

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Lucija Štrbac, Marina Oskomić

**Utjecaj RNA egzosoma na manozilaciju proteina i vijabilnost stanica kvasca  
*Saccharomyces cerevisiae***

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Igora Stuparevića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

# Sadržaj

UVOD.....	1
1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	1
1.1. Stanična stijenka kvasca <i>S. cerevisiae</i> .....	2
2. Sekretorni put eukariotskih stanica .....	4
2.1. Glikozilacija proteina kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
2.1.1. Gen <i>PSA1</i> kvasca <i>S. cerevisiae</i> .....	11
3. Eukariotski RNA egzozom .....	12
OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	17
MATERIJALI I METODE .....	18
1. Materijali .....	18
1.1. Kemikalije i enzimi.....	18
1.2. Otopine.....	19
1.3. Sojevi kvasca .....	19
1.4. Sojevi bakterija.....	20
1.5. Plazmidi.....	20
1.5.1. Plazmid YEp352 .....	20
1.5.2. Plazmid YEp352- <i>PSA1</i> .....	20
1.6. Hranjive podloge za uzgoj bakterija.....	21
1.7. Hranjive podloge za uzgoj kvasca .....	22
1.7.1. Drop out .....	22
2. Metode.....	22
2.1. Transformacija DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> kompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i> .....	22
2.2. Izolacija plazmidne DNA iz <i>E. coli</i> (miniprep).....	23

2.3. Restriksijska analiza .....	23
2.4. Transformacija kvasca LiAc metodom .....	23
2.5. Gel elektroforeza .....	24
2.6. Test rasta (engl. <i>plate assay</i> ) .....	24
REZULTATI.....	25
4. Umnažanje i restriksijska analiza plazmida za prekomjernu ekspresiju gena <i>PSA1</i> .....	28
4.1. Transformacija bakterije <i>Escherichia coli</i> i izolacija plazmida YEp352 i YEp352- <i>PSA1</i> .....	28
4.2. Restriksijska analiza plazmida YEp352 i YEp352- <i>PSA1</i> .....	30
5. Utjecaj prekomjerne ekspresije gena <i>PSA1</i> na vijabilnost i morfologiju stanica <i>S. cerevisiae</i> u kojima su inaktivirane podjedinice i kofaktor RNA egzosoma tijekom uzgoja pri povišenoj temperaturi.....	31
5.1. Utjecaj prekomjerne ekspresije gena <i>PSA1</i> na vijabilnost i morfologiju stanica mutanta <i>rrp6</i> tijekom uzgoja na povišenoj temperaturi.....	33
5.2. Utjecaj prekomjerne ekspresije gena <i>PSA1</i> na vijabilnost i morfologiju stanica mutanta <i>rrp47</i> tijekom uzgoja na povišenoj temperaturi.....	35
5.3. Utjecaj prekomjerne ekspresije gena <i>PSA1</i> na vijabilnost i morfologiju katalitičkih mutanata Dis3 podjedinice tijekom uzgoja na povišenoj temperaturi .....	37
RASPRAVA.....	40
ZAKLJUČCI.....	45
ZAHVALE.....	46
POPIS LITERATURE .....	47

## UVOD

### 1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

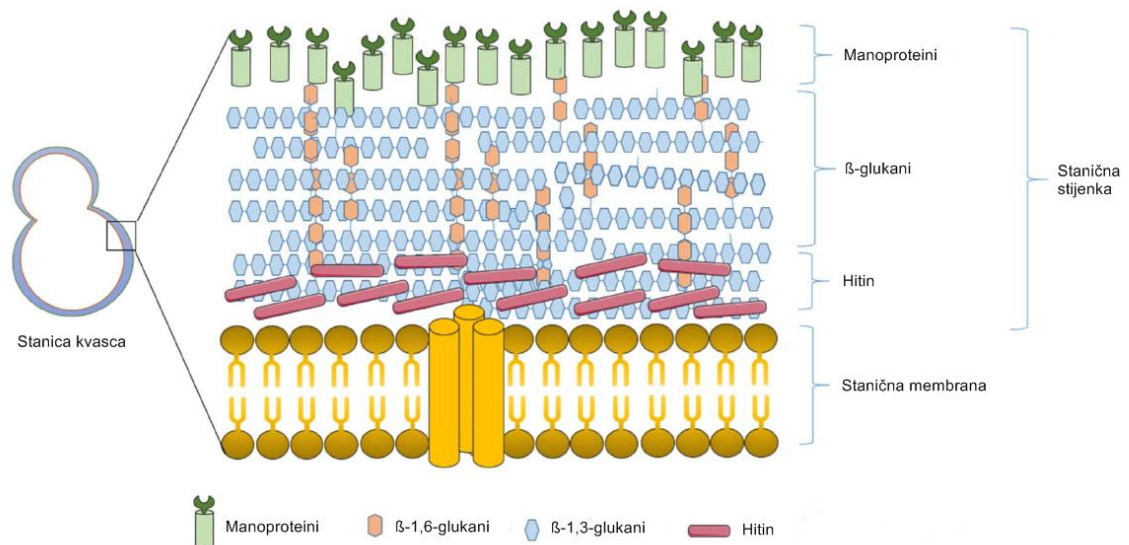
Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je organizam koji pripada carstvu gljiva. Poznat je pod nazivima pekarski kvasac i pivski kvasac, budući da se stoljećima koristi u tradicionalnoj biotehnologiji prilikom proizvodnje kruha i alkohola (Mortimer, 2000). Znanstveno ime *Saccharomyces cerevisiae* potječe od asocijacije ove gljive (-myces) sa šećerima (*Saccharo-*) te njene primjene u proizvodnji piva ili 'cerevisia' (*cerevisiae*). Genom *S. cerevisiae* sekvenciran je 1996. godine (Goffeau i sur., 1996), što čini *S. cerevisiae* prvim eukariotskim organizmom kojemu je u potpunosti sekvenciran genom. Sekvenciranje genoma pridonijelo je upotrebi *S. cerevisiae* u istraživanju biokemijskih procesa, čime postaje modelni organizam te jedan od najistraživanijih i najbolje okarakteriziranih eukariota. Razlog korištenja kvasca kao modelnog organizma omogućuju brojne prednosti kvasca u odnosu na druge modelne organizme, koje olakšavaju njegovo korištenje u istraživačke svrhe, posebice u genetičkom inženjerstvu. Na primjer, *S. cerevisiae* ima sličnosti s višim eukariotima, kao što su kompleksnost unutarstanične organizacije, signalni sustav stanice, membranski transport, metabolizam lipida, mitohondrijski import itd. Obzirom na homologiju s genima viših eukariota, istraživanja molekularnih procesa u stanicama kvasca relevantna su i za stanice viših eukariota (Karathia i sur., 2011). Njegova prednost očituje se i u lakom, brzom i jeftinom laboratorijskom uzgoju. Kvasac ima kratko generacijsko vrijeme koje iznosi oko 90 minuta u potpunom mediju, može se kratkotrajno čuvati na hranjivim podlogama na 4°C te dugotrajno u glicerolu na -80°C. Međutim, njegova najveća prednost je laka manipulacija genoma, koja je omogućila korištenje kvasca u modernim biotehnološkim procesima i znanstvenim istraživanjima, poput proizvodnje lijekova (Nielsen, 2013), istraživanja ljudskih bolesti (Steinmetz i sur., 2002) i istraživanja starenja (Zimmermann i sur., 2018). Stanice kvasca mogu biti u haploidnom ili diploidnom obliku. Haploidna stanica može biti  $\alpha$  ili  $a$  tipa parenja te ima

16 kromosoma, dok je diploidna  $a/\alpha$  tipa parenja te ima 32 kromosoma (Duina i sur., 2014). Tip parenja određen je informacijom kodiranom lokusom *MAT* na III. kromosomu. Ako se u tom lokusu nalazi sekvenca *MATa*, kvasac je *a* tipa parenja, a ako se u tom lokusu nalazi sekvenca *MAT $\alpha$* , kvasac je  $\alpha$  tipa parenja (Tamarin, 1999). Haploidni i diploidni oblik, u povoljnim uvjetima koji uključuju fiziološku temperaturu rasta, dovoljno kisika i nutrijenata, podložni su mitotičkoj diobi, odnosno pupanju. U nepovoljnim uvjetima, iz diploidnih stanica kvasca mogu mejozom nastati četiri spore (Duina i sur., 2014). Istraživanjima mejoze i mitoze, kao sastavnih dijelova životnog ciklusa kvasca, paralelno se dobivaju i relevantna saznanja primjenjiva na kompleksnije eukariotske organizme.

### 1.1. Stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae*

Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* obavlja ekstracelularna struktura, stanična stijenka. Stanična stijenka kvasca osigurava oblik stanice, čvrstoću, zaštitu od mehaničkog stresa te osmotsku stabilnost (Klis, 1994). Struktura stanične stijenke stalno se mijenja kako bi se prilagodila različitim fiziološkim procesima u stanici. Čvrsta, ali i fleksibilna struktura stijenke remodelira se prilikom vegetativne proliferacije, morfogeneze izazvane feromonima tijekom parenja te filamentacije u stresnim uvjetima (Cid, 1995; Harold, 2002). Stanična stijenka predstavlja selektivnu barijeru prilikom razmjene raznovrsnih molekula između stanice i njene okoline, čime doprinosi održavanju osmotske stabilnosti. Osmotski tlak *S. cerevisiae* je, kao i u ostalim organizmima sa staničnom stijenkom, u citoplazmi viši nego izvan stanice. Stanice kvasca održavaju unutarstaničnu osmolarnost na način da pritisak uvjetovan koncentracijskim gradijentom jednoliko raspoređuju po površini stanične stijenke (Hohmann, 2002). Obzirom da nagli ulaz vode u stanicu narušava uvjete unutarstaničnih reakcija i izaziva pojačano bubrenje, koje dovodi do pucanja stanične membrane, strukturu stanične stijenke obilježava visoki stupanj elastičnosti (Klis i sur., 2006). Stanična stijenka čini oko 20% suhe tvari stanice, od čega je 90% ugljikohidrata i 10% proteina, ali taj sastav može varirati ovisno

o soju i okolišnim uvjetima (Fleet, 1985; Aguilar-Uscanga i François, 2003). Građena je od dva sloja koji se strukturno i funkcionalno razlikuju: unutarnji sloj stanične stijenke tvore polisaharidni polimeri  $\beta$ -glukani ( $\beta$ -1,3-glukan i  $\beta$ -1,6-glukan) umreženi s hitinom, a vanjski sloj glikozilirani manoproteini (Latgé, 2007; Orlean, 2012) (Slika 1). Unutarnji sloj stanične stijenke osigurava osmotsku i mehaničku stabilnost, dok vanjski sloj određuje permeabilnost stijenke i ujedno djeluje kao zaštita glukanskog sloja od stranih enzima (De Nobel i Barnett, 1990). Elastičnosti stijenke doprinose molekule  $\beta$ -1,3-glukana zbog svojeg zavojitog oblika. Nereducirajući krajevi tih molekula mjesto su vezanja drugih polisaharida, uglavnom razgranatih lanaca  $\beta$ -1,6-glukana (Mrša, 1993). Vodotopljivi razgranati polimer  $\beta$ -1,6-glukan kovalentno se veže na  $\beta$ -1,3-glukan, hitin i manoproteine povezujući sve komponente stanične stijenke (Kollar i sur., 1997). Hitin je linearni polimer građen od N-acetilglukozamina povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom. Tijekom pupanja gradi primarni septum između stanice majke i stanice kćeri, stoga je zastupljen na vratu pupa (Shaw i sur., 1991). Manoproteini su glikozilirani proteini s visokim sadržajem manoze, koja se kovalentno veže na proteine u procesu postsintetske modifikacije. Kompozicija stijenke je koordinirana staničnim ciklusom, kojim je regulirana ekspresija velikog broja gena koji kodiraju za proteine stijenke (Caro i sur., 1998).



**Slika 1.** Struktura stanične stijenke kvasca (Anwar i sur., 2017).

## 2. Sekretorni put eukariotskih stanica

Sekrecija proteina izuzetno je važan proces eukariotskih stanica. Različiti proteini potrebni su u različitim dijelovima stanice ili izvan nje s ciljem ostvarenja njihove funkcije, modifikacije ili degradacije, a transport velikog broja proteina do ciljnog mjesta omogućuje sekretorni put (Yuxiang i sur., 2017). Istraživanja defekata u sekreciji proteina pokazala su povezanost s ljudskim bolesti poput Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti, dijabetesa, ateroskleroze, ishemije te bolesti srca i jetre (Yoshida, 2007). Kvasac, kao modelni organizam, omogućio je uvid u molekularne mehanizme koji uzrokuju navedene bolesti (Coughlan i Brodsky, 2005). Kod eukariota, sekretorne proteine predstavljaju topljivi te membranski proteini endoplazmatskog retikuluma (ER), proteini lumena Golgijevog aparata i lizosoma, integralni proteini membrana svih staničnih organela i stanične membrane te proteini koje stanica izlučuje u izvanstanični prostor (Feyder i sur., 2015). Proteini u pravilu sadrže specifične sekvence kojima je njihov transport usmjeren za određeni dio stanice. Krajnja odredišta su stanične organele, stanična membrana ili izvanstanični prostor, a pravilno sortiranje proteina sekretornog puta omogućeno je signalnom sekvencom, odnosno nizom 16-30 aminokiselinskih ostataka samog polipeptida. Signalna sekvenca kojom se protein usmjerava u sekretorni put je jedan ili više pozitivno nabijenih aminokiselinskih ostataka nakon čega slijedi niz hidrofobnih aminokiselinskih ostataka, koji se nalaze na samom početku polipeptidnog lanca (von Heijne, 1985). Kako bi se omogućio transport proteina do različitih dijelova stanice, proteini putuju malim unutarstaničnim, membranski-obavijenim mjehurićima, vezikulama. Transport koji uključuje vezikulu kao medij za prijenos zasniva se na molekulskim mehanizmima koji osiguravaju precizno dostavljanje vezikule do akceptorskog mjesta (Bonifacino i Glick, 2004).

Inicijacija sekretornog puta započinje transportom proteina kroz membranu endoplazmatskog retikuluma (ER) (Slika 2), gdje se odvija njihovo smatanje i modifikacija (Barlowe i Miller, 2013). Na primjer, ER je ključan za prve korake glikozilacije proteina (Lehle,



1992). Translokacija proteina do ER-a obavlja se simultano s procesom translacije, odnosno na ribosomima lokaliziranim na membrani ER-a. Kotranslacijska translokacija za vrijeme odvijanja translacije istovremeno vrši i transport proteina u lumen ER-a, a za njeno pravilno odvijanje nužna je prisutnost transportiranog proteina, ribosoma, signalne jedinice za prepoznavanje (engl. *signal recognition particle*, SRP), signalnog receptora za prepoznavanje (engl. *signal recognition receptor*, SR) te Ssh1 ili Sec61 translokacijske pore (Brown i sur., 1994; Siegel i sur., 1987). SRP prepoznaje signalni peptid te odvodi ribosom do ER-a, gdje se veže na površinske receptore. Ribosom nastavlja translaciju te simultano dolazi do uvođenja proteina kroz translokacijsku poru u lumen ER-a (Barlowe i Miller, 2013). Reakciju odcjepijavanja signalnog peptida katalizira signalna peptidaza, membranski vezan proteolitički enzim (Wild i sur., 2004).

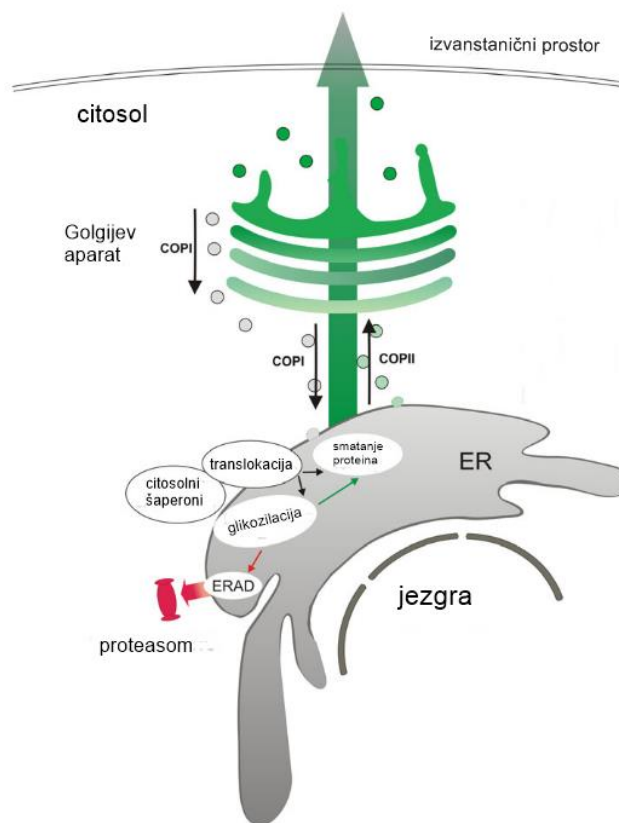
Osim kotranslacijske, moguća je i posttranslacijska translokacija. Takva translokacija karakterizira proteine koji se translociraju nakon završene translacije (Yuxiang i sur., 2017). Nakon translacije, ostaju u citosolu, usmjeravaju se u sekretorni put ili se transportiraju do mitohondrija, kloroplasta, peroksisoma ili jezgre. Posttranslacijska translokacija sekretornog puta zahtijeva prisutnost heptamerskog SEC kompleksa te šaperona, koji će omogućiti prijenos proteina otpuštenih s ribosoma u odmotanoj konformaciji, kako bi se spriječila njihova agregacija ili smatanje, što bi onemogućilo transport kroz translokacijsku poru (Plath i Rapoport, 2000; Willer i sur., 2003). No, oba načina translokacije koriste isti translokacijski kanal, kompleks Sec61. Kvasac *S. cerevisiae* ima dvije translokacijske pore, komplekse Sec61 i Ssh1. Sec61 sastoji se od tri proteinske podjedinice Sec61, Sbh1 i Sss1 (Osborn, i sur., 2005), pri čemu su Sec61 i Sss1 esencijalni za proteinsku translokaciju te vijabilnost stanica (Rapoport, 2007). Tijekom posttranslacijskog načina transporta, Sec61 dio je heptamerskog SEC kompleksa (Jermy i sur., 2006). Međutim, biološka funkcija i važnost Ssh1 kompleksa nije razjašnjena. Poznato je kako otprilike 50 do 60% analiziranih proteinskih supstrata koji se u ER transportiraju kotranslacijski kao ciljni kompleks koriste Ssh1 (Finke i sur., 1996). Nedostatkom komponente Ssh1 kompleksa, put supstrata se mijenja te kao ciljni kompleks

koriste Sec61. Preklapajuće uloge Sec61 i Ssh1 kompleksa pokazane su delecijom *SSH1* u stanicama *sec61* mutanta, koja je rezultirala fenotipom izrazito otežanog rasta (Finke i sur., 1996; Jiang i Ferro-Novick, 1994).

