prisutnosti rapamicina, dolazi do eksporta Nrd1 iz jezgre, čime u tim stanicama dolazi do inaktivacije NNS kompleksa. Prethodno je pokazano kako rapamicinom-inducirani eksport podjedinice Nrd1 iz jezgre dovodi do nakupljanja *PHO5 antisense* RNA, budući da NNS kompleks ima bitnu ulogu u terminaciji njene transkripcije (neobjavljeni rezultati iz laboratorija F. Stutz). Uspoređujući razine aktivnosti kisele fosfataze izmjerene sa stanicama soja Nrd1-AA u odsustvu i prisustvu rapamicina, dobiveni rezultati daju

uvid kako inaktivacija NNS kompleksa, postignuta eksportom njegove RNA-vezujuće podjedinice Nrd1 iz jezgre, ima negativan utjecaj na kinetiku, ali ne i na finalnu prekonocnu razinu ekspresije gena *PHO5* (slika 6). Takav rezultat upućuje na postojeći, ali ne drastičan negativan regulatorni efekt inaktivacije NNS kompleksa na transkripciju gena *PHO5* te pokazuje da pojačana stabilizacija *PHO5 antisense* RNA djeluje represivno na transkripciju odgovarajućeg *sense* transkripta, odnosno mRNA *PHO5*. Ipak, budući da je negativan utjecaj inaktivacije NNS kompleksa bio jasno izražen jedino pri inkubaciji stanica u uvjetima indukcije nakon 3 h (slika 6), postavilo se pitanje je li izmjereni efekt slabiji zbog sporog ili nedovoljnog eksporta Nrd1 van jezgre, koji je u provedenom eksperimentu bio potaknut dodatkom rapamicina tek nakon precjepljivanja stanica u uvjete indukcije.

U tu svrhu, iznova su stanice mutanta kvasca Nrd1-AA uzgajane u podlozi sa visokom koncentracijom fosfata (uvjeti represije gena *PHO5*, +P_i) do srednje logaritamske faze rasta, nakon čega je vršen tzv. predtretman alikvota kulture stanica s rapamicinom u trajanju od 1 h, prije precjepljivanja stanica u inducirajuće uvjete gena *PHO5* (podloga bez fosfata, -P_i). Potom je odgovarajući alikvot stanica precijepljen u podlogu bez fosfata, nakon čega je u alikvot kulture stanica koje su prethodno bile tretirane rapamicinom, ponovno dodan rapamicin u finalnoj koncentraciji od 1 µg/mL (+Rap), dok u onaj koji nije bio tretiran rapamicinom, isti nije dodan (-Rap). Nakon toga se u određenim vremenskim intervalima mjerila aktivnost enzima kisele fosfataze, produkta ekspresije gena *PHO5*.