Molekulski šaperoni dio su obitelji proteina temperaturnog šoka (Hsp70) te ključne komponente zaslužne za smatanje proteina, njihovu degradaciju, translokaciju te protein-protein interakcije. Sudjeluju u procesima pravilnog smatanja, razmatanja nepravilno smotanih proteina, pripremanja nepravilno smotanih proteina za degradaciju te sudjeluju u translokaciji proteina do ER-a i mitohondrija (Kampinga i Craig, 2013). U procesima modifikacije i smatanja proteina u ER-u kod *S. cerevisiae*, prisutni su brojni šaperoni pri čemu je bitno istaknuti Kar2, šaperon koji sudjeluje u translokaciji proteina kroz membranu ER-a, smatanju proteina u lumenu ER-a te usmjeravanju nepravilno smotanih proteina za stanični put koji degradira proteine povezane s endoplazmatskim retikulumom (engl. *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*, ERAD) (Matlack i sur., 1999). Uz šaperone koji su zaslužni za pravilno smatanje, važnu ulogu u postizanju konformacije proteina, imaju i disulfid izomeraze. Enzim disulfid izomeraza vrši formiranje i redukciju disulfidnih veza unutar novo-sintetiziranog proteina (Hatahet i Ruddock, 2009). U slučaju nakupljanja razmotanih ili krivo smotanih proteina u lumenu ER-a, aktivira se put stanice odgovoran za održavanje stanične homeostaze (engl. *unfolded protein response*, UPR). Aktivacijom UPR puta, inducira se ekspresija gena čiji proteinski produkti sudjeluju u smatanju proteina te ERAD putu. ERAD omogućuje retrotranslokaciju, odnosno vraćanje krivo smotanih proteina u citosol, poliubikvitinaciju te dostavljanje proteina do proteasoma za degradaciju (Smith i sur., 2011).

Obrađeni proteini zatim se prenose do Golgijevog aparata u svrhu dodatnih modifikacija (Slika 2), poput modifikacije glikozilnih skupina vezanih na proteine u ER-u. Prvi korak transporta proteina iz ER-a do Golgijevog aparata uključuje vezikule koje generira *coat* proteinski kompleks II (engl. *coat protein complex II*, COPII) (Lee i sur., 2004). Kada se COPII vezikula nađe u blizini Golgijevog aparata, površinskim vezujućim faktorima se veže, a Q-SNARE i R-SNARE proteinima fuzionira s Golgijevim aparatom (Barlowe i Miller, 2013). Zatim,

sekretorni proteini prolaze kroz Golgijev aparat. Za transport proteina Golgijevim aparatom, važnu ulogu imaju vezikule *coat* proteinskog kompleksa I (engl. *coat protein complex I*, COPI) (Yuxiang i sur., 2017). Dio modificiranih proteina ostaje u Golgijevom aparatu, gdje obavljaju svoju funkciju, a dio se transportira do svojih krajnjih odredišta, odnosno do stanične membrane, lizosoma ili u izvanstanični prostor (Feyder i sur., 2015). Ako proteini nemaju dodatne specifične oznake, usmjeravaju se prema površini stanice, gdje će se ugraditi u staničnu membranu ili izlučiti u izvanstanični prostor.



**Slika 2.** Sekretorni put proteina u stanicama kvasaca. Tijekom ili nakon sinteze u citosolu te vezanja na citosolne šaperone, proteini se translociraju do lumena endoplazmatskog retikuluma (ER), gdje je moguća njihova glikozilacija. U lumenu ER-a, protein se modificiraju, odnosno vrši se njihovo smatanje, koje provode enzimi i šaperoni. U slučaju nepravilnog smatanja, proteini se usmjeravaju u ERAD, stanični put koji će usmjeriti proteine do

proteasoma na degradaciju. Pravilno modificirani proteini se COPII vezikulama transportiraju do Golgijevog aparata. U drugom smjeru, aktivne su COPI vezikule, zaslužne za transport proteina Golgijevim aparatom. Dio proteina koji je ušao u sekretorni put ostaje u stanici, a dio se izlučuje u izvanstanični prostor (Delic i sur., 2013).

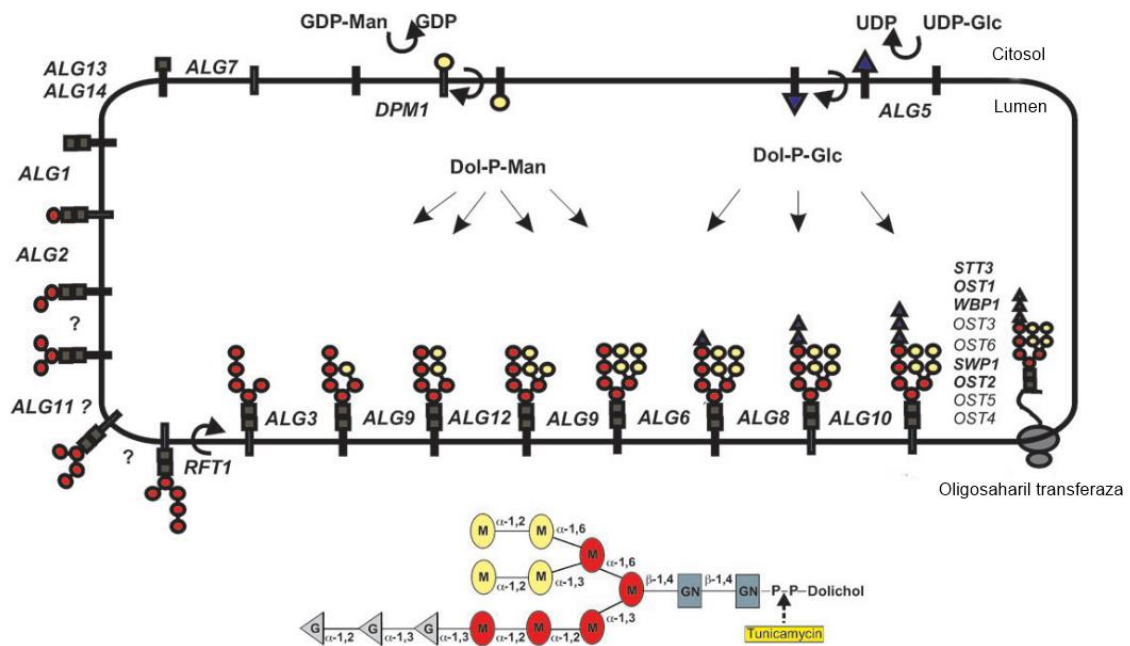
## 2.1. Glikozilacija proteina kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Proteini se tijekom ili nakon translacije modificiraju na različite načine. Jedan od kompleksnijih i energetski najzahtjevnijih procesa je glikozilacija, odnosno kovalentno vezanje šećernih skupina na proteine. Glikoproteini, koji nastaju takvom modifikacijom, sastavni su dio stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* te omogućuju razne funkcije poput flokulacije, prepoznavanja stanice drugog tipa parenja, formiranja biofilma i pseudohifalnog rasta (Klis i sur., 2006). Glikoproteini stijenke kvasca *S. cerevisiae* glikoziliraju se dodatkom mananskih lanaca procesima N- i O-glikozilacije, a više od polovice proteina stijenke koji su većih molekulskih masa, dodatkom glikozil-fosfatidilinozitolnog (GPI) sidra. Obzirom na dominaciju manoznih jedinica u ugljikohidratnom lancu, glikozilirani proteini kvasca nazivaju se manoproteini. Glikozilacija se vrši N-glikozilacijom aminokiselinskog asparaginskog ostataka ili O-glikozilacijom aminokiselinskog treoninskog, serinskog, hidroksiprolinskog, hidroksilizinskog ili tirozinskog ostatka (Spiro, 2002). Navedene posttranslacijske modifikacije glikoproteina nužne su za umrežavanje proteina u matriks stanične stijenke, odnosno za sintezu funkcionalne i stabilne stijenke (Free, 2013).

Kod svih eukariota, N-glikozilaciju karakterizira vezanje šećera N-acetilglukoamina na  $\gamma$ -amidnu grupu asparagina. Proces N-glikozilacije započinje u ER-u, prijenosom oligosaharidnog prekursora za N-glikozilaciju, odnosno jedinice  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ , s lipidnog nosača na protein (Slika 3). Sintezu  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  omogućuju proteini kodirani genima za asparagin-vezanu glikozilaciju (engl. *asparagine-linked glycosylation*, *ALG*). Prvi korak sinteze jezgre oligosaharida je transfer  $\alpha$ -vezanog N-acetilglukoaminofosfata

(GlcNAc) s uridinfosfata (UDP)-GlcNAc na lipidni nosač dolikol-fosfat (Dol-PP), dajući GlcNAc-PP-Dol (Lehle, 1992). Poznato je kako spoj tunikamicin specifično prekida navedenu reakciju prijenosa GlcNAc na Dol-P (Takatsuki i sur., 1971). Biosinteza se nastavlja dodatakom druge jedinice glukoze te pet jedinica manoze, pri čemu su donori šećera UDP-GlcNAc ili gvanozinfosfat (GDP)-Man. Nastali oligosaharid  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  zatim se prenosi s citoplazmatske strane na luminalnu stranu ER-a (Snider i sur., 1980). Biokemijska reakcija transmembranskog prijenosa heptasaharida nije u potpunosti razjašnjena, no poznato je kako je za njeno provođenje potreban gen *RTF* (Helenius i sur., 2002). Donori šećera Dol-P-Man i Dol-P-Glc omogućuju nastavak elongacije dodatkom četiri jedinice manoze i tri jedinice glukoze, čime je sintetiziran oligosaharidni prekursor  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ . Dolikol-fosfat manozina sintaza (engl. *dolichyl-phosphate mannose synthase*, Dpm1) je enzim koji omogućuje formiranje donora šećera Dol-P-Man kataliziranjem reakcije Dol-P i GDP-Man. Finalni produkt  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  prenosi se oligosaharil transferazom (engl. *oligosaccharyl transferase*, OST) na amidnu grupu asparaginskog ostatka koja je unutar konsenzus sekvence (tzv. sekvona) Asn-X-Ser/Thr (pri čemu X predstavlja bilo koji aminokiselinski ostatak, osim prolinskog) sekretornog proteina (Bause 1983; Ronin i sur., 1978). Iako je  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  preferirani supstrat za prijenos na protein,  $\text{GlcNAc}_2$  i  $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$  su također mogući supstrati. Oligosaharil transferaza je proteinski kompleks koji se sastoji od devet podjedinica (Stt3, Ost1, Wbp1, Swp1, Ost2, Ost3, Ost6, Ost4, Ost5), pri čemu je protein Stt3 katalitička podjedinica. Pet podjedinica OST kompleksa esencijalno je za vijabilnost kvasca (Stt3, Ost1, Wbp1, Swp1, Ost2) (Knauer i Lehle 1994; Snider i sur., 1980). Uloga OST je prepoznati konsenzus sekvencu sekretornog proteina te omogućiti transfer oligosaharidnog prekursora (Kelleher i sur., 1992). Međutim, samo 66% konsenzus sekvenci glikozilira se *in vivo* (Apweiler, 1999). Efikasnost glikozilacije ovisi o regiji oko sekvona, poziciji sekvona u peptidnom lancu, stopi smatanja proteina i dostupnosti prekursora dolikola (Kasturi i sur., 1997). Prije odlaska iz ER-a, oligosaharidni lanac vezan na protein reducira se uklanjanjem sve tri glukoze te jedne manoze. Biosintetski put glikozilacije zatim se nastavlja u Golgijevom aparatu procesom terminalne glikozilacije. Prvi korak je nastavak demanozilacije, zatim se dodaje jedna jedinica

glukoze te uklanjaju još dvije jedinice manoze. Krajnja procesiranja u Golgijevom aparatu uključuju daljne modifikacije, čime nastaju raznoliki ugljikohidratni lanci N-vezani na zreli protein (Lehle, 1992). Reakcije skraćivanja i procesiranja lanca provode enzimi glukozidaza I, glukozidaza II i ER-manozidaza I (Lehle i sur., 2006).



**Slika 3.** Biosinteza i prijenos oligosaharidnog prekursora za N-glikozilaciju u endoplazmatskom retikulumu (ER) *S. cerevisiae*. Biosinteza lipid-vezanog oligosaharida započinje na citosolnoj strani ER s UDP-Glc i GDP-Man kao donorima glikozila. Nastali  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  heptasaharid prenosi se na luminalnu stranu ER, u čemu sudjeluje protein kodiran genom *RFT1*. Donorima šećera Dol-P-Man i Dol-P-Glc,  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  elongira se do svog završnog oblika -  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ . Oligosaharid se zatim prenosi na amidnu grupu asparaginskog ostatka koji je unutar konsenzus sekvence Asn-X-Ser/Thr sekretornog proteina. Reakcije glikozilacije oligosaharidnog prekursora za N-glikozilaciju u ER-u kataliziraju enzimi kodirani *ALG* genima, a prijenos oligosaharidne jedinice na protein, oligosaharil transferaza (OST). Manozne jedinice crvene boje donira GDP-Man, a manozne

jedinice žute boje Dol-P-Man; jedinice glukoze ( $\Delta$ ) donira Dol-P-Glc. GN = N-acetilglukozamin, M = manozna, G = glukoza (Lehle i sur., 2006)

Za razliku od N-glikozilacije, oligosaharidni lanac se kod O-glikozilacije direktno gradi na ciljnom aminokiselinskom ostatku proteina. Biosinteza započinje u lumenu ER-a, prijenosom prve manozne jedinice tijekom transmembranske translokacije peptidnog lanca. Donor šećera je Dol-P-Man (Larriba, 1976), a reakciju transfera manozne jedinice katalizira enzim O-manozil transferaza, produkt gena *PMT* (engl. *protein O-mannosyl transferases*) (Strahl-Bolsinger i sur., 1993). Daljnje dodavanje manozna odvija se u Golgijevom tijelu, pri čemu je GDP-Man donor šećera. Korake elongacije ugljikohidratnog lanca kataliziraju  $\alpha$ -1,2-manozil transferaza kodirana genima iz *KTR* (engl. *killer toxin resistant*) obitelji te  $\beta$ -1,3-manozil transferaza kodirana genom iz *MNN* (manan) obitelji (Lussier i sur., 1999).

### 2.1.1. Gen *PSA1* kvasca *S. cerevisiae*

Gen *PSA1* kvasca *S. cerevisiae* kodira za enzim GDP-manoza pirofosforilazu (manozna-1-fosfat gvaniltransferazu) koji katalizira reakciju aktivacije manoze, odnosno nastanak GDP-manoze iz molekula GTP-a i manozna-1-fosfata (Hashimoto i sur., 1997). Ovaj gen neovisno je identificiran u eksperimentima s različitim mutantima kvasca, stoga ima višestruke nazive uključujući *VIG9* (engl. *vanadate-resistant and immature glycosylation*) (Hashimoto i sur., 1997), *SRB1* (engl. *requires sorbitol*) (Yoda i sur., 2000; Stateva i sur., 1991) i *MPG1* (engl. *mannose-1-phosphate guanyltransferase*) (Kruszewska i sur., 1998). Gen *PSA1* (engl. *plasmid suppressor of alg1*) kloniran je kao tzv. *multicopy* supresor mutacije *alg1* (Benton i sur., 1996; Shimma i sur., 1997), odnosno prisutnost gena *PSA1* u velikom broju kopija suprimirala je defekte koji su posljedica ove mutacije. *PSA1* je esencijalan gen za vijabilnost kvasca. Produkt tog gena je protein Psa1, sastavljen od 361 aminokiselinskih ostataka, homologan enzimu NDP-heksoza pirofosforilazi koji također katalizira nastajanje aktiviranih šećernih nukleotida (Benton i sur., 1996). Transkripcija gena *PSA1* koordinirano je regulirana

s transkripcijom gena *CLN2* (engl. *cyclin 2*) koji kodira za ciklin G1 uključen u regulaciju staničnog ciklusa, točnije aktivaciju ciklin-ovisne protein kinaze (CDK) koja potiče prijelaz iz G1 faze u S fazu staničnog ciklusa. Regulacija glikozilacije, metabolizam šećernih nukleotida i tijekom odvijanja staničnog ciklusa kroz G1 fazu su međusobno koordinirani. N-glikozilacija proteina ključna je za odvijanje G1 faze staničnog ciklusa (Huffaker i Tanner, 1984; Vai i sur., 1987). U prilog tome govori da inhibicija glikozilacije tunikamicinom, koji sprječava dodavanje prvog GlcNAc dolikol-fosfatu, onemogućuje nastanak pupa u G1 fazi (Arnold i Tanner, 1982; Vai i sur., 1987). Obzirom da je manoza nužna komponenta za odvijanje N- i O-glikozilacije u *S. cerevisiae*, nastanak njezinog aktiviranog oblika neophodan je korak u ugradnji manoze u manoproteine i GPI sidra proteina stanične stijenke (Abeijon i Hirschberg, 1992). Delecija gena *PSA1* je letalna (Benton i sur., 1996; Hashimoto i sur., 1997), a mutacije u tom genu rezultiraju nizom različitih fenotipova koji upućuju na defekte u biosintezi stanične stijenke. Sojevi s mutacijama u genu *PSA1* pokazuju promjene u strukturi i sastavu stanične stijenke, prvenstveno u slučaju glukana (Blagoeva i sur., 1991), te razlike u sadržaju manoproteina u odnosu na stanice divljeg tipa (Maerkisch i sur., 1983). Nadalje, mutante *psa1* karakterizira preosjetljivost na antibiotik geneticin (Hashimoto i sur., 1997), temperaturna osjetljivost te potreba za osmotskom stabilizacijom prilikom uzgoja u hipoosmolarnom okruženju (Yoda i sur., 2000). Prekomjernom ekspresijom gena *PSA1* u stanicama mutanta *dpm1* povećava se zaliha GDP-manoze, postaju otpornije na povišenu temperaturu te dolazi do supresije defekata u sintezi dolikol-oligosaharidne jezgre (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol) i dolikol-fosfata (Dol-PP) (Janik i sur., 2003).

### 3. Eukariotski RNA egzosom

RNA egzosom je 3'-5' egzoribonukleazni kompleks koji djelovanjem na široki spektar RNA supstrata sudjeluje u oblikovanju transkriptoma u stanicama svih eukariota (Schmid i

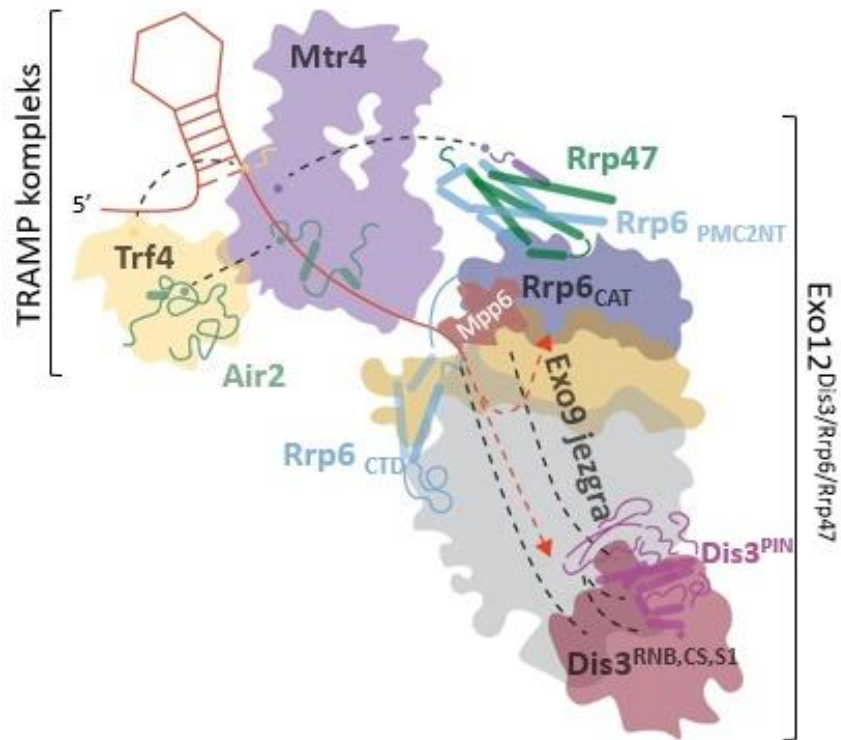


Jensen, 2008; Chlebowski i sur., 2013; Zinder i Lima, 2017). Veliki napredak u otkrivanju svojstava, strukture RNA egzosoma te njegove interakcije s pripadajućim kofaktorima postignut je zahvaljujući korištenju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao modelnog organizma. U metabolizmu RNA, koji se odvija u jezgri i citoplazmi, RNA egzosom sudjeluje u procesiranju gotovo svake vrste transkripata koje sintetiziraju RNA polimeraze I, II i III (Delan-Forino i sur., 2017). Aktivnosti posredovane RNA egzosomom obuhvaćaju kontrolu kvalitete (engl. *quality control*) u jezgri i citoplazmi, te procesiranje i degradaciju RNA supstrata. U jezgri stanice, to uključuje modificiranje prekursora RNA molekula, to jest adekvatno sazrijevanje 3' krajeva ribosomalne RNA (rRNA), transportne RNA (tRNA), telomerne RNA te malih nuklearnih i nukleolarnih RNA (snRNA i snoRNA). Kontrola kvalitete RNA u jezgri obuhvaća i degradaciju tzv. „kriptičnih“ nestabilnih transkripata (engl. *cryptic unstable transcripts*, CUTs), to jest nekodirajućih RNA (Wyers i sur., 2005; Xu i sur., 2009) u kvascu i promotorskih uzvodnih transkripata u ljudskim stanicama (engl. *promoter upstream transcripts*, PROMPTs) (Pascal i sur., 2008). Uloga RNA egzosoma u citoplazmi vezana je uz procesiranje i degradiranje aberantnih mRNA (Schaeffer i sur., 2009; Hilleren i sur., 2001). Obzirom na ulogu RNA egzosoma u procesiranju i degradaciji RNA supstrata, poznato je da mutacije RNA egzosoma značajno utječu na ekspresiju gena (Gudipati i sur., 2012; Sloan i sur., 2012; Bresson i sur., 2017), zbog čega su povezane s brojnim ljudskim patološkim stanjima, uključujući autoimune bolesti i neurodegenerativne poremećaje (Staals i Pruijn, 2010; Morton i sur., 2017). Bolesti uzrokovane mutacijama gena koji kodiraju za podjedinice ljudskog RNA egzosoma (EXOSC proteini) često su monogenske bolesti (engl. *Mendelian disorders*) (Fabre i Badens, 2014) i nazivaju se „egzosomopatijama“ (engl. *exosomopathies*) (Amorim i sur., 2020). Takve bolesti najčešće karakteriziraju supstitucije pojedinačnih aminokiselinskih ostataka podjedinica RNA egzosoma, odnosno posljedica su točkastih mutacija, a ne većih delecija u genima koji kodiraju za te podjedinice. Ove bolesti zato naglašavaju središnju ulogu ljudskog RNA egzosoma u održavanju homeostaze metabolizma RNA u „zdravim“ stanicama, ali i potencijalne posljedice neravnoteže uslijed narušavanja integriteta ovog kompleksa.

Središnji dio evolucijski očuvanog RNA egzosoma čini Exo9, tzv. jezgra (engl. *core*). Sastoji se od devet proteinskih podjedinica koje su katalitički-inaktivne, ali imaju strukturalnu i regulatornu ulogu (Wasmuth i Lima, 2012; Wasmuth i sur., 2014) (Slika 4). Evolucijska očuvanost središnje jezgre Exo9 vidljiva je u strukturalnoj sličnosti s arhejskom 3'-5' fosforilitičkom egzoribonukleazom, odnosno u kompoziciji devet domena i centralnom kanalu prilagođenom prolasku samo jednolančanih RNA molekula (engl. *single stranded RNA*, *ssRNA*) (Ogami, 2018). U kvascu *S. cerevisiae* katalitičku aktivnost osiguravaju dvije dodatne podjedinice – Dis3 (poznata i kao Rrp44), koja posjeduje 3'-5' egzoribonukleaznu i endoribonukleaznu aktivnost, te Rrp6, s 3'-5' egzoribonukleaznom aktivnosti (Briggs i sur., 1998; Dziembowski i sur., 2007). Kristalne strukture egzosomalnih RNA kompleksa pokazuju da se Dis3 i Rrp6 nalaze na suprotnim krajevima RNA egzosoma. U kvascu se Dis3 nalazi u citoplazmi i jezgri stanice, dok Rrp6 nalazi samo u izoformi RNA egzosoma u jezgri (Schmid i Jensen, 2008). Exo9 jezgra stupa u interakcije s Dis3 tvoreći kompleks Exo10<sup>Dis3</sup>. Kompleks Exo10<sup>Dis3</sup> u jezgri stanice kvasca povezuje se s Rrp6 i njezinim stabilizirajućim kofaktorom Rrp47, čime nastaje kompleks od 12 podjedinica Exo12<sup>Dis3/Rrp6/Rrp47</sup> (Feigenbutz i sur., 2013; Makino i sur., 2015) (Slika 4). Aktivnosti nuklearnog RNA egzosoma stimulirane su i kofaktorom Mpp6 i TRAMP kompleksom (engl. *Trf4/Air2/Mtr4p polyadenylation complex*), koji sudjeluju u usmjeravanju RNA supstrata prema podjedinici Dis3 (Stuparevic i sur., 2013; Wasmuth i Lima, 2017). Podjedinice TRAMP kompleksa nužne su za maksimalnu aktivnost RNA egzosoma *in vivo* i *in vitro*, a uključuju RNA-vezujuću podjedinicu Air1 ili Air2, RNA-helikaznu podjedinicu Mtr4 te poli-A polimeraznu podjedinicu Trf4 ili Trf5 (La Cava i sur., 2005). Njihovim djelovanjem dolazi do odmatanja sekundarne strukture RNA supstrata koja je formirana na 3'-kraju te nastajanja jednolančanih RNA koje u takvoj konformaciji mogu ući u središnji kanal RNA egzosoma (Schneider i Tollervey, 2013).

Svih 10 gena koji kodiraju za kompleks Exo10<sup>Dis3</sup> neophodni su za vijabilnost stanica kvasca (Mitchell i sur., 1997). Aktivnost barem jedne katalitičke domene Dis3 dovoljna je za vijabilnost stanica, ali istodobna inaktivacija egzo- i endoribonukleazne aktivnosti Dis3 je

letalna (Schaeffer i sur., 2009). Iako gen koji kodira za podjedinicu Rrp6 nije esencijalan, delecija tog gena (*rrp6*) rezultira sporijim rastom i temperaturnom osjetljivošću, kao i defektima u procesiranju RNA (Briggs i sur., 1998). Zanimljivo je da takvi fenotipovi nisu uzrokovani primarno nedostatkom katalitičke aktivnosti Rrp6. Katalitički mutanti podjedinice Rrp6 nisu osjetljivi na povišenu temperaturu, ali sporo rastu na fiziološkoj temperaturi (Phillips i Butler, 2003). Istovremena inaktivacija egzoribonukleaznih aktivnosti podjedinica Dis3 te Rrp6 rezultira sintetskom letalnošću. Sukladno navedenom, može se zaključiti da ove proteinske podjedinice dijele zajedničke supstrate (Gudipati i sur., 2012). Unatoč funkcionalnom preklapanju, podjedinice Dis3 i Rrp6 sadrže različite domene za vezanje regulatornih kofaktora i prepoznavanje različitih RNA supstrata. Dis3 sastavljen je od N-terminalne PIN (engl. *PIT N-terminus*) domene, dvije *cold-shock* domene (CSD), S1 domene i ribonukleazne domene (RNB) (Dziembowski i sur., 2007). Rrp6 sadrži N-terminalnu domenu važnu za postizanje interakcija s kofaktorima Rrp47 i TRAMP kompleksom (Butler i Mitchell, 2010), centralnu egzoribonukleaznu, HRDC domenu (engl. *helicase and RNase D C-terminal domain*) i C-terminalnu domenu pomoću koje ostvaruje interakcije s Exo9 (Midtgaard i sur., 2006). Kofaktor Rrp47 djeluje na N-terminalnu regiju Rrp6 te potiče katalitičku aktivnost Rrp6 egzoribonukleazne podjedinice, olakšavajući njeno vezanje na strukturirane elemente unutar RNA supstrata (Stead et al., 2007). Zadnjih 100 aminokiselina C-terminalne domene Rrp6 čini tzv. omču (engl. *lasso*), kojom veže RNA blizu ulaska u Exo9 i aktivira nuklearni RNA egzosom (Wasmuth i Lima, 2017). Biokemijske i strukturne *in vitro* studije pokazale su različite mehanizme djelovanja podjedinica Dis3 i Rrp6 (Midtgaard i sur., 2006; Lorentzen i sur., 2008) te kako sukladno tome određene reakcije procesiranja i degradiranja RNA u potpunosti ovise samo o jednoj od tih nukleaza (Allmang i sur., 1999 a).



**Slika 4.** Skica strukturnog modela kompleksa Exo12<sup>Dis3/Rrp6/Rrp47</sup> te kofaktora Mpp6 i TRAMP kompleksa. Crne isprekidane linije na proteinima Trf4 i Mtr4 predstavljaju povezana područja za koja nisu dostupni strukturni podaci. Središnji kanal Exo9 jezgre označen je crnim isprekidanim linijama, a oštre crvene strelice prikazuju put RNA do katalitičkih podjedinica. Slika je prilagođena prema radu (Zinder i Lima, 2017).

## OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

RNA egzosom je esencijalni ribonukleazni proteinski kompleks čija se struktura i funkcija intenzivno istražuju tijekom zadnjih dvadeset godina. Poznato je kako sudjeluje u procesima sazrijevanja, degradiranja i kontroli kvalitete RNA molekula u svim eukariotskim stanicama, no mehanizam djelovanja te specifičnost prema supstratima RNA egzosoma nisu u potpunosti razjašnjeni. Povezanost RNA egzosoma s ljudskim bolestima predstavlja dodatnu motivaciju za istraživanje uloge ovog evolucijski očuvanog kompleksa.

Opći cilj rada bio je istražiti povezanost između procesa degradacije RNA djelovanjem RNA egzosoma s promjenama u ekspresiji gena koje utječu na proces glikozilacije proteina u eukariotskim stanicama.

Specifični cilj rada bio je utvrditi može li prekomjerna ekspresija gena *PSA1*, čiji proteinski produkt katalizira ključnu reakciju u procesu manozilacije proteina, suprimirati defektne fenotipove rasta i morfologije stanica *S. cerevisiae* prilikom inaktivacije katalitičkih podjedinica ili kofaktora RNA egzosoma pri povišenoj temperaturi.

## MATERIJALI I METODE

### 1. Materijali

#### 1.1. Kemikalije i enzimi

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

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

Aminokiseline (histidin, uracil, leucin, triptofan), agaroz, etidij bromid, polietilenglikol (PEG) 4000: Sigma Aldrich, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Ampicilin: Roth (Karlsruhe, Njemačka)

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

NucleoSpin® Plasmid kit: Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)

Restrikcijski enzimi (*SacI*, *EcoRI*, *BglI*) te pripadajući puferi za restrikcijske enzime, standardi za DNA elektroforezu (1 kb i 100 bp DNA ladder): New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, SAD)

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

Kvaščeva dušična baza bez aminokiselina (YNB): Difco (SAD)

Kvašчев ekstrakt: Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)

Sorbitol bezvodni, NaCl: Carlo Erba (Milano, Italija)

## 1.2. Otopine

Za transformaciju kvasca:

TE pufer (pH = 7,4)

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH se podešava dodatkom NaOH

0,1 M i 1 M litijev acetat

50%-tna otopina polietilenglikola (PEG)

## 1.3. Sojevi kvasca

Tablica 1. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

SOJ	GENOTIP	IZVOR
BMA41 wt (divlji tip)	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100</i>	Baudin-Baillieu i sur., 1997
BMA41 wt + YEp352	<i>BMA41 wt [YEp352; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
BMA41 wt + YEp352-PSA1	<i>BMA41 wt [YEp352; PSA1; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
BMA41 <i>rrp6</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp6::KanMX4</i>	Mosrin-Huaman i sur., 2009
BMA41 <i>rrp6</i> + YEp352	<i>BMA41 rrp6 [YEp352; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
BMA41 <i>rrp6</i> + YEp352-PSA1	<i>BMA41 rrp6 [YEp352; PSA1; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
BMA41 <i>rrp47</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1Δ can1-100 rrp47::KanMX4</i>	Stuparević i sur., 2013
BMA41 <i>rrp47</i> + YEp352	<i>BMA41 rrp47 [YEp352; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
BMA41 <i>rrp47</i> + YEp352-PSA1	<i>BMA41 rrp47 [YEp352; PSA1; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
DLY1354 = <i>DIS3</i> wt (divlji tip)	<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</i> + YEp352	<i>DIS3 [YEp352; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
<i>DIS3</i> + YEp352-PSA1	<i>DIS3 [YEp352; PSA1; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
DLY1350 = <i>dis3-D171N</i> ( <i>dis3 endo</i> )	<i>MATa ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 dis3::KanMX4 [pBS3278-dis3D171N, LEU2]</i>	Stuparevic i sur., 2013
<i>dis3-D171N</i> ( <i>dis3 endo</i> ) + YEp352	<i>dis3-D171N [YEp352; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
<i>dis3-D171N</i> ( <i>dis3 endo</i> ) + YEp352-PSA1	<i>dis3-D171N [YEp352; PSA1; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
DLY1358 = <i>dis3-D551N</i> ( <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
<i>dis3-D551N</i> ( <i>dis3 exo</i> ) + YEp352	<i>dis3-D551N [YEp352; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad
<i>dis3-D551N</i> ( <i>dis3 exo</i> ) + YEp352-PSA1	<i>dis3-D551N [YEp352; PSA1; 2μ URA3]</i>	Ovaj rad

Sojevi + YEp352 i + YEp352-PSA1 konstruirani su transformacijom ishodnih sojeva episomalnim plazmidima opisanim u poglavlju 1.5. Selekcija transformanata provedena je uzgojem na hranjivoj podlozi bez uracila.

#### 1.4. Sojevi bakterija

Za umnožavanje i izolaciju plazmida korištene su komercijalno dostupne kompetentne stanice bakterije *E. coli*, soj DH5 $\alpha$  (Subcloning Efficiency™ DH5 $\alpha$ ™ Competent Cells) (genotip: F- $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1*) proizvođača Invitrogen, SAD.