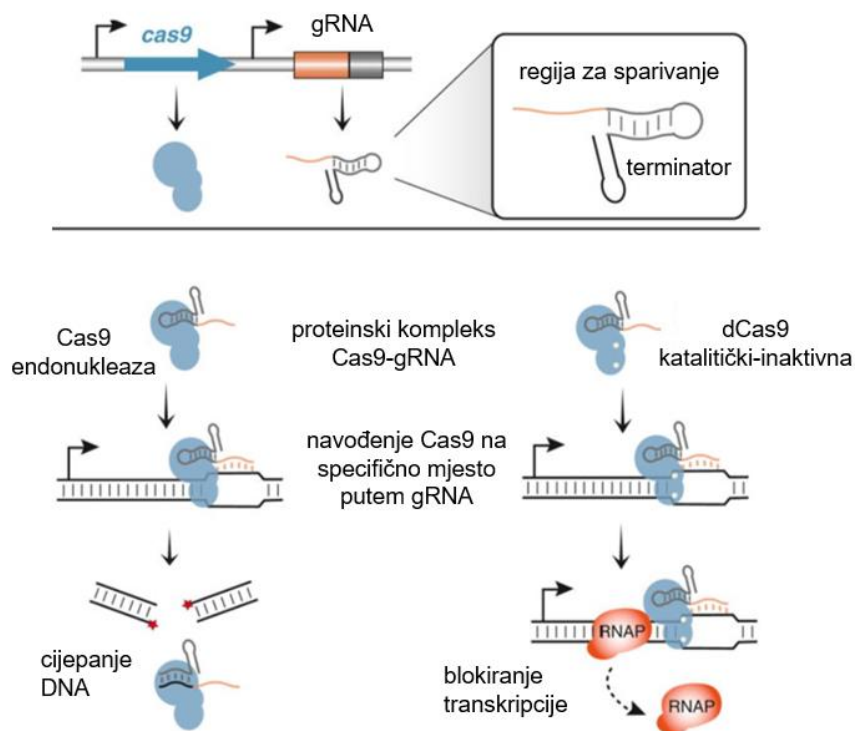
Slika 7. Aktivacija transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama kvasca Nrd1-AA bez (-Rap) i sa dodatkom rapamicina (+Rap) uz predtretman rapamicinom u trajanju od 1 h. Stanice su uzgajane pri 30°C na rotacijskoj tresilici u uvjetima represije gena *PHO5*. Tada su u tim istim uvjetima uzgajane uz dodatak rapamicina, nakon čega su prebačene u podlogu koja ne sadrži fosfat (inducibilni uvjeti) u koju je ponovno dodan rapamicin. Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Na slici **7** prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti enzima kisele fosfataze. Ovakvim pristupom, odnosno predtretmanom stanicama rapamicinom tijekom 1 h prije precjepljivanja u uvjete indukcije, pokazan je drastičniji efekt inaktivacije NNS kompleksa na ekspresiju gena *PHO5* u odnosu na rezultate mjerenja na slici **6**. Kao i u prethodnom eksperimentu, potvrđen je negativan utjecaj inaktivacije NNS kompleksa na kinetiku ekspresije gena *PHO5*, ali ne i na prekonocnu razinu ekspresije. Zanimljivo, stanice kvasca Nrd1-AA tretirane rapamicinom (+Rap) pokazale su nešto više prekonocne vrijednosti aktivnosti kisele fosfataze od istih stanica bez tretmana rapamicinom (-Rap) u oba eksperimenta (slike **6** i **7**), međutim, takav učinak ostaje nerazjašnjen. Drastičniji negativni efekt inaktivacije NNS kompleksa u ovom je eksperimentu vidljiv pri inkubaciji stanica u uvjetima indukcije nakon 1,5 h i 3 h, pri kojima su sa stanicama mutanta Nrd1-AA tretiranim rapamicinom (+Rap) izmjerene niže aktivnosti kisele

fosfataze u odnosu na one izmjerene s istim stanicama bez tretmana rapamicinom (-Rap) (slika 7). To govori da je Anchor away tehnika u oba slučaja bila uspješna, samo je predtretmanom osiguran dulji vremenski period u kojem su se molekule proteina Nrd1 mogle eksportirati van jezgre, što je u skladu sa dobivenim jasnijim rezultatima. Zaključno, ovim dvama eksperimentima potvrđen je negativan regulatorni učinak *PHO5 antisense* RNA na kinetiku transkripcije gena *PHO5*, budući da zbog inaktivacije NNS kompleksa odnosno eksporta esencijalnog proteina Nrd1 iz jezgre, dolazi do prekida terminacije transkripcije ove *antisense* RNA i time njene stabilizacije.