#### 1.5. Plazmidi

##### 1.5.1. Plazmid YEp352

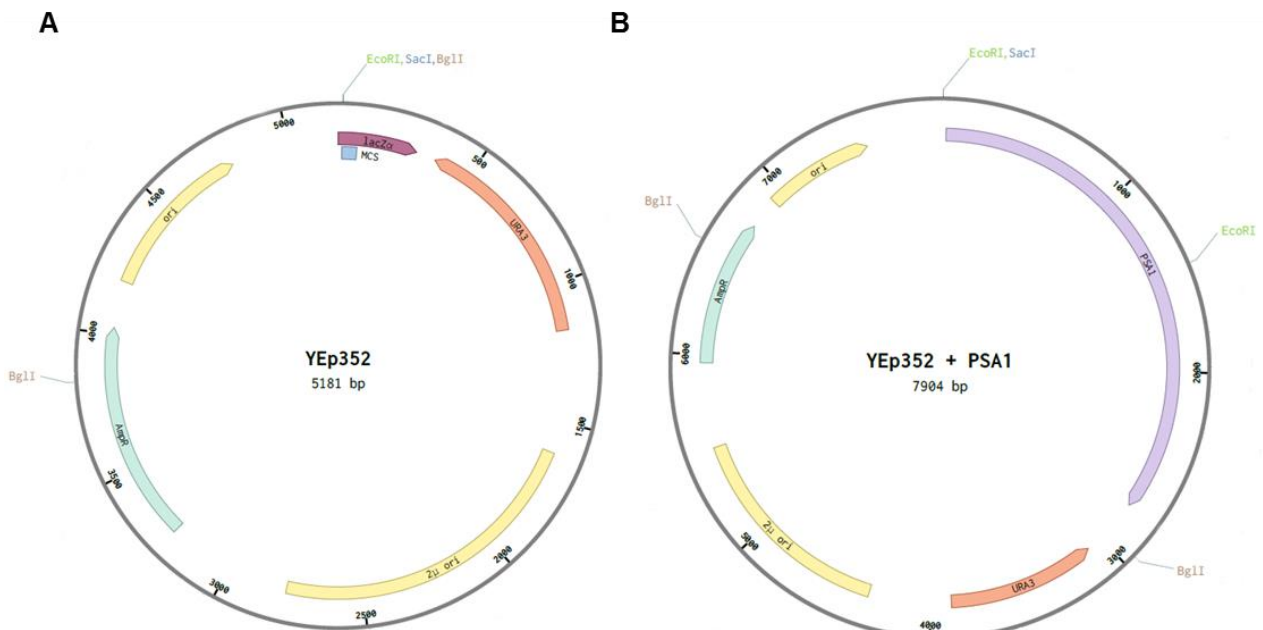
Plazmid YEp352 (Slika 5A) sadrži ishodište replikacije plazmida  $2\mu$  *S. cerevisiae* te ishodište replikacije (*ori*) iz bakterije *E. coli*. Budući da sadrži oba navedena ishodišta replikacije, može se transformirati i umnažati u oba mikroorganizma. Zbog ishodišta replikacije  $2\mu$ , u stanicama kvasca se nalazi u velikom broju kopija. Plazmid također sadrži selektivni marker za rezistenciju na ampicilin (*Amp<sup>R</sup>*) u svrhu selekcije transformiranih stanica *E. coli* te auktrotrofni marker *URA3* za selekciju kvasaca transformiranih ovim plazmidom.

##### 1.5.2. Plazmid YEp352-PSA1

Plazmid YEp352-PSA1 (Slika 5B) episomalni je ekspresijski plazmid koji nosi gen *PSA1* pod regulacijom nativnog promotora. Ostatak sekvence identičan je ishodnom plazmidu YEp352, a konstrukcija plazmida YEp352-PSA1 detaljno je opisana u radu (Janik i sur., 2003). Zbog



ishodišta replikacije  $2\mu$ , u stanicama kvasca se nalazi u velikom broju kopija te dovodi do prekomjerne ekspresije proteina Psa1.



**Slika 5.** Mape plazmida YEp352 (A) i YEp352-PSA1 (B) uz naznačene restrikcijske enzime korištene u ovom radu te njihova mjesta cijepanja. Prikaz mape plazmida kreiran je u platformi Benchling.

### 1.6. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za uzgoj *E. coli* korištena je selektivna tekuća podloga LB-Amp sastava: baktotripton 10 g/L, kvašćev ekstrakt 5 g/L, NaCl 5 g/L, uz dodatak 100  $\mu$ g/mL antibiotika ampicilina. Hranjivu podlogu je nakon pripreme potrebno sterilizirati u autoklavu (20 minuta na temperaturi od 121°C te tlaku od 1 atm). Kruta podloga za uzgoj je osim navedenih komponenata sadržavala još i 16 g/L agara.

## 1.7. Hranjive podloge za uzgoj kvasca

YNB (Yeast Nitrogen Base) hranjiva podloga

Za uzgoj sojeva kvasca *S. cerevisiae* korištena je YNB -Ura ili YNB -Ura -Leu hranjiva podloga sastava: YNB prah 6,7 g/L, smjesa aminokiselina i dušičnih baza drop out 2 g/L, triptofan, uracil i histidin svaki po 0,8 g/L. U slučaju pripreme YNB -Ura podloga, izostavio se dodatak uracila, a u slučaju YNB -Ura -Leu i uracila i leucina. U tekuću YNB hranjivu podlogu, nakon sterilizacije autoklaviranjem (20 minuta pri temperaturi od 121°C te tlaku od 1 atm) 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.

### 1.7.1. Drop out

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

## 2. Metode

### 2.1. Transformacija DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> kompetentnih stanica bakterije *E. coli*

Transformacija kompetentnih stanica bakterije *E. coli* provedena je u svrhu kasnijeg umnažanja i izolacije plazmida iz transformiranih stanica *E. coli*. Alikvoti kompetentnih stanica za transformaciju *E. coli* od 50  $\mu$ L čuvaju se u Eppendorf epruветama na -70°C. Prije transformacije otopljeni su na ledu, nakon čega je u epruветe dodano 1 - 5  $\mu$ L (1 - 10 ng) plazmidne DNA i lagano promiješano. Epruветe su inkubirane na ledu 30 minuta. Slijedio je temperaturni šok 20 sekundi na 42°C, te ponovno inkubacija na ledu 2 minute. U svaku

epruvetu dodano je 950  $\mu\text{L}$  tekućeg medija LB zagrijanog na 37°C te je sve inkubirano 1 sat na 37°C na rotacijskoj tresilici. Po 100  $\mu\text{L}$  svake suspenzije naciepljeno je na selektivnu LB-Amp ploču i inkubirano preko noći na 37°C do porasta kolonija.

## **2.2. Izolacija plazmidne DNA iz *E. coli* (miniprep)**

Izolacija plazmidne DNA rađena je korištenjem komercijalno dostupnog kita „Plasmid DNA purification“, protokolom „NucleoSpin® Plasmid (NoLid)“, proizvođača Macherey-Nagel, Njemačka. Protokol za izolaciju te sve potrebne otopine priloženi su od proizvođača.

## **2.3. Restriksijska analiza**

Restriksijska analiza provedena je za provjeru sekvenci YEp352 i YEp352-*PSA1* plazmida. Pritom su korišteni restriksijski enzimi *SacI*, *EcoRI*, *BglI*. Smjesa za restriksijsku analizu pripremljena je u volumenu od 10  $\mu\text{L}$ ; dodatkom 1  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg komercijalnog 10x koncentriranog pufera, 0.5  $\mu\text{L}$  ( $\approx$  100 ng) plazmida, 1  $\mu\text{L}$  (10 U) restriksijskog enzima, 7,5  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Smjesa je inkubirana u termobloku na 37°C tijekom 2-3 sata. Produkti restriksijske analize potom su analizirani DNA gel elektroforezom.

## **2.4. Transformacija kvasca LiAc metodom**

Stanice kvasca uzgajane su u 10 mL odgovarajuće tekuće podloge (YNB -Ura ili YNB -Ura - Leu) na 30°C do logaritamske faze rasta. Izdvojilo se 5 OD jedinica stanica, a zatim je suspenzija centrifugirana (5'/3000 rpm). Supernatant se odbacio, a talog stanica je resuspendiran u sterilnoj destiliranoj vodi te ponovno centrifugiran (5'/3000 rpm). Supernatant se odbacio, a talog stanica se zatim resuspendirao u 1 mL 0,1 M LiAc i prenio u sterilnu Eppendorf epruvetu, nakon čega je slijedilo centrifugiranje (1'/8000 rpm). Sav supernatant je uklonjen pipetiranjem. Na dobiveni talog stanica navedenim su redoslijedom dodani: 240  $\mu\text{L}$

50%-tnog PEG-a, 36  $\mu\text{L}$  1 M LiAc, 25  $\mu\text{L}$  jednolančane DNA koja je prethodno prokuhana te 50  $\mu\text{L}$  smjese kružnog plazmida i destilirane vode. Pripremljena transformacijska smjesa je vorteksirana dok nije postala homogena. Nakon inkubacije u termobloku 30 min na 30°C te zatim toplinskog šoka u termobloku 20 min na 42°C, smjesa je centrifugirana (15"/8000 rpm). Sav supernatant je uklonjen pipetiranjem. Talog stanica se zatim resuspendirao u 1 mL sterilne vode nakon čega je 100  $\mu\text{L}$  naciepljeno na odgovarajuću krutu selektivnu podlogu (YNB -Ura ili YNB -Ura -Leu). Uzgoj se provodio na 30°C do porasta kolonija transformanata (2-5 dana).

## **2.5. Gel elektroforeza**

Provedena je horizontalna elektroforeza DNA u 0,8% agaroznom gelu pripremljenom otapanjem agaroze u TAE puferu. Uzorci za elektroforezu pomiješani su s migracijskim bojilom te naneseni u jažice gela. Elektroforeza se provodila pri 90 V, a gel je nakon elektroforeze bojan u otopini etidij bromida i vizualiziran na transiluminatoru uz UV svjetlo.

## **2.6. Test rasta (engl. *plate assay*)**

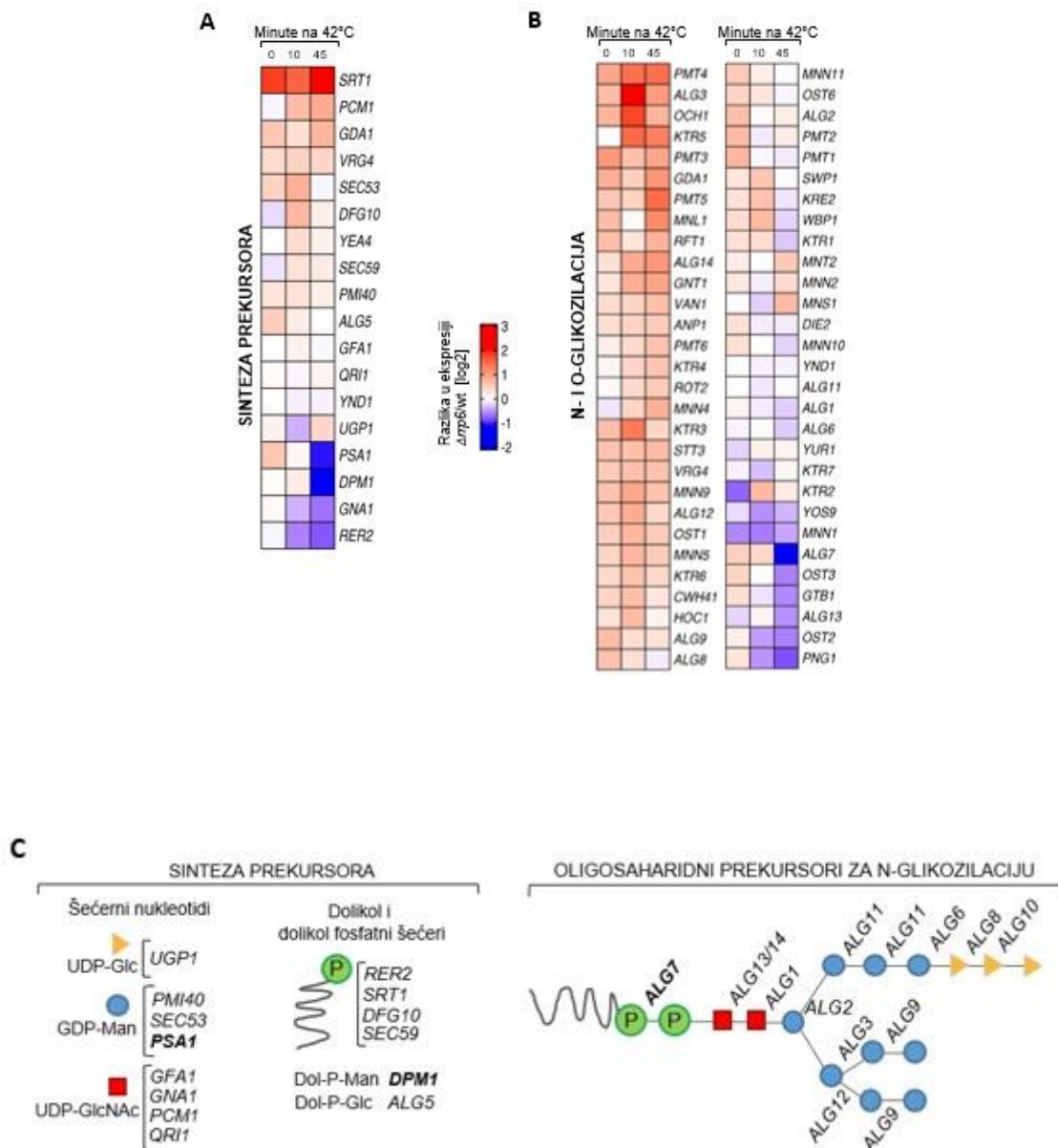
Test rasta je semikvantitativna metoda za ispitivanje vijabilnosti stanica. Podloge za provedbu testa rasta pripremljene su kao krute YNB -Ura ili YNB -Ura -Leu hranjive podloge. Stanice kvasca uzgojene su na rotacijskoj tresilici u tekućoj YNB -Leu ili YNB -Ura -Leu podlozi na 30°C do logaritamske faze rasta. Kulturi u log fazi spektrofotometrijski je određena gustoća kulture ( $\text{OD}_{600}/\text{mL}$ ), koja je zatim prilagođena sterilnom vodom na 1  $\text{OD}_{600}/\text{mL}$ . Slijedila je priprema 4 decimalna razrjeđenja početne suspenzije sukcesivnim miješanjem 100  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica s 900  $\mu\text{L}$  sterilne vode. 10  $\mu\text{L}$  svakog decimalnog razrjeđenja nakapano je na dobro osušenu krutu podlogu. Podloge su inkubirane pri 30°C ili 37°C tijekom 3 dana i fotografirane Uvidoc HD6 kamerom.

## REZULTATI

Eukariotski RNA egzosom esencijalan je proteinski kompleks koji procesiranjem i degradacijom RNA molekula direktno utječe na ekspresiju gena i vijabilnost stanica (Chlebowski i sur., 2013). Takve uloge RNA egzosoma pripisuju se dvjema katalitičkim podjedinicama, Dis3 i Rrp6, koje posjeduju 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost. Obje katalitičke podjedinice uključene su u održavanje stabilnosti stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri stresnim uvjetima poput visoke temperature i izlaganja agensima koji oštećuju staničnu stijenku, pri čemu esencijalna podjedinica Dis3 doprinosi svojom egzoribonukleaznom aktivnošću (Štrbac, Završni rad), a ne-esencijalna podjedinica Rrp6 ima nekatalitičku ulogu (Oskomić, Završni rad). Međutim, razlog destabilizacije stanične stijenke prilikom inaktivacije RNA egzosoma još uvijek nije poznat.

Podjedinica Rrp6 ima ključnu ulogu u degradaciji i formiranju 3'-kraja RNA supstrata (Briggs i sur., 1998; Burkard i Butler, 2000; Callahan i Butler, 2008). Ova podjedinica lokalizirana je u jezgri stanica kvasca *S. cerevisiae*, budući da je dio nuklearne, ali ne i citoplazmatske izoforme RNA egzosoma, te ima neposrednu ulogu u kontroli kvalitete metabolizma RNA (Fox i Mosley, 2016). Lokalizacija proteina Rrp6 u jezgri isključuje mogućnosti direktne interakcije s proteinima na staničnoj periferiji te indicira da se uloga ovog proteina u održavanju stabilnosti stanične stijenke očituje u promjeni razina mRNA koje kodiraju za proteine izravno uključene u izgradnju i remodeliranje stanične stijenke. Nedavno objavljena analiza RNA-sekvenciranja iz rada Wang i sur. (Wang i sur., 2020) dala je uvid u razinu ekspresije gena u stanicama mutanta *rrp6* prije i nakon toplinskog šoka (45 min pri 42°C). Kako bi se iz navedene analize dobio uvid u razlog destabilizacije stanične stijenke mutanta *rrp6*, preliminarnom bioinformatičkom analizom ispitana je razina ekspresije skupine gena koji kodiraju za enzime uključene u sintezu prekursora za izgradnju stanične stijenke, prvenstveno aktiviranih šećera i dolikol-fosfatnih šećera (Lesage i Bussey, 2006; Orlean, 2012). Primijećena je prominentna smanjena razina ekspresije gena *PSA1* i *DPM1* u

stanicama mutanta *rrp6* u odnosu na razinu u stanicama divljeg tipa prilikom izlaganja toplinskom šoku (Slika **6A**). Oba gena uključena su u proces manozilacije, specifično sintezu GDP-manoze te njenog vezanja na dolikol-fosfatni lipidni nosač (Slika **6C**, otisnuto masnim slovima) na unutrašnjoj strani membrane endoplazmatskog retikuluma. Manoza se veže na proteine sekretornog puta, te time i stanične stijenke, procesima N- i O-glikozilacije u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu (Herscovics i Orlean, 1993). U reakcijama N-glikozilacije kataliziranim Alg enzimima, dolikol fosfat služi kao lipidni akceptor šećernih ostataka. Provjerom razine ekspresije gena uključenih u procese N- i O-glikozilacije uočeno je da je gen *ALG7*, koji kodira za enzim koji katalizira inicijalni korak sinteze oligosaharidnog prekursora u procesu N-glikozilacije (Slika **6C**, otisnuto masnim slovima), također značajno slabije ekspimiran tijekom toplinskog šoka u stanicama mutanta *rrp6* u usporedbi sa stanicama divljeg tipa (Slika **6B**). Poznato je da defekti u vrlo ranim koracima glikozilacije, posebice manozilacije koja je esencijalna za staničnu vijabilnost, narušavaju stabilnost stanične stijenke (Janik i sur., 2012). Iako je vidljivo da se veliki broj gena vezanih uz glikozilaciju pojačano ekspimiraju u stanicama mutanta *rrp6* (Slika **6B**), rezultati ove preliminarne analize indiciraju da u stanicama mutanta *rrp6* dolazi do defekta u procesu glikozilacije zbog jako smanjene ekspresije gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u sintezi prekursorskih molekula uključenih u rane korake procesa glikozilacije, odnosno manozilacije proteina.



**Slika 6.** (A) Razlika u ekspresiji gena koji kodiraju za proteine uključene u sintezu prekursora komponenti stanične stijenke u stanicama divljeg tipa i mutanta *rrp6* prilikom izlaganja toplinskom šoku. Kvantifikacija mRNA pripadajućih gena vizualizirana je kao omjer mRNA *rrp6/wt* na log<sub>2</sub> skali. (B) Isto kao i (A), ali za kategoriju gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u N- i O-glikozilaciji. (C) Skica gena uključenih u sintezu šećernih nukleotida, dolicol i dolicol-fosfatnih šećera koji služe kao prekursori za izgradnju stanične stijenke te sudjeluju u sintezi oligosaharidnog prekursora za N-glikozilaciju. Slike su preuzete iz neobjavljenog rada Laboratorija za biokemiju.

Esencijalni gen *PSA1* kodira za enzim GDP-manoza pirofosforilazu koji sintetizira GDP-manozu, koja služi kao donor manoze koja se direktno ugrađuje u N- i O-vezane glikoproteine (Hashimoto i sur., 1997). Djelomični nedostatak funkcije ili smanjena ekspresija esencijalnog enzima Psa1 rezultiraju fenotipovima poput pojačane osjetljivosti na hipoosmolarno okruženje, puknuća stanica i defekata u staničnoj separaciji (Tomlin i sur., 2000; Yoda i sur., 2000). Navedeni defekti podsjećaju na one primijećene kod stanica mutanata *rrp6* prilikom uzgoja pri povišenoj temperaturi (Oskomić, Završni rad). Zanimljivo je da je ekspresija gena *PSA1* u stanicama *rrp6* dva puta manja u odnosu na onu u stanicama divljeg tipa tijekom toplinskog šoka 45 min na 42°C (Slika 6A). Smanjena razina ekspresije esencijalnog enzima Psa1, ili aditivni defekt u procesu manozilacije, mogli bi biti razlog za destabilizaciju stanične stijenke i time letalnost mutanta *rrp6* na 37°C. Kako bi se testirala ova hipoteza, u ovom radu je ispitan utjecaj prekomjerne ekspresije gena *PSA1* na morfologiju i vijabilnost mutanta *rrp6* pri povišenoj temperaturi. Također, pri istim uvjetima ispitana je i morfologija i vijabilnost mutanta *rrp47*, u kojemu je deletiran gen koji kodira za proteinski kofaktor Rrp47 koji stupa u interakciju s Rrp6 podjedinicom, te mutanata za katalitičku aktivnost podjedinice RNA egzosoma Dis3.

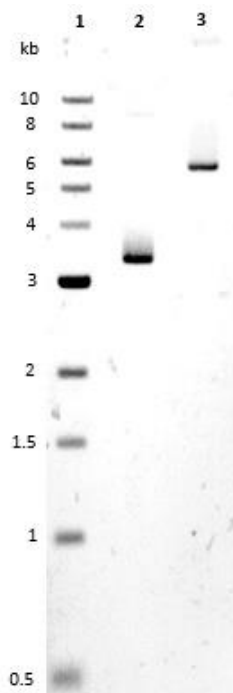
#### **4. Umnažanje i restriksijska analiza plazmida za prekomjernu ekspresiju gena *PSA1***

##### **4.1. Transformacija bakterije *Escherichia coli* i izolacija plazmida YEp352 i YEp352-*PSA1***

U ovom su radu stanice kvasca *S. cerevisiae* transformirane 2 $\mu$  plazmidima koji se u stanicama repliciraju u velikom broju kopija (engl. *multicopy plasmid*), koje je prethodno bilo potrebno umnožiti u stanicama bakterije *Escherichia coli* i provjeriti restriksijskom analizom. Korištene su dvije vrste plazmida, tzv. prazni plazmid (YEp352) i istovjetni plazmid s genom *PSA1* (YEp352-*PSA1*) pod regulacijom vlastitog promotora. Replikacijom plazmida YEp352-*PSA1* u stanicama kvasca u velikom broju kopija dolazi do prekomjerne ekspresije gena *PSA1*. Oba plazmida transformirana su u komercijalne kompetentne stanice DH5 $\alpha$  linije sojeva



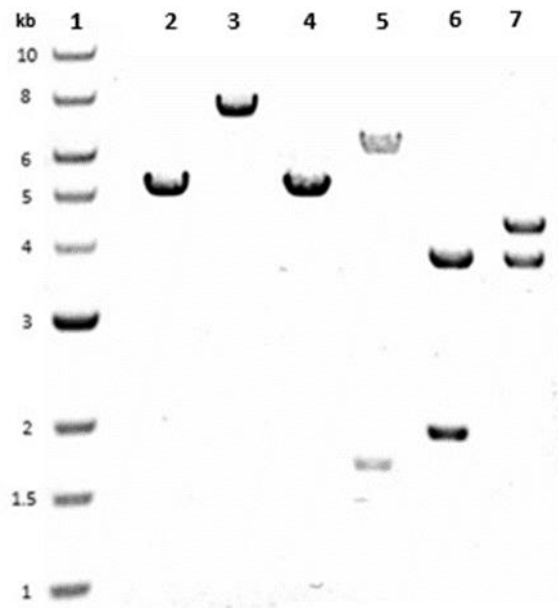
bakterije *E. coli*. Korištenje transformiranih bakterijskih stanica iznimno je učinkovito za generiranje velikog broja kopija plazmida, budući da imaju minimalne nutritivne zahtjeve te su im generacijska vremena kratka, a postupak izolacija plazmida iz ovih stanica je jednostavan. Transformanti su selekcionirani na LB podlogama s dodatkom ampicilina te su potom uzgojene prekončne bakterijske kulture u LB podlozi s ampicilinom te je provedena izolacija plazmidne DNA (miniprep metoda – vidi Materijale i metode). Uspješnost izolacije plazmida provjerena je elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu. Vizualizacija vrpce u gelu nakon provedene gel elektroforeze praznog plazmida YEp352 i plazmida za prekomjernu ekspresiju YEp352-PSA1 pokazuje uspješnu izolaciju plazmida. Također, vrpce plazmida YEp352-PSA1 i praznog plazmida YEp352 nalaze se na različitim udaljenostima od jažica u gelu, što potvrđuje njihove različite molekulske mase (Slika 7).



**Slika 7.** Provjera uspješnosti izolacije plazmida YEp352 i plazmida za prekomjernu ekspresiju *PSA1* gena YEp352-*PSA1* iz transformiranih stanica *E. coli*. Uzorci: 1. standardi 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs); 2. prazni plazmid YEp352; 3. plazmid za prekomjernu ekspresiju *PSA1* gena YEp352-*PSA1*.

#### 4.2. Restriksijska analiza plazmida YEp352 i YEp352-PSA1

Sekvenca plazmida YEp352 pribavljena je iz baze na Addgene stranici, a sekvenca plazmida za prekomjernu ekspresiju gena *PSA1*, YEp352-*PSA1*, konstruirana je u platformi Benchling prema opisu iz originalnog rada (Janik i sur., 2003) te je prema tome pripremljena eksperimentalna strategija provedbe restriksijske analize. Kako bi se provjerile njihove sekvence, odnosno ispravnost za korištenje u daljnjim eksperimentima, plazmidi YEp352 i YEp352-*PSA1* pocijepani su restriksijskim endonukleazama, a nastali fragmenti razdvojeni su gel elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu. Mape plazmida s naznačenim restriksijskim mjestima prikazane su na Slici 5 u Materijalima i metodama. Restriksijska analiza provedena je s tri različite restriksijske endonukleaze (Slika 8). Restriksijska endonukleaza *SacI* korištena je za linearizaciju oba plazmida. Nakon provedene restrikcije i agarozne gel elektroforeze, na gelu su vizualizirane dvije vrpce koje veličinom odgovaraju očekivanim veličinama lineariziranih plazmida koji nastaju cijepanjem s restriksijskom endonukleazom *SacI* te iznose 5181 pb za YEp352 (Slika 8, jažica 2) i 7904 pb za YEp352-*PSA1* (Slika 8, jažica 3). Restriksijska endonukleaza *EcoRI* cijepa prazni plazmid YEp352 samo na jednom restriksijskom mjestu, a plazmid za prekomjernu ekspresiju YEp352-*PSA1* na dva restriksijska mjesta. Kod restrikcije s *EcoRI*, u slučaju s plazmidom YEp352 vidljiva je jedna vrpca, u skladu s očekivanom veličinom fragmenta od 5181 pb (Slika 8, jažica 4), dok su u slučaju s YEp352-*PSA1* uočljive vrpce veličina 1458 pb i 6446 pb (Slika 8, jažica 5), što potvrđuje postojanje dva restriksijska mjesta *EcoRI* enzima i očekivane veličine restriksijskih fragmenata. Restriksijska endonukleaza *BglI* cijepa ove plazmide na dva restriksijska mjesta. U šestoj i sedmoj jažici vidljive su vrpce istih veličina koje iznose 3613 pb kod oba plazmida pocijepana s *BglI* restriksijskom endonukleazom. Uz vrpca uočljivu na 3613 pb, kod plazmida YEp352 vidljiva je i druga vrpca veličine 1568 pb, a kod YEp352-*PSA1* veličina druge vrpce iznosi 4291 pb. Restriksijskom analizom utvrđena je ispravnost sekvenci oba plazmida, odnosno prisutnost *PSA1* gena u YEp352-*PSA1* plazmidu.



**Slika 8.** Rezultat restrikcijske analize plazmida YEp352 i YEp352-PSA1. Uzorci: 1. standardi 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs); 2. plazmid YEp352 nakon restrikcije sa *SacI*; 3. plazmid YEp352-PSA1 nakon restrikcije sa *SacI*; 4. plazmid YEp352 nakon restrikcije s *EcoRI*; 5. plazmid YEp352-PSA1 nakon restrikcije s *EcoRI*; 6. plazmid YEp352 nakon restrikcije s *BglI*; 7. plazmid YEp352-PSA1 nakon restrikcije s *BglI*.

##### **5. Utjecaj prekomjerne ekspresije gena *PSA1* na vijabilnost i morfologiju stanica *S. cerevisiae* u kojima su inaktivirane podjedinice i kofaktor RNA egzosoma tijekom uzgoja pri povišenoj temperaturi**

Stanice kvasca *S. cerevisiae* u laboratoriju tipično se uzgajaju u temperaturnom rasponu od 28°C do 30°C. Kvasac tolerira umjerene temperaturne devijacije, no uzgoj pri

restriktivnim temperaturama može imati značajan utjecaj na strukturu i stabilnost stanice (Munna i sur., 2015). Uočeno je da izlaganje okolišnom stresu, poput povišene temperature, uzrokuje disrupciju mnogih intracelularnih procesa (Bond, 2006). Na temperaturama višim od 36 ili 37°C, aktivira se ekspresija gena koji kodiraju za proteine temperaturnog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSP) (Morano i sur., 2012). Uz mnogobrojne efekte temperaturnog šoka, koji se odražavaju na procese unutar stanice, stres uzrokovan povišenom temperaturom utječe i na vanjski dio stanice – staničnu stijenku (Verghese i sur., 2012). Potvrda destabilizacije stanične stijenke pri povišenim temperaturama je aktivacija CWI (engl. *cell wall integrity pathway*, CWI) signalnog puta, odnosno mehanizma za očuvanje integriteta stanične stijenke (Levin, 2011). Stanice kvasca održavaju visoki unutarstanični turgorski pritisak, stoga čak i minimalni defekti strukture stanične stijenke mogu biti letalni za stanicu (Verghese i sur., 2012).

Pri uvjetima povišene temperature, mutante za katalitičke podjedinice RNA egzosoma obilježava destabilizacija stanične stijenke, čime dolazi do gubitka vijabilnosti stanica. Usprkos povišenoj temperaturi, uzgoj uz prisutnost osmotskog stabilizatora 1 M sorbitola, znatno popravljiva vijabilnost te defektan fenotip mutanata (Oskomić, Završni rad; Štrbac, Završni rad). Specifično, ovakav fenotip pokazuju stanice u kojima je deletiran gen koji kodira za podjedinicu Rrp6 (*rrp6*) te stanice u kojima je inaktivirana egzoribonukleazna aktivnost podjedinice Dis3 (*dis3 exo*) (Oskomić, Završni rad; Štrbac, Završni rad). Kako bi se ispitalo je li opisani fenotip posljedica defekta u manozilaciji proteina, stanice divljeg tipa, mutanata *rrp6* i *rrp47* te stanice katalitičkih mutanata za aktivnost proteina Dis3 transformirane su plazmidima YEp352 i YEp352-PSA1 prema prethodno opisanom protokolu (vidi Materijale i metode).

Transformirane stanice naciepljene su na selektivne krute YNB -Ura podloge (u slučaju stanica divljeg tipa te mutanata *rrp6* i *rrp47*), odnosno YNB -Ura -Leu podlogu (u slučaju mutanata Dis3). Ploče su inkubirane na 30°C do porasta kolonija. Stanice BMA41 linije sojeva su auksotrofni mutanti za uracil i stoga ne mogu rasti na podlogama koje ne sadrže uracil. Shodno tome, na YNB -Ura podlogama narasle su samo stanice kvasca koje su uspješno transformacijom primile plazmid. Za razliku od mutanata iz BMA41 linije sojeva, katalitički

mutanti za Dis3 podjedinicu egzosoma selekcionirani su na YNB -Ura -Leu podlozi obzirom da su mutanti prethodno konstruirani s plazmidom na kojem se nalazi selektivni marker gen *LEU2* te su stanice tijekom svih eksperimenata uzgajane u podlozi koja ne sadrži aminokiselinu leucin.

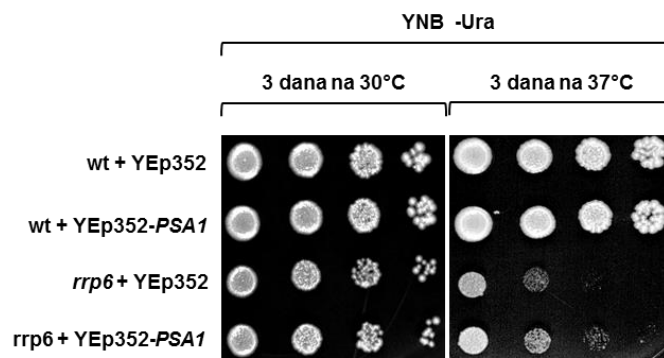
### **5.1. Utjecaj prekomjerne ekspresije gena *PSA1* na vijabilnost i morfologiju stanica mutanta *rrp6* tijekom uzgoja na povišenoj temperaturi**

Transformirani sojevi podvrgnuti su *in vivo* fenotipskoj analizi - testu rasta (engl. *plate assay*). Test rasta je semikvantitativna metoda koja omogućuje identifikaciju stanica koje se mogu dijeliti te usporedbu različitih sojeva mutanata s kontrolnim stanicama divljeg tipa (Kwolek-Mirek i Zadrag-Tecza, 2014). Rast stanica kvasca *S. cerevisiae* je također uspoređen za svaki soj između kontrolnih stanica koje su transformirane praznim plazmidom YEp352 i stanica transformiranim plazmidom za prekomjernu ekspresiju gena *PSA1*, YEp352-*PSA1*.

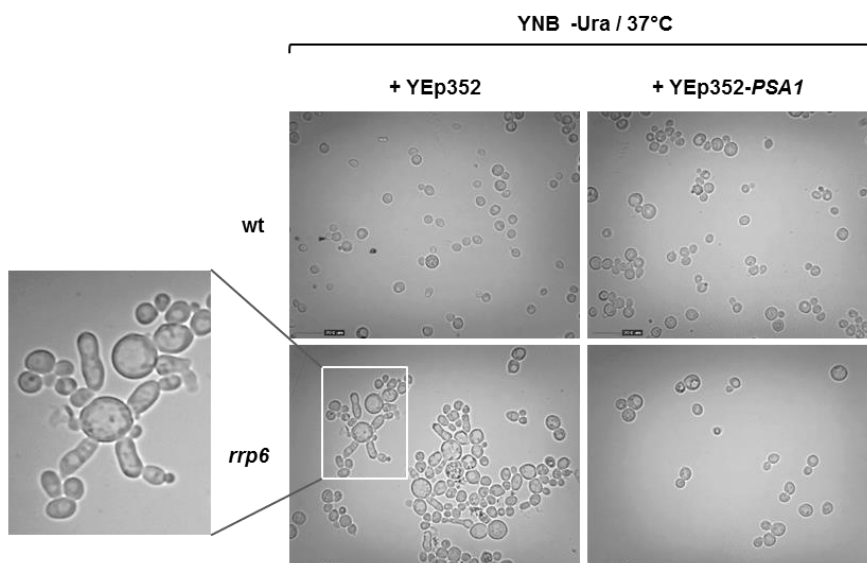
Prvo je ispitan rast stanica mutanta *rrp6* iz BMA41 linije sojeva, kojem je deletiran cijeli gen *RRP6*. Stanice divljeg tipa (wt) i izogenog mutanta *rrp6* transformirane plazmidima YEp352 i YEp352-*PSA1* uzgojene su pri 30°C do logaritamske faze rasta u YNB -Ura tekućoj podlozi te su potom podvrgnute testu rasta pri 30°C i 37°C tijekom tri dana na YNB -Ura krutoj selektivnoj podlozi. Očekivano, nakon tri dana uzgoja na 30°C nije vidljiva razlika u rastu između divljeg tipa i mutanta *rrp6* neovisno o prekomjernoj ekspresiji gena *PSA1* (Slika **9A**). Na temperaturi od 37°C, nakon trodnevne inkubacije uočljiv je defekt u rastu mutanta *rrp6* transformiranog praznim plazmidom YEp352, u odnosu na kontrolne stanice divljeg tipa transformirane istim plazmidom, čime se potvrđuje prije spomenuta temperaturna osjetljivost tog mutanta (Allmang i sur., 1999 b). Analogno spašavanju rasta osmotskom stabilizacijom (Oskomić, Završni rad), pojačanom ekspresijom *PSA1* gena koji omogućuje sintezu GDP-manoze tj. prekursorske molekule za izgradnju stanične stijenke, stanicama mutanta *rrp6* značajno se popravlja rast prilikom uzgoja na restriktivnoj temperaturi od 37°C u usporedbi s istim stanicama transformiranim praznim plazmidom (Slika **9A**). Defekt u rastu primijećen kod stanica mutanta *rrp6* transformiranih praznim plazmidom YEp352 (Slika **9A**) potvrđuju i

morfološke promjene stanica, koje se mogu uočiti svjetlosnim mikroskopom. Stanice mutanta *rrp6* transformirane praznim plazmidom povećanog su volumena, izduženog i nabubrenog izgleda pri 37°C, što je vidljivo na Slici 9B. Prilikom mikroskopskog promatranja stanica, vidljivo je da stanice mutanta *rrp6* formiraju nakupine od nekoliko stanica, što indicira na mogućnost flokulacije ili nepravilne segregacije (odvajanja) stanica prilikom diobe (Zhang i sur., 1999; Ufano i sur., 2004). Stanice mutanta *rrp6* uzgojene u uvjetima prekomjerne ekspresije *PSA1* gena zadržavaju oblik stanica divljeg tipa, a zastupljenost višestaničnih agregata znatno je smanjena (Slika 9B). Popravak rasta i aberantne morfologije stanica *rrp6* prekomjernom ekspresijom gena *PSA1* pokazuje ulogu podjedinice Rrp6 u osiguravanju adekvatne manozilacije proteina, koja je nužna za održavanje integriteta stanične stijenke i vijabilnost stanica.