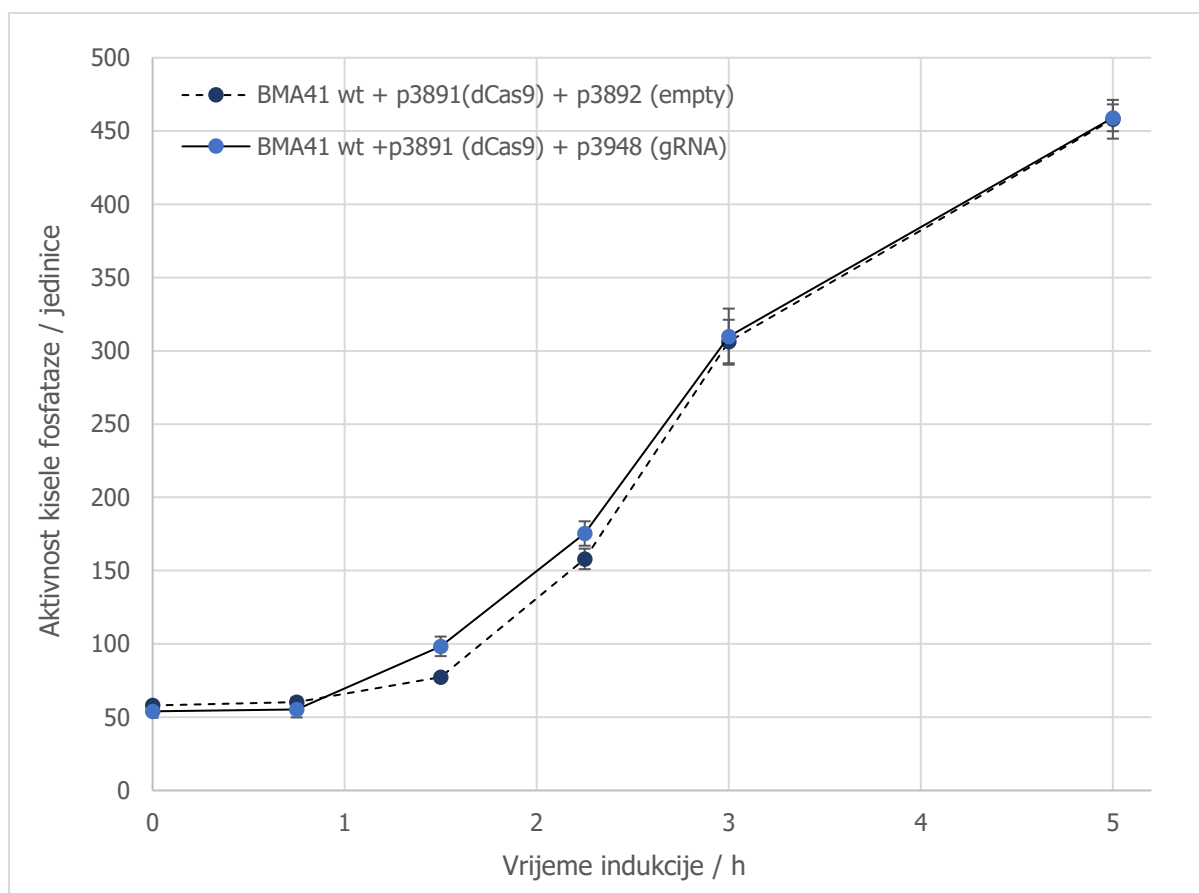
4.2. Sustavom CRISPRi ciljano je blokirana transkripcija *PHO5 antisense* RNA, što ima pozitivan utjecaj na kinetiku aktivacije transkripcije gena *PHO5*

Prethodnim eksperimentima sa sojem Nrd1-AA postignuto je nakupljanje i stabilizacija *PHO5 antisense* RNA, što je imalo negativan regulatorni učinak na ekspresiju gena *PHO5*. Idući cilj bio je provjeriti kakav će utjecaj na razinu transkripcije gena *PHO5* imati obustavljanje transkripciju *antisense* RNA. Ukoliko je nakupljanje *antisense* RNA rezultiralo negativno, onda bi očekivani rezultat zaustavljanja njene sinteze bio ispoljavanje pozitivnog regulatornog učinka. Kako bi se postigao ciljani prekid sinteze *PHO5 antisense* RNA, korišten je CRISPRi sustav s katalitički-inaktivnom endonukleazom Cas9 (dCas9) i molekulom gRNA koja specifično navodi dCas9 na regiju unutar gena *PHO5* na kojoj dolazi do transkripcije *antisense* RNA. Korištenjem inaktivnog dCas9 neće doći do cijepanja DNA (slika 8), već će on poslužiti kao sterička prepreka RNA polimerazi i time blokirati transkripciju *antisense* RNA. Budući da CRISPRi sustav nije originalno prisutan u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, protein dCas9 eksprimiran je s odgovarajućeg centromernog plazmida p3891, a stanice su također sadržavale plazmid za ekspresiju odgovarajuće gRNA (p3948) ili istovjetan prazni plazmid (p3892).