A



B



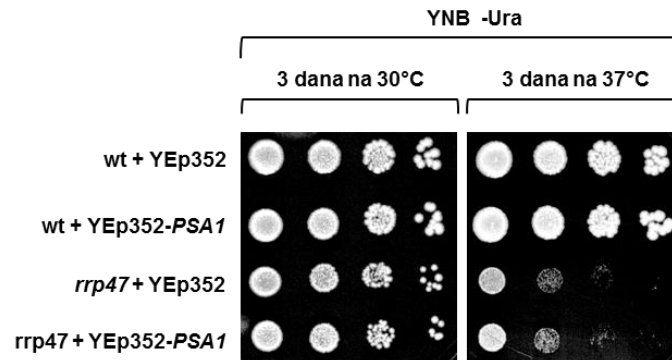
**Slika 9.** Vijabilnost stanica kvasca ispitana je testom rasta (**A**). Stanice divljeg tipa BMA41 te mutanta *rrp6* transformiranih plazmidima YEp352 i YEp352-*PSA1* uzgojene su u YNB -Ura selektivnoj podlozi do logaritamske faze rasta na 30°C te su decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena na 30°C i 37°C. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta. (**B**) Morfologija stanica divljeg tipa i mutanta *rrp6* transformiranih plazmidima YEp352 i YEp352-*PSA1* uzgojenih pri 37°C na YNB -Ura selektivnoj podlozi, vizualizirana je svjetlosnim mikroskopom opremljenim s Dino-Lite digitalnom kamerom nakon 3 dana rasta.

## **5.2. Utjecaj prekomjerne ekspresije gena *PSA1* na vijabilnost i morfologiju stanica mutanta *rrp47* tijekom uzgoja na povišenoj temperaturi**

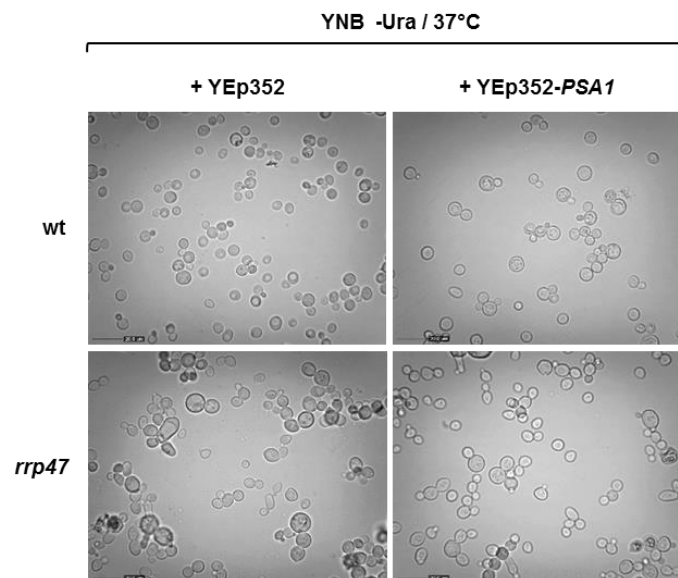
U stanicama mutanta *rrp47* deletiran je gen *RRP47* koji kodira za kofaktor egzoribonukleazne podjedinice Rrp6, protein Rrp47. Kofaktor Rrp47 stabilizira Rrp6 podjedinicu egzosoma (Stuparevic i sur., 2013; Feigenbutz i sur., 2013), a nedostatak ili djelomični gubitak funkcije Rrp47 uzrokuje defekte u procesiranju i degradaciji RNA supstrata. Sukladno tome, slične fenotipske karakteristike kao kod mutanta *rrp6*, poput temperaturne osjetljivosti, opažene su sa stanicama mutanta *rrp47* prilikom uzgoja na povišenoj temperaturi (Mitchell i sur., 2003). Kako bi se ispitalo je li uzrok gubitka vijabilnosti stanica mutanta *rrp47* prilikom uzgoja na 37°C kompromitirana manozilacija proteina, stanice transformirane plazmidima YEp352 i YEp352-*PSA1* podvrgnute su testu rasta te su uspoređene sa stanicama divljeg tipa, kao što je opisano sa stanicama mutanta *rrp6* (vidi gore). Kao i u slučaju *rrp6* + YEp352-*PSA1*, prekomjerna ekspresija gena *PSA1* u stanicama mutanta *rrp47* suprimirala je temperaturno-osjetljiv fenotip ovog mutanta, odnosno značajno je popravila rast ovih stanica pri povišenoj temperaturi u usporedbi sa stanicama *rrp47* koje su transformirane praznim plazmidom (Slika **10A**). Supresija defekta u rastu vidljiva je i prilikom vizualizacije stanica svjetlosnim mikroskopom. Stanice mutanta *rrp47* kod kojih je prisutna prekomjerna ekspresija *PSA1*, u usporedbi s istovjetnim mutantima transformiranim praznim plazmidom, ovalnog su oblika i manjeg volumena poput stanica divljeg tipa (Slika **10B**). Pokazani fenotip potvrđuje da

je manozilacija proteina limitirajući faktor za rast mutanata *rrp6* i *rrp47* pri povišenoj temperaturi.

**A**



**B**



**Slika 10.** Vijabilnost stanica kvasca ispitana je testom rasta (**A**). Stanice divljeg tipa BMA41 te mutanta *rrp47* transformiranih plazmidima YEp352 i YEp352-PSA1 uzgojene su u YNB -Ura selektivnoj podlozi do logaritamske faze rasta na 30°C te su decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena na 30°C i 37°C. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta. (**B**) Morfologija stanica divljeg tipa i mutanta *rrp47* transformiranih plazmidima YEp352 i YEp352-PSA1 uzgojenih pri 37°C na YNB -Ura selektivnoj podlozi, vizualizirana je svjetlosnim mikroskopom opremljenim s Dino-Lite digitalnom kamerom nakon 3 dana rasta.

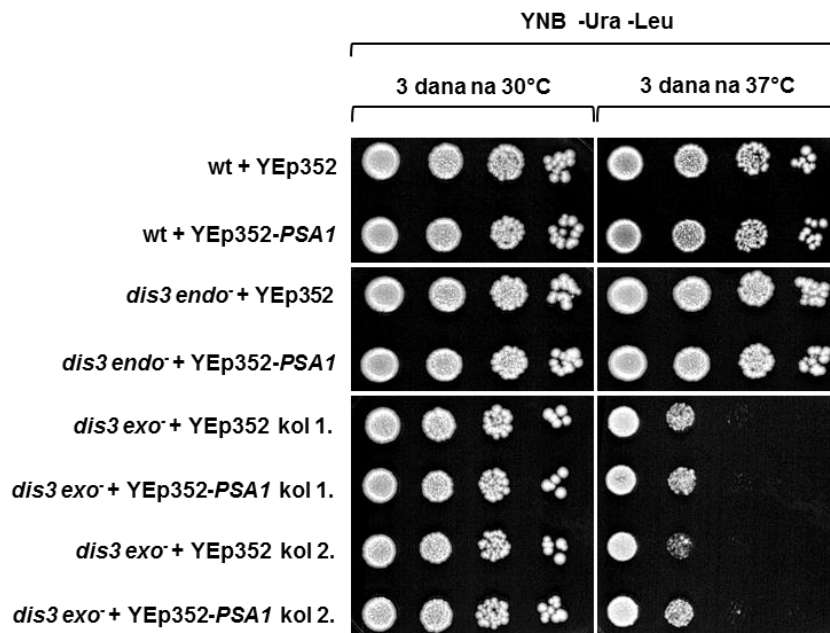


### 5.3. Utjecaj prekomjerne ekspresije gena *PSA1* na vijabilnost i morfologiju katalitičkih mutanata *Dis3* podjedinice tijekom uzgoja na povišenoj temperaturi

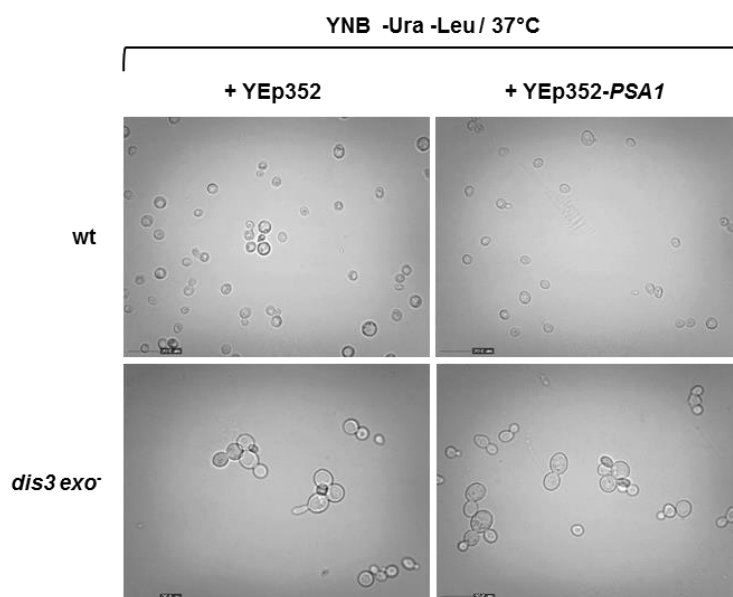
Za razliku od gena *RRP6* i *RRP47*, gen *DIS3* je esencijalan. Stoga, delecija ovog gena nije moguća, zbog čega je provedeno istraživanje s mutantima za katalitičke aktivnosti *Dis3*, odnosno s mutantima kod kojih su inaktivirane endo- i egzoribonukleazna aktivnost ovog proteina. U radu su korišteni prethodno konstruirani sojevi kojima je u genomu deletiran gen *DIS3*, a na centromernom plazmidu je prisutna funkcionalna kopija gena *DIS3* (ekvivalentne stanicama divljeg tipa) ili inačica gena *DIS3* u koju je uvedena točkasta mutacija koja inaktivira endoribonukleaznu (stanice *dis3 endo<sup>-</sup>*, odnosno *dis3-D171N*), odnosno egzoribonukleaznu (stanice *dis3 exo<sup>-</sup>*, *dis3-D551N*) aktivnost proteina *Dis3* (Stuparevic i sur., 2013). Kako bi se osigurala selekcija stanica s plazmidom, na plazmidu se nalazi marker gen *LEU2* te su stanice tijekom svih eksperimenata uzgajane u podlozi koja ne sadrži aminokiselinu leucin. Katalitički mutanti *Dis3* podjedinice korišteni su u radu obzirom da je kod mutanta za egzoribonukleaznu aktivnost *Dis3* također uočena temperaturna osjetljivost koja je uzrokom slična osjetljivosti *rrp6* mutanta, odnosno posljedica je destabilizacije stanične stijenke (Milbury i sur., 2019; Štrbac, Završni rad). Stanice *DIS3* (ekvivalentne stanicama divljeg tipa) i izogenih katalitičkih mutanata *dis3 endo<sup>-</sup>* i *dis3 exo<sup>-</sup>* transformirane plazmidima YEp352 i YEp352-*PSA1* uzgojene su pri 30°C do logaritamske faze rasta u YNB -Ura -Leu tekućoj podlozi te su potom podvrgnute testu rasta pri 30°C i 37°C tijekom tri dana na YNB -Ura -Leu krutoj selektivnoj podlozi. U skladu s očekivanjima, katalitički mutanti *Dis3* podjedinice koji su uzgajani na YNB -Ura -Leu selektivnoj podlozi 3 dana na 30°C, nisu pokazali razliku u rastu u odnosu na stanice divljeg tipa neovisno o prekomjernoj ekspresiji gena *PSA1* (Slika 11A). U skladu s prijašnjim rezultatima (Štrbac, Završni rad), kod uzgoja tijekom 3 dana na 37°C primijećen je gubitak vijabilnosti *dis3 exo<sup>-</sup>* mutanta u uvjetima bez prekomjerne ekspresije gena *PSA1* (YEp352) te aberantan fenotip koji karakteriziraju stanice povećanog volumena te nepravilnog oblika uz nakupljanje višestaničnih agregata (Slike 11 A i B). Iako je kod mutanata *rrp6* i *rrp47* prekomjerna ekspresija gena *PSA1* dovela do praktički potpunog spašavanja fenotipskih defekata pri povišenoj temperaturi, u slučaju mutanta *dis3 exo<sup>-</sup>* spašavanje rasta prilikom prekomjerne ekspresije *PSA1* je bilo

značajno slabije (Slika 11A, *dis3* *exo*<sup>-</sup> kol. 2) ili je u potpunosti izostalo (Slika 11A, *dis3* *exo*<sup>-</sup> kol. 1).

**A**



**B**



**Slika 11.** Vijabilnost stanica kvasca ispitana je testom rasta (**A**). Stanice divljeg tipa te mutanta *dis3<sup>exo</sup>* i *dis3<sup>endo</sup>* transformiranih plazmidima YEp352 i YEp352-*PSA1* uzgojene su u YNB -Ura -Leu selektivnoj podlozi do logaritamske faze rasta na 30°C te su decimalna razrjeđenja takve kulture nacijepljena na 30°C i 37°C. Ploče su fotografirane nakon 3 dana rasta. (**B**) Morfologija stanica divljeg tipa i mutanta *dis3<sup>exo</sup>* transformiranih plazmidima YEp352 i YEp352-*PSA1* uzgojenih pri 37°C na YNB -Ura -Leu selektivnoj podlozi, vizualizirana je svjetlosnim mikroskopom opremljenim s Dino-Lite digitalnom kamerom nakon 3 dana rasta.

## RASPRAVA

RNA egzosom ima esencijalnu ulogu u razgradnji, kontroli kvalitete i sazrijevanju RNA molekula (Mitchell i sur., 1997). Sastoji se od devet podjedinica koje čine katalitički-inaktivnu jezgru egzosoma (Exo9) i dvije katalitičke podjedinice, Rrp6 i Dis3, koje sudjeluju u reakcijama procesiranja i degradiranja RNA supstrata poput mRNA, rRNA, snRNA, snoRNA i tRNA (Mitchell i sur., 1997). Ovaj kompleks evolucijski je očuvan u stanicama svih eukariota, a najveći broj istraživanja strukture i funkcije RNA egzosoma proveden je sa stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Opći cilj ovog rada bio je istražiti povezanost između procesa degradacije RNA djelovanjem RNA egzosoma s promjenama u ekspresiji gena koje utječu na proces glikozilacije proteina. U tu svrhu iskorišteno je prethodno pokazano svojstvo narušene stabilnosti stanične stijenke određenih mutanata za podjedinice RNA egzosoma kvasca *S. cerevisiae*, zbog kojeg dolazi do smanjene vijabilnosti ovih stanica pri povišenoj temperaturi (Wang i sur., 2020; Oskomić, Završni rad; Štrbac, Završni rad). Budući da je manozilacija ključna za pravilnu modifikaciju proteina stanične stijenke i time njenu stabilnost, specifični cilj ovog rada bio je ispitati može li prekomjerna ekspresija gena *PSA1*, čiji proteinski produkt katalizira početni korak u procesu manozilacije proteina, suprimirati letalan fenotip ovih mutanata pri povišenoj temperaturi.

Prethodno je utvrđeno da su stanice mutanata u kojima je deletiran gen koji kodira za katalitičku podjedinicu RNA egzosoma Rrp6 (*rrp6*) ili njen kofaktor Rrp47 (*rrp47*) temperaturno-osjetljive, odnosno da su ove mutacije letalne pri povišenoj temperaturi (Mitchell i sur., 2003; Butler i Mitchell, 2010). Nedavno je razjašnjeno da je ovakav fenotip u slučaju mutanta *rrp6* posljedica narušavanja integriteta stanične stijenke te da osmotska stabilizacija medija za uzgoj može dovesti do stabilizacije stanične stijenke i održavanja vijabilnosti ovih stanica pri povišenoj temperaturi (Oskomić, Završni rad). Također, nedavno objavljeni rad (Wang i sur., 2020) ukazao je na potencijalnu ulogu proteina Rrp6 u ispravnom odvijanju CWI signalnog puta, koji utječe na ekspresiju gena pri uvjetima koji su stresni za održavanje staničnog

integriteta. U tom radu objavljeni su podatci RNA-sekvenciranja kojima je omogućen uvid u razinu ekspresije svih gena kvasca u stanicama divljeg tipa te mutanta *rrp6* prije i nakon toplinskog šoka. Preliminarnom bioinformatičkom analizom vizualizirana je promjena ekspresije gena čiji proteinski produkti sudjeluju u formiranju stanične stijenke, preciznije u sintezi prekursora za izgradnju stanične stijenke i glikozilaciji proteina. Rezultati ove analize pokazali su smanjenu razinu ekspresije gena koji kodiraju za enzime koji sudjeluju u sintezi prekursora za izgradnju stijenke, *PSA1* i *DPM1*, te enzima koji sudjeluje u prvom koraku sinteze prekursora za N-glikozilaciju, *ALG7*, u stanicama mutanta *rrp6* prilikom izlaganja toplinskom šoku (Slike **6 A** i **B**). Zbog velike zastupljenosti manoznih skupina, glikoproteini kvasca još se nazivaju manoproteinima, a sva tri gena uključena su u rane korake procesa manozilacije u stanicama kvasca (Slika **6C**). Poznato je da defekti u vrlo ranim koracima glikozilacije, posebice manozilacije koja je esencijalna za staničnu vijabilnost, narušavaju stabilnost stanične stijenke (Janik sur., 2012). Ovaj preliminarni rezultat otvorio je pitanje je li upravo defekt u manozilaciji proteina razlog narušavanja stabilnosti stanične stijenke kod stanica u kojima su inaktivirane podjedinice RNA egzosoma.