Slika 8. Shematski prikaz djelovanja CRISPR/Cas9 sustava kada je Cas9 aktivan ili inaktivan.

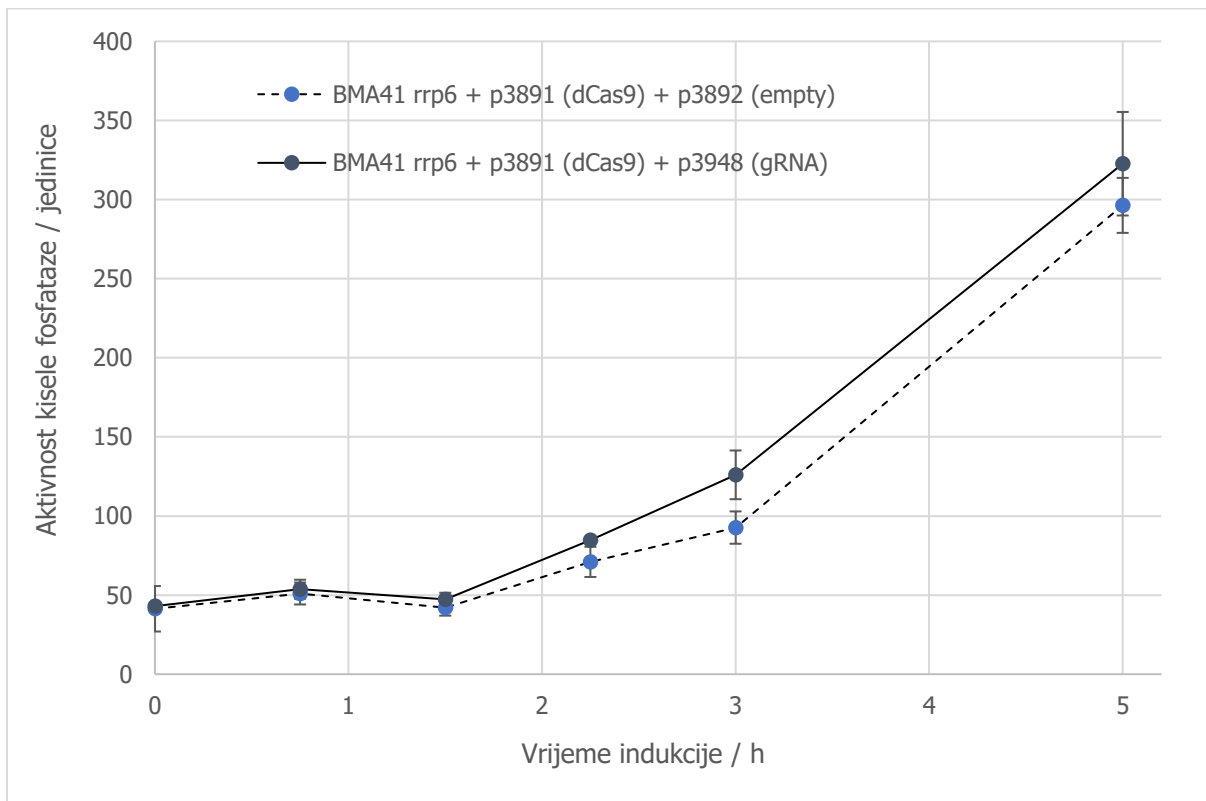
Stanice divljeg tipa kvasca BMA41 te pripadajućeg mutanta *rrp6* uzgajane su u podlozi sa visokom koncentracijom fosfata (uvjeti represije gena *PHO5*, +P_i) do logaritamske faze rasta. Podloga u kojoj su stanice uzgajane nije sadržavala uracil i leucin kako bi se osiguralo da u podlozi rastu samo one stanice koje u sebi imaju plazmide za ekspresiju komponenti CRISPRi sustava. Zatim je odgovarajući alikvot stanica precijepljen u podlogu bez fosfata (uvjeti indukcije gena *PHO5*, -P_i), koja također nije sadržavala uracil i leucin, nakon čega se u određenim vremenskim intervalima mjerila aktivnost enzima kisele fosfataze, produkta ekspresije gena *PHO5*.



Slika 9. Aktivacija transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama kvasca divljeg tipa BMA41 (wt). Stanice su uzgajane pri 30°C na rotacijskoj tresilici u uvjetima represije gena *PHO5* nakon čega su prebaćene u podlogu koja ne sadrži fosfat (inducibilni uvjeti). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Na slici 9 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti enzima kisele fosfataze u stanicama divljeg tipa s plazmidom s kojeg se eksplicira dCas9 (p3891) te plazmidom s kojeg se eksplicira gRNA (p3948) ili odgovarajućim praznim plazmidom (p3892). Ranije je RNA sekvenciranjem pokazano kako se u stanicama divljeg tipa akumulira mali broj *antisense* RNA, budući da su one ubrzo nakon sinteze degradirane RNA egzozomom (Castelnuovo i sur., 2014). Ipak, blokiranje sinteze *PHO5 antisense* RNA pomoću sustava CRISPRi imalo je pozitivan učinak na kinetiku transkripcije gena *PHO5* (slika 9). Primijećeno je kako u stanicama u kojima dolazi do ekspresije cjelovitog CRISPRi sustava (dCas9 i gRNA) dolazi do brže kinetike aktivacije transkripcije gena *PHO5* nego u stanicama u kojima dolazi samo do ekspresije proteina dCas9, pri čemu je ovaj efekt bio najprimjetniji nakon inkubacije stanica u uvjetima indukcije tijekom 1,5 h, a je već nakon 3 h indukcije došlo do izjednačavanja razine

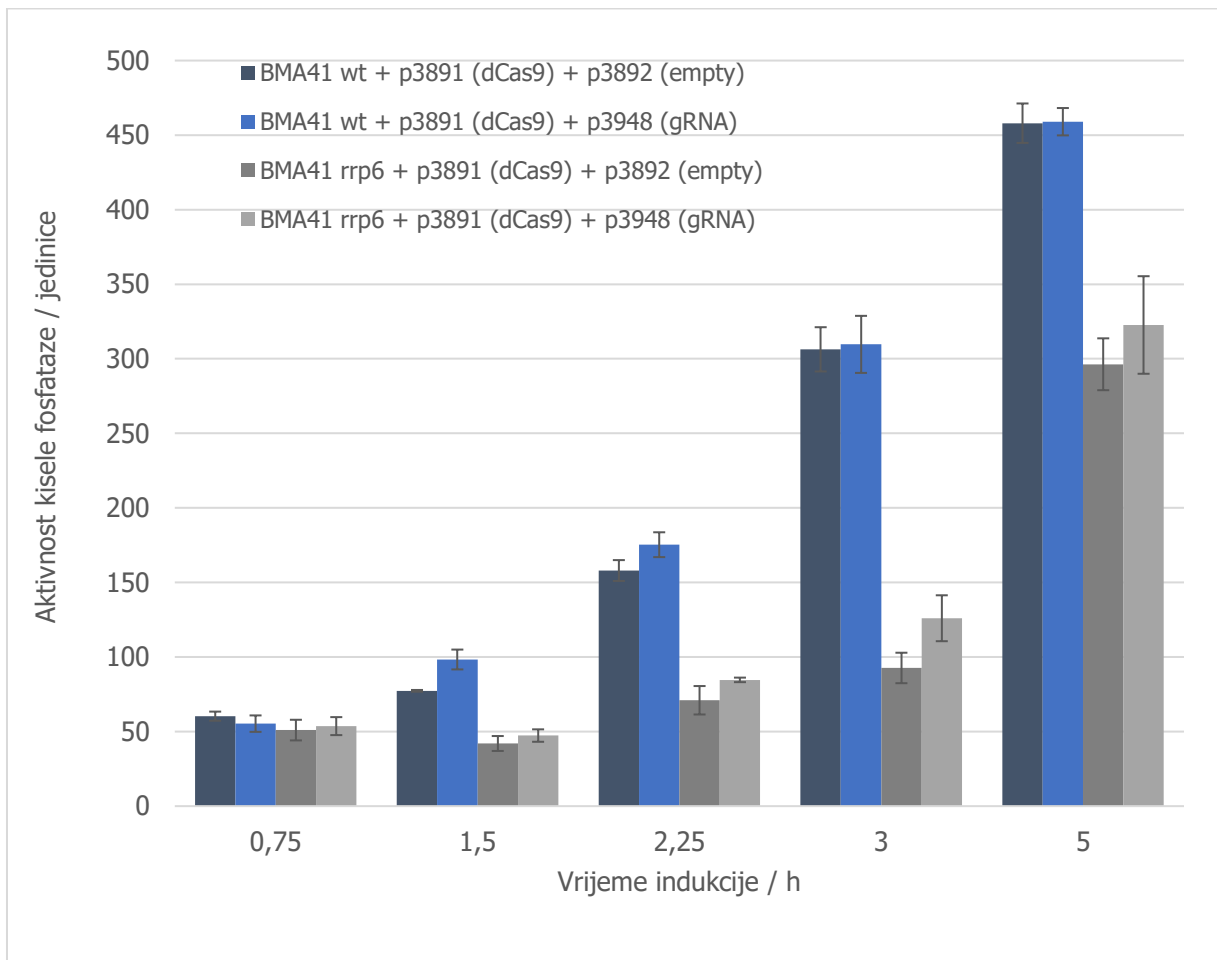
transkripcije između ovih stanica. Ovakvi rezultati potvrđuju prethodni zaključak da *antisense* RNA negativno regulira transkripciju gena *PHO5* i proširuju ga spoznajom da se njen regulatorni učinak očituje već u stanicama divljeg tipa u kojima ovaj tip transkripata nije dodatno stabiliziran. S druge strane, postoji mogućnost kako CRISPRi sustavom nije u potpunosti obustavljena sinteza *PHO5 antisense* RNA, zbog slabe efikasnosti CRISPRi sustava pri blokiranju transkripcije, zbog čega razlike u izmjenjenim vrijednostima nisu većih razmjera. Shodno tome, sličan eksperiment proveden je sa stanicama mutanta kvasca *rrp6*, u kojima je inaktivna katalitička podjedinica RNA egzosoma Rrp6 koja procesira i degradira *antisense* RNA te u čijem odsustvu dolazi do njihove stabilizacije (slika 10).