Gen *PSA1* kvasca *S. cerevisiae* kodira za enzim GDP-manoza pirofosforilazu, koji katalizira reakciju sinteze GDP-manoze, donora manoze koji sudjeluje u svim nizvodnim reakcijama glikozilacije proteina stanične stijenke. Prekomjernom ekspresijom gena *PSA1* u stanicama povećava se zaliha GDP-manoze (Janik i sur., 2003), te time i kapacitet stanica za glikozilaciju proteina, te bi se na taj način mogli popraviti fenotipski defekti koji proizlaze iz defekata u procesu manozilacije proteina. U tu svrhu su stanice kvasca u ovom radu transformirane plazmidom YEp352-*PSA1*, koji zbog umnažanja u stanicama u velikom broju kopija dovodi do prekomjerne ekspresije gena *PSA1*. Usporedbom rasta stanica transformiranim praznim plazmidom YEp352 te plazmidom YEp352-*PSA1*, uočljivo je kako prekomjerna ekspresija gena *PSA1* u potpunosti spašava rast te popravlja aberantnu morfologiju mutanata *rrp6* i *rrp47* pri povišenoj temperaturi (Slike **9** i **10**). Aberantna morfologija, koja se očituje u povećanju volumena stanica i formiranju višestaničnih agregata,

može se objasniti pleiotrofnim učinkom gena *PSA1*, budući da glikozilirani proteini u stanicama kvasca nisu potrebni samo za održavanje integriteta stanične stijenke, nego i za diobu stanica, odnosno nastanak pupa i odvajanje stanica prilikom pupanja (Zhang i sur., 1999). Rrp6 sadrži N-terminalnu domenu važnu za interakciju s kofaktorom Rrp47 (Stead i sur., 2007). Rezultati prijašnjih istraživanja pokazali su snažnu međuovisnost ovih dvaju proteinskih partnera, pri čemu odsutnost proteina Rrp6 vodi do potpunog izostanka proteina Rrp47 u stanicama, dok odsutnost proteina Rrp47 dovodi do smanjene koncentracije proteina Rrp6 (Feigenbutz i sur., 2013; Stuparevic i sur., 2013). U skladu s time, popravak rasta i fenotip postignut prekomjernom ekspresijom gena *PSA1* kod mutanata *rrp6* i *rrp47* ukazuje na važnost međusobne interakcije ovih proteina prilikom osiguravanja adekvatne manozilacije proteina koja je nužna za održavanje integriteta stanične stijenke. Važno je napomenuti da uzrok defekta u procesu manozilacije u stanicama ovih mutanata pri povišenoj temperaturi može biti smanjena razina ekspresije gena *PSA1*, ali također i drugih gena koji kodiraju za proteine uključene u rane korake manozilacije, kao što su *DPM1* i *ALG7* (Slika 6).

Za razliku od Rrp6 i Rrp47, Dis3 (poznat i pod nazivom Rrp44) je esencijalan za vijabilnost stanica te posjeduje egzoribonukleaznu i endoribonukleaznu aktivnost. Inaktivacija egzoribonukleazne aktivnosti RNB domene (mutacija D551N) rezultira fenotipom sporog rasta, nepotpunim procesiranjem RNA supstrata te temperaturnom-osjetljivosti (Dziembowski i sur., 2007), a inaktivacija endonukleazne aktivnosti PIN domene (mutacija D171N) samo fenotipima sporog rasta i nepotpunim procesiranjem RNA supstrata (Lebreton i sur., 2008; Schaeffer i sur., 2009). Kao i u slučaju mutanta *rrp6*, uzrok temperaturne osjetljivosti mutanta *dis3<sup>exo</sup>*, odnosno defekta u rastu i morfologiji pri povišenoj temperaturi, je oslabljena stanična stijenka (Štrbac, Završni rad), te je u ovome radu ispitano može li prekomjerna ekspresija gena *PSA1* dovesti do supresije navedenih fenotipova. Budući da se funkcije Rrp6 i Dis3 međusobno preklapaju (Dziembowski i sur., 2007) te da Rrp6 alosterički stimulira aktivnost Dis3 (Wasmuth i Lima, 2012), popravak fenotipa prekomjernom ekspresijom gena *PSA1* bilo je moguće očekivati i u slučaju inaktivacije ribonukleazne aktivnosti Dis3. No, *dis3<sup>exo</sup>* mutant pokazao

je samo naznake djelomičnog popravka rasta i fenotipa pri povišenoj temperaturi (Slika 11). Moguće objašnjenje za dobiveni rezultat su specifične uloge Rrp6 i Dis3. Naime, iako se velik broj supstrata Rrp6 i Dis3 preklapa, zapažena je specifičnost u obradi RNA ovih katalitičkih podjedinica. Na primjer, za razliku od Dis3, Rrp6 ima glavnu ulogu u degradaciji prekursora za sn/snoRNA molekule (Gudipati i sur., 2012). Također, praćenjem razina RNA u stanicama mutanata utvrđeno je kako se nakupljanje pojedinih supstrata razlikuje kod mutanata za pojedinačnu katalitičku podjedinicu (Gudipati i sur., 2012). Dakle, degradacija ili procesiranje određenog RNA supstrata nije uvijek uvjetovana s obje katalitičke podjedinice RNA egzosoma. Budući da je temperaturna osjetljivost, koja rezultira oslabljenom staničnom stijenkom te letalnim fenotipom, osim kod *rrp6* utvrđena i kod mutanta *dis3<sup>exo-</sup>*, moguće je da je u slučaju mutanta *dis3<sup>exo-</sup>* defekt u stabilnosti stijenke posljedica promjene razine ekspresije nekog drugog gena koji kodira za protein nužan za stabilnost stanične stijenke pri povišenoj temperaturi. Iz toga slijedi pretpostavka da Rrp6 ima značajniju, odnosno specifičniju ulogu u degradaciji ili procesiranju RNA supstrata koja utječe primarno na proces glikozilacije proteina. Alternativno objašnjenje slabijeg spašavanja fenotipa stanica mutanta *dis3<sup>exo-</sup>* prilikom prekomjerne ekspresije gena *PSA1* je činjenica da u ovim stanicama mora doći do ekspresije mutirane inačice gena *DIS3* i prekomjerne ekspresije gena *PSA1*, odnosno stabilnog održavanja centromernog i  $2\mu$  plazmida. Eksperiment u kojem bi mutacija koja inaktivira egzoribonukleaznu aktivnost proteina Dis3 bila uvedena izravno u genomsku kopiju *DIS3*, dao bi jasniji uvid u utjecaj prekomjerne ekspresije gena *PSA1* prilikom inaktivacije egzonukleazne domene proteina Dis3.

Obzirom na visoku očuvanost RNA egzosoma u eukariota, saznanja o RNA egzosomu kvasca primjenjiva su i na druge eukariote, poput ljudi. Kod pojedinih ljudskih bolesti zabilježena je povezanost s mutacijama u genima koji kodiraju za podjedinice RNA egzosoma. Na primjer, kod pacijenata koji boluju od multiplog mijeloma (rak plazma stanica), identificirana je pojava mutacija u egzoribonukleaznoj domeni Dis3 (Milbury i sur., 2019). Iako ljudske stanice nemaju staničnu stijenk, glikozilacija proteina je očuvan proces esencijalan za njihovu

vijabilnost. Važnost glikozilacije kod ljudi potvrđuju kongenitalni poremećaji glikozilacije (engl. *congenital disorders of glycosylation*, CDG). CDG uzrokuju zdravstvene probleme kod djece, a karakteriziraju ih poteškoće u razvoju mozga te defekti u funkciji živaca, jetre, želuca i probavnog sustava. Postoji 19 različitih podtipova CDG-a, a poznato je kako sindrom nastaje kao rezultat defekta u pojedinom koraku glikozilacije proteina (Lehle i sur., 2006). Zbog različitih šećera i enzima koji su prisutni u stanicama viših eukariota, a ne i kod kvasaca, glikozilacija kvasca *S. cerevisiae* i viših eukariota znatno se razlikuje u reakcijama koje se odvijaju u Golgijevom aparatu. No, početne reakcije N-glikozilacije u endoplazmatskom retikulumu iznimno su slične u oba eukariota. Rezultati ovog rada ukazuju na defekte u upravo ovim evolucijski očuvanim početnim koracima glikozilacije, koji su posljedica inaktivacije RNA egzosoma. U ovome je radu po prvi puta pokazana povezanost procesa degradacije RNA djelovanjem RNA egzosoma s procesom glikozilacije proteina te, obzirom na sličnost glikozilacije proteina ljudi i kvasca, ovaj rad može pridonijeti istraživanju ljudskih bolesti te razjasniti njihovu potencijalnu povezanost s RNA egzosomom.



## ZAKLJUČCI

1. Delecija gena za katalitičku podjedinicu RNA egzozoma Rrp6 ili kofaktora RNA egzozoma Rrp47 dovodi do defekta u manozilaciji proteina koji rezultira smanjenom stabilnošću stanične stijenke te letalnošću stanica kvasca *S. cerevisiae* pri povišenoj temperaturi. Prekomjerna ekspresija gena *PSA1*, čiji proteinski produkt katalizira važan početni korak manozilacije proteina, u potpunosti suprimira defekte u rastu i morfologiji stanica mutanata *rrp6* i *rrp47* pri povišenoj temperaturi.
2. U usporedbi s mutantima *rrp6* i *rrp47*, prekomjerna ekspresija gena *PSA1* značajno slabije suprimira defekte u rastu i morfologiji stanica mutanta za egzoribonukleaznu aktivnost katalitičke podjedinice Dis3 (*dis3<sup>exo</sup>*) pri povišenoj temperaturi.
3. Potencijalni razlog defekata u procesu manozilacije pri povišenoj temperaturi, odnosno temperature osjetljivosti mutanta *rrp6* je smanjena razina ekspresije gena *PSA1*, *DPM1* i *ALG7*, čiji proteinski produkti sudjeluju u ranim koracima procesa manozilacije proteina.
4. U ovome radu je po prvi puta pokazana povezanost između procesa degradacije RNA djelovanjem RNA egzozoma s promjenama u ekspresiji gena koje utječu na proces glikozilacije proteina u eukariotskim stanicama.

## ZAHVALE

*Ponajprije se zahvaljujemo doc. dr. sc. Igoru Stupareviću što nam je pružio priliku da pod njegovim mentorstvom prijavimo ovaj rad na natječaj za Rektorovu nagradu.*

*Neizmjereno hvala Ani Novačić, mag. ing. biotechn. na prenesenom znanju, brojnim savjetima te strpljenju i susretljivosti prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujemo Valentinu Beauvaisu (CBM, CNRS, Orleans, Francuska) na provođenju bioinformatičke analize uključene u ovaj rad.*

*Hvala svim članovima Laboratorija za biokemiju.*

## POPIS LITERATURE

- Abeijon, C., Hirschberg, C.B., (1992) Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 32-36.
- Aguilar-Uscanga, B., François, J.M., (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 268–274.
- Allmang, Christine, Kufel, Joanna, Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., Tollervey, D., Allmang, C, Kufel, J, (1999 a) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO Journal* **18(19)**, 5399–5410.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., Mitchell, P., (1999 b) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* **13**, 2148–2158.
- Amorim, J. De, Slavotinek, A., Fasken, M.B., Corbett, A.H., Morton, D.J., Corbett, A.H., (2020) Modeling Pathogenic Variants in the RNA Exosome. *RNA Dis.* **7**, 1–9.
- Anwar, M.I., Muhammad, F., Awais, M.M., Akhtar, M., (2017) A review of  $\beta$ -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *Worlds. Poult. Sci. J.* **73**, 651–661.
- Apweiler, R., (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database 1. **1473**, 4–8.
- Arnold, E., Tanner, W., (1982) An obligatory role of protein glycosylation in the life cycle of yeast cells. *FEBS Lett.* **148**, 49–53.
- Barlowe, C.K., Miller, E.A., (2013) Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* **193**, 383–410.
- Bause, E., (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. **209**, 331–336.
- Benton, B.K., Plump, S.D., Roos, J., Lennarz, W.J., Cross, F.R., (1996) Over-expression of *S. cerevisiae* G1 cyclins restores the viability of *alg1* N-glycosylation mutants. *Curr. Genet.* **29**, 106–113.
- Blagoeva, J., Stoev, G., Venkov, P., (1991) Glucan structure in a fragile mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 455–461.
- Bond, U., (2006) Stressed out! Effects of environmental stress on mRNA metabolism. *FEMS Yeast Res.* **6**, 160–170.
- Bonifacino, J.S., Glick, B.S., (2004) The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* **116**, 153–166.
- Bresson, S., Tuck, A., Staneva, D., Tollervey, D., Bresson, S., Tuck, A., Staneva, D., Tollervey,

- D., (2017) Nuclear RNA Decay Pathways Aid Rapid Remodeling of Gene Expression in Yeast. *Mol. Cell* **65**, 1–14.
- Briggs, M.W., Burkard, K.T.D., Butler, J.S., (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Sc1 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 13255–13263.
- Brown, J.D., Hann, B.C., Medzihradzky, K.F., Niwa, M., Burlingame, A.L., Walter, P., (1994) Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *EMBO J.* **13**, 4390–4400.
- Burkard, K.T.D., Butler, J.S., (2000) A Nuclear 3'-5' Exonuclease Involved in mRNA Degradation Interacts with Poly(A) Polymerase and the hnRNA Protein Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 604–616.
- Butler, J.S., Mitchell, P., (2010) Rrp6, Rrp47 and cofactors of the nuclear exosome. U: RNA Exosome, ur., Jensen T.H., Advances in Experimental Medicine and Biology, **702** Springer, str. 91–104.
- Callahan, K.P., Butler, J.S., (2008) Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6645–6655.
- Caro, L.H.P., Smits, G.J., Van Egmond, P., Chapman, J.W., Klis, F.M., (1998) Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 345–349.
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T.H., Dziembowski, A., (2013) RNA decay machines: The exosome. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1829**, 552–560.
- Cid, D., (1995) Molecular Basis of Cell Integrity and Morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* **59**, 345–386.
- Coughlan, C.M., Brodsky, J.L., (2005) Use of yeast as a model system to investigate protein conformational diseases. *Mol. Biotechnol.* **30**, 171–180.
- Delan-Forino, C., Schneider, C., Tollervey, D., (2017) Transcriptome-wide analysis of alternative routes for RNA substrates into the exosome complex. *PLoS Genet.* **13**, 1–25.
- Delic, M., Valli, M., Graf, A.B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., Gasser, B., (2013) The secretory pathway: Exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 872–914.
- De Nobel i Barnett, (1990) Passage of Molecules Through Yeast Cell Walls: a Brief Essay-Review. *Yeast* **7**, 313-323.
- Duina, A.A., Miller, M.E., Keeney, J.B., (2014) Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* **197**, 33–48.
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., Séraphin, B., (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 15–22.
- Fabre, A., Badens, C., (2014) Human Mendelian diseases related to abnormalities of the RNA exosome or its cofactors. *Intractable & Rare Diseases Research* **3(1)**, 8–11.

- 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**, 1–17.
- Feyder, S., De Craene, J.O., Bär, S., Bertazzi, D.L., Friant, S., (2015) Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 1509–1525.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., Sommer, T., (1996) A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S.cerevisiae*. *EMBO J.* **15**, 1482–1494.
- Fleet, G.H., (1985) Composition and structure of yeast cell walls. *Curr. Top. Med. Mycol.* **1**, 24–56.
- Fox, M.J., Mosley, A.L., (2016) Rrp6: Integrated roles in nuclear RNA metabolism and transcription termination. *WIREs RNA* **7**, 91–104
- Free, S.J., (2013) Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis, *Advances in Genetics* **81**, 33-82
- 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**, 546–567.
- Gudipati, R.K., Xu, Z., Lebreton, A., Séraphin, B., Steinmetz, L.M., Jacquier, A., Libri, D., (2012) Extensive Degradation of RNA Precursors by the Exosome in Wild-Type Cells. *Mol. Cell* **48**, 409–421.
- Harold, F.M., (2002) Force and compliance: rethinking morphogenesis in walled cells. *Fungal Genetics and Biology* **37**, 271–282.
- Hashimoto, H., Sakakibara, A., Yamasaki, M., Yoda, K., (1997) *Saccharomyces cerevisiae* VIG9 encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. *J. Biol. Chem.* **272**, 16308–16314.
- Hatahet, F., Ruddock, L.W., (2009) Protein disulfide isomerase: A critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants Redox Signal.* **11**, 2807–2850.
- von Heijne, G., (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**, 99–105.
- Helenius, J., Ng, D.T.W., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A., Aebi, M., (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. **1436**, 447–450.
- Herscovics, A., Orlean, P., (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* **7**, 540-550.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., Jensen, T.H., (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**, 538–542.
- Hohmann, S., (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Protoplasma* **66**, 301–339.