Slika 10. Aktivacija transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama kvasca BMA41 *rrp6*. Stanice su uzgajane pri 30°C na rotacijskoj tresilici u uvjetima represije gena *PHO5* nakon čega su prebačene u podlogu koja ne sadrži fosfat (inducibilni uvjeti). Prikazana odstupanja od srednjih vrijednosti predstavljaju standardnu devijaciju rezultata barem tri neovisno ponovljena eksperimenta.

Na slici 10 prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti enzima kisele fosfataze u stanicama *rrp6* s pripadajućim plazmidima s kojih se eksprimira dCas9, sa ili bez ekspresije odgovarajuće

gRNA. U stanicama mutanta *rrp6* dolazi do stabilizacije *antisense* RNA zbog inaktivacije proteina koji ih degradira (Castelnuovo i sur., 2014). Kao i sa stanicama divljeg tipa, sa stanicama mutanta *rrp6* pokazan je pozitivan učinak zaustavljanja transkripcije *PHO5 antisense* RNA na kinetiku transkripcije gena *PHO5* (slika 10). Ipak, dok se efekt kod stanica divljeg tipa najjasnije vidio nakon 1,5 h indukcije, isti efekt u stanicama *rrp6* najznačajniji je nakon 3 h indukcije (slika 10). Budući da korištenje CRISPRi sustava nije dovelo do izjednačavanja razine ekspresije gena *PHO5* u stanicama *rrp6* s onog postignutom sa stanicama divljeg tipa (slika 11), može se zaključiti da efikasnost CRISPRi sustava baziranog na dCas9 nije velikog razmjera.



Slika 11. Aktivacija transkripcije gena *PHO5* praćena je mjerenjem aktivnosti enzima kisele fosfataze sa stanicama kvasca divljeg tipa BMA41 (wt) i izogenog mutanta *rrp6*. Prikazani rezultati istovjetni su onima prikazanim na slikama 9 i 10.

Zaključno, pokazan je negativni regulatorni utjecaj *antisense* RNA na regulaciju ekspresije gena *PHO5*. Poticanjem nakupljanja *PHO5 antisense* RNA, uslijed inaktivacije NNS kompleksa koji je zaslužan za terminaciju njene transkripcije, postignuta je sporija kinetika aktivacije transkripcije gena *PHO5*. S druge strane, zaustavljanjem transkripcije *antisense* RNA pomoću CRISPRi sustava postignuta je brža kinetika aktivacije transkripcije gena *PHO5*, čime je dodatno potvrđen je negativni regulatorni utjecaj ovog transkripta na transkripciju gena *PHO5* u stanicama divljeg tipa i mutanta *rrp6*. Ovo saznanje olakšat će daljnje istraživanje *antisense* RNA i njihovih uloga, ali i odigrati ključnu ulogu u shvaćanju mehanizma putem kojeg djeluju. Budući da gen *PHO5* predstavlja modelni eukariotski gen za istraživanje remodeliranja strukture kromatina povezanim s regulacijom transkripcije, idući eksperimenti bit će fokusirani na istraživanje mogućeg regulatornog djelovanje *antisense* RNA putem kromatin-modificirajućih i kromatin-remodelirajućih kompleksa.

5. ZAKLJUČCI

1. Inaktivacija NNS kompleksa, postignuta rapamicin-induciranim eksportom podjedinice Nrd1 iz jezgre, rezultira sporijom kinetikom aktivacije transkripcije gena *PHO5*.
2. Ciljana obustava transkripcije *PHO5 antisense* RNA, postignuta CRISPRi sustavom, ima pozitivan učinak na kinetiku aktivacije transkripcije gena *PHO5*. Ovakav učinak ispoljava se u stanicama divljeg tipa te u stanicama mutanta *rrp6* u kojima je inaktivirana ribonukleaza koja degradira ovaj transkript.
3. *Antisense* RNA ima važnu negativnu regulatornu ulogu u regulaciji transkripcije gena *PHO5* kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

6. POPIS LITERATURE

- Ard, R., Allshire, R. C. i Marquardt, S. (2017) 'Emerging Properties and Functional Consequences of', 207(October), pp. 357–367.
- Arigo, J. T. i sur. (2006) 'Termination of Cryptic Unstable Transcripts Is Directed by Yeast RNA-Binding Proteins Nrd1 and Nab3', *Molecular Cell*, 23(6), pp. 841–851.
- Auesukaree, C. i sur. (2004) 'Intracellular Phosphate Serves as a Signal for the Regulation of the PHO Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), pp. 17289–17294.
- 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), pp. 3540–3547.
- Camblong, J. i sur. (2007) 'Antisense RNA Stabilization Induces Transcriptional Gene Silencing via Histone Deacetylation in *S. cerevisiae*', *Cell*, 131(4), pp. 706–717.
- Castelnuovo, M. i sur. (2014) 'Role of histone modifications and early termination in pervasive transcription and antisense-mediated gene silencing in yeast', *Nucleic Acids Research*, 42(7), pp. 4348–4362.
- Duina, A. A., Miller, M. E. i Keeney, J. B. (2014) 'Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system', *Genetics*, 197(1), pp. 33–48.
- Eddy, S. R. (2001) 'Non-coding RNA genes and the modern RNA world', *Nature Reviews Genetics*, 2(12), pp. 919–929.
- Gill, J. K. i sur. (2020) 'Fine Chromatin-Driven Mechanism of Transcription Interference by Antisense Noncoding Transcription', *Cell Reports*, 31(5).
- Goffeau, A. i sur. (1996) 'Life with 6000 genes', *Science*, 274(5287), pp. 546–567.
- Hager, G. L., McNally, J. G. i Misteli, T. (2009) 'Transcription Dynamics', *Molecular Cell*, 35(6), pp. 741–753.
- Han, Z. i sur. (2020) 'Termination of non-coding transcription in yeast relies on both an RNA Pol II CTD interaction domain and a CTD-mimicking region in Sen1', *The EMBO Journal*, 39(7).
- Haruki, H., Nishikawa, J. i Laemmli, U. K. (2008) 'The Anchor-Away Technique: Rapid, Conditional Establishment of Yeast Mutant Phenotypes', *Molecular Cell*, 31(6), pp. 925–932.
- Hereford, L. M. i Hartwell, L. H. (1974) 'Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis', *Journal of Molecular Biology*, 84(3), pp.