- Huffaker, T.I.M., Tanner, W., (1984) A Temperature-Sensitive Mutant of *S. cerevisiae* that Behaves Like a Cell-Cycle Mutant \*. *Experimental Cell Research* **150**, 309–313.
- Janik, A., Juchimiuk, M., Kruszewska, J., Orowski, J., Pasikowska, M., Palamarczyk, G., (2012) Impact of Yeast Glycosylation Pathway on Cell Integrity and Morphology. *Glycosylation*, 10.5772/48102.
- Janik, A., Sosnowska, M., Kruszewska, J., Krotkiewski, H., Lehle, L., Palamarczyk, G., (2003) Overexpression of GDP-mannose pyrophosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae* corrects defects in dolichol-linked saccharide formation and protein glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1621**, 22–30.
- Jermey, A.J., Willer, M., Davis, E., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., (2006) The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *J. Biol. Chem.* **281**, 7899–7906.
- Jiang, Y., Ferro-Novick, S., (1994) Identification of yeast component A: Reconstitution of the geranylgeranyltransferase that modifies Ypt1p and Sec4p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4377–4381.
- Kampinga H., Craig, E., (2010) The Hsp70 chaperone machinery: J-proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**, 579–592.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., Alves, R., (2011) *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: A comparative study. *PLoS One* **6**.
- Kasturi, L., Chen, H., Shakin-eshleman, S.H., (1997) Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem. J.* **323**, 415–419.
- Kelleher, D.J., Kreibich, G., Gilmore, R., (1992) Oligosaccharyltransferase Activity Is Associated with a Protein Complex Composed of Ribophorins I and II and a 48 kd Protein. *Cell* **69**, 55–65.
- Klis, F.M., (1994) Review: Cell Wall Assembly in Yeast. *YEAST* **10**, 851-869.
- Klis, F.M., Boorsma, A., Groot, P.W.J. De, (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST* **23**, 185–202.
- Knauer, R., Lehle, L., (1994) The N-oligosaccharyltransferase complex from yeast. *FEBS Letters* **344**, 83–86.
- Kollar i sur., (1995) Architecture of the yeast cell wall. *J. Biol. Chem* **272**, 1170-1178.
- Kruszewska, J.S., Saloheimo, M., Penttilä, M., Palamarczyk, G., (1998) Isolation of a *Trichoderma reesei* cDNA encoding GTP:  $\alpha$ -D-mannose-1-phosphate guanyltransferase involved in early steps of protein glycosylation. *Curr. Genet.* **33**, 445–450.
- Kwolek-Mirek, M., Zadrag-Tecza, R., (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res.* **14**, 1068–1079.
- Lacava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., Tollervey, D.,

- (2005) RNA Degradation by the Exosome Is Promoted by a Nuclear Polyadenylation Complex. **121**, 713–724.
- Laribba, G., Elorza, M.V., Villanueva, J.R., Sentadreu, R. (1976) Participation of dolichol phospho-mannose in the glycosylation of yeast wall manno-proteins at the polysomal level. *FEBS Letters* **71**, 316–320.
- Latgé, J.P., (2007) The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **66**, 279–290.
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., Séraphin, B., (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* **456**, 993–996.
- Lee, M.C.S., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., Schekman, R., (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 87–123.
- Lehle, L., (1992) Protein glycosylation in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* **61**, 133–134.
- Lehle, L., Strahl, S., Tanner, W., (2006) Protein glycosylation, conserved from yeast to man: A model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 6802–6818.
- Lesage, G., Bussey, H., (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 317–343.
- Levin, D.E., (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**, 1145–1175.
- Lorentzen, E., Basquin, J., Tomecki, R., Dziembowski, A., Conti, E., (2008) Structure of the Active Subunit of the Yeast Exosome Core, Rrp44: Diverse Modes of Substrate Recruitment in the RNase II Nuclease Family. *Mol. Cell* **29**, 717–728.
- Lussier, M., Sdicu, A.M., Bussey, H., (1999) The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1426**, 323–334.
- Maerkisch, U., Reuter, G., Stateva, L., Venkov, P., (1983) Mannan structure analysis of the fragile *Saccharomyces cerevisiae* mutant VY1160. *Int. J. Biochem.* **15**, 1373–1377.
- Makino, D.L., Schuch, B., Stegmann, E., Baumgärtner, M., Basquin, C., Conti, E., (2015) RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* **524**, 54–58.
- Matlack, K.E.S., Misselwitz, B., Plath, K., Rapoport, T.A., (1999) BIP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- $\alpha$  factor across the ER membrane. *Cell* **97**, 553–564.
- Midtgaard, S.F., Assenholt, J., Thyssen Jonstrup, A., Van, L.B., Heick Jensen, T., Brodersen, D.E., (2006) Structure of the nuclear exosome component Rrp6p reveals an interplay between the active site and the HRDC domain. *PNAS* **103**, 11898–11903.
- Milbury, K.L., Paul, B., Lari, A., Fowler, C., Montpetit, B., Stirling, P.C., (2019) Exonuclease domain mutants of yeast DIS3 display genome instability. *Nucleus* **10**, 1–12.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., (2003) Rrp47p

- Is an Exosome-Associated Protein Required for the 3' Processing of Stable RNAs. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6982–6992.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., Tollervey, D., (1997) The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3→5 Exoribonucleases. *Cell* **91**, 457–466.
- Morano, K.A., Grant, C.M., Moye-Rowley, W.S., (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 1157–1195.
- Mortimer, R.K., (2000) Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* **10**, 403–409.
- Morton, D.J., Kuiper, E.G., Jones, S.K., Leung, S.W., Corbett, A.H., Fasken, M.B., (2017) The RNA Exosome and RNA Exosome-linked Disease. *RNA* **24(2)**, 127–142.
- Mrša, V., (1993) Cell wall of yeast *S. cerevisiae*. *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev.* **31**, 43–50.
- Munna, M.S., Humayun, S., Noor, R., (2015) Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01 Microbiology. *BMC Res. Notes* **8**, 1–8.
- Nielsen, J., (2013) Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. *Bioengineered* **4**, 207–211.
- Ogami, K., (2018) RNA Surveillance by the Nuclear RNA Exosome: Mechanisms and Significance. *Non-Coding RNA* **4(1)**, 1–21.
- Orlean, P., (2012) Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**, 775–818.
- Osborne, A.R., Rapoport, T.A., Van Den Berg, B., (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 529–550.
- Oskomić, M., (2020) Uloga katalitičke podjedinice RNA egzozoma Rrp6 u održavanju vijabilnosti stanica i stabilnosti stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri povišenoj temperaturi, prvostupnički rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Pascal, P., (2008) RNA Exosome Depletion Reveals Transcription Upstream of Active Human Promoters. *Science* **322**, 1851–1854.
- Phillips, S., Butler, J.S., (2003) Contribution of domain structure to the RNA 3' end processing and degradation functions of the nuclear exosome subunit Rrp6p. *RNA* **9**, 1098–1107.
- Plath, K., Rapoport, T.A., (2000) Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **151**, 167–178.
- Pronk, J.T., (2002) Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2095–2100.



- Rapoport, T.A., (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**, 663–669.
- Ronin, C., Bouchilloux, S., Granier, C., (1978) Enzymatic N-glycosylation of synthetic Asn-X-Thr containing peptides. **96**, 179–182.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F.P., Dastidar, E.G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C.M., Van Hoof, A., (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 56–62.
- Schmid, M., Jensen, T.H., (2008) The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 501–510.
- Schneider, C., Tollervey, D., (2013) Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 1–9.
- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Duran, A., Cabib, E., (1991) The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* **114**, 111–123.
- Shimma, Y., Nishikawa, A., Bin Kassim, B., Eto, A., Jigami, Y., (1997) A defect in GTP synthesis affects mannose outer chain elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* **256**, 469–480.
- Siegel, V., Poritz, M., Walter, P., (1987) Functional dissection of the signal recognition particle. *Mol. Biol. Rep.* **12**, 220.
- Sloan, K.E., Schneider, C., Watkins, N.J., (2012) Comparison of the yeast and human nuclear exosome complexes. In *Biochemical Society Transactions* **40**, 850–855.
- Smith, M.H., Ploegh, H.L., Weissman, J.S., (2011) Road to ruin: Targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* **334**, 1086–1090.
- Snider, M.D., Sultzman, L.A., Robbins, P.W., (1980) Transmembrane Location of Oligosaccharide-Lipid Synthesis in Microsomal Vesicles. **21**, 385–392.
- Spiro, R.G., (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43–56.
- Staals, R.H.J., Pruijn, G.J.M., (2010) The human exosome and disease. U: *RNA Exosome*, ur., Jensen T.H., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **702** Springer 132–142.
- Stateva, L.I., Oliver, S.G., Trueman, L.J., Venkov, P. V, (1991) Cloning and characterization of a gene which determines osmotic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4235–4243.
- 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 Res.* **35**, 5556–5567.

- Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J., Davis, R.W., (2002) Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat. Genet.* **31**, 400–404.
- Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R., Tanner, W., (1993) PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8164–8168.
- 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. *J. Biol. Chem.* **288**, 31816–31829.
- Štrbac, L., (2020) Utjecaj katalitičkih aktivnosti podjedinice RNA egzozoma Dis3 na vijabilnost stanica i stabilnost stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, prvostupnički rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Takatsuki A., Arima K., T.G., (1971) Tunicamycin, a new antibiotic. I isolation and characterization of tunicamycin. *The Journal of Antibiotics*, **24(4)**, 215-223.
- Tamarin, (1999) Tamarin: Principles of Genetics, 7. izd., The McGraw–Hill Companies, 124-125.
- Tomlin, G.C., Hamilton, G.E., Gardner, D.C.J., Walmsley, R.M., Stateva, L.I., Oliver, S.G., (2000) Suppression of sorbitol dependence in a strain bearing a mutation in the SRB1/PSA1/VIG9 gene encoding GDP-mannose pyrophosphorylase by PDE2 overexpression suggests a role for the Ras/cAMP signal-transduction pathway in the control of yeast cell-wall bioge. *Microbiology* **146**, 2133–2146.
- Ufano, S., Pablo, M.E., Calzada, A., del Rey, F., Vázquez de Aldana, C.R., (2004) Swm1p subunit of the APC/cyclosome is required for activation of the daughter-specific gene expression program mediated by Ace2p during growth at high temperature in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **117**, 545–557.
- Vai, M., Popolo, L., Alberghina, L., (1987) Effect of tunicamycin on cell cycle progression in budding yeast. *Exp. Cell Res.* **171**, 448–459.
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., Morano, K.A., (2012) Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 115–158.
- Wang, C., Liu, Y., DeMario, S.M., Mandric, I., Gonzalez-Figueroa, C., Chanfreau, G.F., (2020) Rrp6 Moonlights in an RNA Exosome-Independent Manner to Promote Cell Survival and Gene Expression during Stress. *Cell Rep.* **31**, 107754.
- Wasmuth, E. V., Lima, C.D., (2012) Exo- and Endoribonucleolytic Activities of Yeast Cytoplasmic and Nuclear RNA Exosomes Are Dependent on the Noncatalytic Core and

- Central Channel. *Mol. Cell* **48**, 133–144.
- Wasmuth, E. V., Lima, C.D., (2017) The Rrp6 C-terminal domain binds RNA and activates the nuclear RNA exosome. *Nucleic Acids Res.* **45**, 846–860.
- Wasmuth, E. V., Januszyk, K., Lima, C.D., (2014) Structure of an Rrp6 – RNA exosome complex bound to poly ( A ) RNA. *Nature* **511**, 435–439.
- Wild, K., Halic, M., Sinning, I., Beckmann, R., (2004) SRP meets the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1049–1053.
- Willer, M., Jermy, A.J., Young, B.P., Stirling, C.J., (2003) Identification of novel protein-protein interactions at the cytosolic surface of the Sec63 complex in the yeast ER membrane. *Yeast* **20**, 133–148.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J., Dufour, M., Boulay, J., Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., Libri, D., Jacquier, A., Yvette, G., (2005) Cryptic Pol II Transcripts Are Degraded by a Nuclear Quality Control Pathway Involving a New Poly (A) Polymerase. *Cell* **121**, 725–737.
- Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., Perocchi, F., Clauder-Munster S., Camblong, J., Huber, W., Steinmetz, L.M., Guffanti, E., (2009) Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. **457**, 1033-1037.
- Yoda, K., Kawada, T., Kaibara, C., Fujie, A., Abe, M., Hashimoto, H., Shimizu, J., Tomishige, N., Noda, Y., Yamasaki, M., (2000) Defect in cell wall integrity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* caused by a mutation of the GDP-mannose pyrophosphorylase gene VIG9. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1937–1941.
- Yoshida, H., (2007) ER stress and diseases. *FEBS J.* **274**, 630–658.
- Yuxiang, Ji., Meng, Z., Shanjin, H., (2017) Plant Protein Secretion: Methods and Protocols. *Methods Mol. Biol.* **1662**, 1–284.
- Zhang, N., Gardner, D.C.J., Oliver, S.G., Stateva, L.I., (1999) Down-regulation of the expression of PKC1 and SRB1/PSA1/VIG9, two genes involved in cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*, causes flocculation. *Microbiology* **145**, 309–316.
- Zimmermann, A., Hofer, S., Pendl, T., Kainz, K., Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., (2018) Yeast as a tool to identify anti-aging compounds. *FEMS Yeast Res.* **18**, 1–16.
- Zinder, J.C., Lima, C.D., (2017) Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes & Development* **31(2)**, 88–100.

## SAŽETAK

Lucija Štrbac, Marina Oskomić

### Utjecaj RNA egzosoma na manozilaciju proteina i vijabilnost stanica kvasca

#### *Saccharomyces cerevisiae*

RNA egzosom je evolucijski očuvani proteinski kompleks uključen u kontrolu kvalitete, procesiranje i degradaciju različitih vrsta RNA u eukariotskim stanicama. U kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, RNA egzosom sastoji se od strukturne jezgre (Exo9) sastavljene od devet podjedinica, koje ulaze u interakciju s katalitičkim podjedinicama Dis3 i Rrp6. Obje katalitičke podjedinice RNA egzosoma uključene su u degradaciju RNA supstrata svojim 3'-5' ribonukleaznim aktivnostima, pri čemu imaju neke specifične i neke preklapajuće funkcije.

Ovim radom ispitana je uloga RNA egzosoma u omogućavanju ispravne glikozilacije proteina, koristeći kvasac *S. cerevisiae* kao modelni organizam. Stanice kvasca kojima nedostaje katalitička podjedinica RNA egzosoma Rrp6, njezin kofaktor Rrp47 ili egzoribonukleazna aktivnost katalitičke podjedinice Dis3 nisu vijabilne na povišenoj temperaturi zbog narušene stabilnosti stanične stijenke. Manozilacija proteina esencijalan je proces za održavanje stabilnosti stanične stijenke i vijabilnosti stanica te je ispitano može li prekomjerna ekspresija esencijalnog gena *PSA1*, koji kodira za GDP-manoza pirofosforilazu koja katalizira sintezu prekursora manozilacije GDP-manoze, suprimirati aberantan fenotip ovih mutanata. Pokazano je da se defekt u rastu i aberantna stanična morfologija mutanata *rrp6* i *rrp47* pri povišenoj temperaturi u potpunosti suprimira prekomjernom ekspresijom gena *PSA1*, dok je kod mutanta *dis3<sup>exo</sup>* fenotip suprimiran u znatno slabijoj mjeri. Budući da povećana dostupnost GDP-manoze suprimira temperaturnu-osjetljivost te defekte u staničnoj morfologiji ovih mutanata, proizlazi da je defekt u glikozilaciji proteina glavni razlog letalnosti stanica prilikom inaktivacije katalitičke podjedinice RNA egzosoma Rrp6 i njenog kofaktora Rrp47 pri povišenoj temperaturi. Analiza RNA-sekvenciranja indicira da je defekt u procesu glikozilacije proteina u stanicama mutanta *rrp6* najvjerojatnije posljedica smanjene razine ekspresije gena koji kodiraju za proteine uključene u rane korake manozilacije, poput *PSA1*, *DPM1* i *ALG7*.

Ključne riječi: kvasac *Saccharomyces cerevisiae* / glikozilacija proteina / gen *PSA1* / RNA egzosom / stanična stijenka

## SUMMARY

Lucija Štrbac, Marina Oskomić

### Influence of RNA exosome on protein mannosylation and cell viability of yeast

#### *Saccharomyces cerevisiae*

RNA exosome is an evolutionary conserved multi-protein complex involved in quality control, processing and degradation of a variety of RNA molecules. In yeast *Saccharomyces cerevisiae*, RNA exosome features a structural core (Exo9) composed of nine subunits, which are associated with catalytic subunits Dis3 and Rrp6. Both catalytic subunits are involved in RNA degradation through their 3'-5' ribonuclease activities, however they have both shared and distinct roles in RNA metabolism.

This work examined the role of RNA exosome in enabling proper protein glycosylation, using yeast *S. cerevisiae* as a model organism. Yeast cells lacking RNA exosome catalytic subunits Rrp6, its cofactor Rrp47 or exonuclease activity of catalytic subunit Dis3 are not viable at high temperature due to a compromised cell wall stability. Since protein mannosylation is essential for maintaining cell wall stability and cell viability, in this work we examined whether overexpression of the essential gene *PSA1*, encoding GDP-mannose pyrophosphorylase which catalyzes synthesis of the mannosylation precursor GDP-mannose, can suppress aberrant phenotype of these cells. We show that growth defect and aberrant cell morphology of *rrp6* and *rrp47* mutants at high temperature are fully suppressed by *PSA1* overexpression, while *dis3<sup>exo</sup>* mutant displays a very minor effect. Increased availability of GDP-mannose suppressed temperature sensitivity and aberrant cell morphology of these mutants, indicating that a defect in protein glycosylation is the main reason for cell lethality upon inactivation of RNA exosome catalytic subunit Rrp6 and its cofactor Rrp47 at high temperature. RNA-sequencing analysis indicates that the defect in protein glycosylation in *rrp6* mutant cells is most probably due to downregulation of genes encoding proteins involved in the early steps of the protein mannosylation pathway, such as *PSA1*, *DPM1* and *ALG7*.

Key words: yeast *Saccharomyces cerevisiae* / protein glycosylation / *PSA1* gene / RNA exosome / cell wall