445–456.

- Iborra, F. J., Jackson, D. A. i Cook, P. R. (2001) 'Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells', *Science*, 293(5532), pp. 1139–1142.
- Januszyk, K. i Lima, C. D. (2014) 'The eukaryotic RNA exosome', *Current Opinion in Structural Biology*, 24(1), pp. 132–140.
- Kaikkonen, M. U. i Adelman, K. (2018) 'Emerging Roles of Non-Coding RNA Transcription', *Trends in Biochemical Sciences*, 43(9), pp. 654–667.
- Karathia, H. i sur. (2011) 'Saccharomyces cerevisiae as a model organism: A comparative study', *PLoS ONE*, 6(2).
- Khorkova, O. i sur. (2014) 'Natural antisense transcripts', *Human Molecular Genetics*, 23(R1).
- Korber, P. and Barbaric, S. (2014) 'The yeast PHO5 promoter: From single locus to systems biology of a paradigm for gene regulation through chromatin', *Nucleic Acids Research*, 42(17), pp. 10888–10902.
- Mattick, J. S. i Makunin, I. V. (2006) 'Non-coding RNA.', *Human molecular genetics*, 15 Spec No(1), pp. 17–29.
- Münsterkötter, M., Barbaric, S. i Hörz, W. (2000) 'Transcriptional regulation of the yeast PHO8 promoter in comparison to the coregulated PHO5 promoter', *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), pp. 22678–22685.
- Nakao, J. i sur. (1986) 'Saccharomyces cerevisiae PHO5 promoter region: location and function of the upstream activation site.', *Molecular and Cellular Biology*, 6(7), pp. 2613–2623.
- Novačić, A. i sur. (2020) 'Non-coding RNAs as cell wall regulators in Saccharomyces cerevisiae', *Critical Reviews in Microbiology*, 46(1), pp. 15–25.
- Oshima, Y. (1997) 'The phosphatase system in Saccharomyces cerevisiae', *Genes and Genetic Systems*, 72(6), pp. 323–334.
- Pelechano, V. i Steinmetz, L. M. (2013) 'Gene regulation by antisense transcription', *Nature Reviews Genetics*, 14(12), pp. 880–893.
- Qi, L. S. i sur. (2013) 'Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression', *Cell*, 152(5), pp. 1173–1183.
- Redman, M. i sur. (2016) 'What is CRISPR/Cas9?', *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 101(4), pp. 213–215.
- Stead, J. A. i sur. (2007) 'The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor Rrp47p, a nucleic acid-binding protein', *Nucleic Acids Research*, 35(16), pp. 5556–5567.
- Steinmetz, E. J. i sur. (2001) 'RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts', *Nature*, 413(6853), pp. 327–331.

- Svaren, J. i Hörz, W. (1997) 'Transcription factors vs nucleosomes: Regulation of the PHO5 promoter in yeast', *Trends in Biochemical Sciences*, 22(3), pp. 93–97.
- Tamarin, (1999) Tamarin: Principles of Genetics, 7. izd., The McGraw–Hill Companies, 443–465.
- Till, P., Mach, R. L. i Mach-Aigner, A. R. (2018) 'A current view on long noncoding RNAs in yeast and filamentous fungi', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(17), pp. 7319–7331.
- Tudek, A., Candelli, T. i Libri, D. (2015) 'Non-coding transcription by RNA polymerase II in yeast: Hasard or nécessité?', *Biochimie*, 117, pp. 28–36.
- Vasiljeva, L. i Buratowski, S. (2006) 'Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts', *Molecular Cell*, 21(2), pp. 239–248.
- Vogel, K., Hörz, W. i Hinnen, A. (1989) 'The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with PHO5 upstream activation regions.', *Molecular and Cellular Biology*, 9(5), pp. 2050–2057.
- Wang, H., La Russa, M. i Qi, L. S. (2016) 'CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond', *Annual Review of Biochemistry*, 85, pp. 227–264.

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.

Jurica Ljubas