

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena J. Malešević

**Identifikovanje i karakterizacija ćelijskih
faktora uključenih u proces obnavljanja
populacije ćelija *Ustilago maydis* nakon
oksidativnog stresa**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena J. Malešević

**Identification and characterization of cells
factors involved in regeneration of the
Ustilago maydis population after oxidative
stress**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Mentori:

dr Mira Milisavljević, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Svetlana Radović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Branko Jovčić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Đorđe Fira, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Milorad Kojić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Ova doktorska disertacija je realizovana u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, pod rukovodstvom dr Jelene Samardžić.

Zahvaljujem se svima koji su doprineli izradi ove doktorske disertacije:

Mentoru dr Miri Milisavljević na korisnim savetima i sugestijama, na stečenom znanju i iskustvu, kao i beskrajnoj pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Mentoru dr Svetlani Radović na velikoj podršci, sugestijama i savetima koji su doprineli realizaciji ove doktorske disertacije.

Dr Miloradu Kojiću na savetima i poverenju, ogromnom znanju, na neiscrpnim idejama i uvek entuzijastičnom pristupu svakoj problematici.

Dr Đorđu Firi i dr Branku Jovčiću na kritičkom čitanju rukopisa i doprinosu u realizaciji ove doktorske disertacije.

Dr Jeleni Samardžić na uvek prijateljskim savetima, podršci i što mi je omogućila da svoja prva istraživačka iskustva steknem u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka.

Svim članovima lab 08, bivšim i sadašnjim, dr Vesni Maksimović, dr Bojani Banović-Đeri, dr Gordani Timotijević, dr Dragani Nikolić, dr Dragani Bosnić na svesrdnoj pomoći i podršci prilikom izrade ove teze.

Omladini lab08, budućim doktorima Ivani, Sofiji, Stefanu, Ani, Nataliji i Ivanu na prijateljstvu, dobroj atmosferi i lepom druženju, a posebno koleginici iz laminara Mariji Vukčević na druženju i pomoći u eksperimentalnom radu.

Hvala svim kolegama sa Instituta na druženju, savetima i iskustvu koje su mi preneli.

I na kraju, beskrajno hvala na razumevanju, strpljenju i ogromnoj podršci prijateljima i mojoj porodici, suprugu Nikoli, bratu Slavku i mojim roditeljima kojima posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

Identifikovanje i karakterizacija ćelijskih faktora uključenih u proces obnavljanja populacije ćelija *Ustilago maydis* nakon oksidativnog stresa

Sažetak:

Ustilago maydis je patogena gljiva kukuruza, otporna na ekstremne doze UV i jonizujućeg zračenja. U prirodi *U. maydis* prolazi kroz dva životna stadijuma, tokom kojih je izložen različitim vrstama stresa. Studije su pokazale da DNK reparacija ima veliki doprinos u oporavku populacije nakon snažnog stresa. Međutim, razumevanje molekularne osnove ekološkog uspeha *U. maydis* je ostalo nepotpuno. Cilj ovog istraživanja je bilo pružanje jasnijeg uvida u mehanizme koji omogućavaju opstanak populacije ustilaga u nepovoljnim uslovima. Kao metodološki pristup za istraživanje oporavka od snažnog oksidativnog stresa, primenjen je LH test (Liquid Holding)-praćenje vijabilnosti tretiranih ćelija tokom inkubacije u vodi. Rezultati su pokazali da *U. maydis* ima visok stepen opravka populacije i da se ova obnova ostvaruje multiplikacijom preživelih ćelija zahvaljujući njihovoj sposobnosti da preuzmu i recikliraju produkte degradacije umrlih ćelija. Identifikovano je i okarakterisano 10 ćelijskih faktora (Adr1, Did4, Kel1, Tbp1, Snf8, Slm1, Chk1, Gmt, Snf5, Hsf1) uključenih u proces, putem izolovanja mutanata koji su izgubili sposobnost obnove vijabilnosti populacije (RUS). Poznate su uloge identifikovanih ćelijskih faktora u različitim ćelijskim procesima, a ovo je istraživanje pokazalo da su neki od RUS-faktora uključeni u održavanje integriteta genoma. Takođe je pokazano i da je ustilago metabolički aktivan u vodi i da nakon pada brojnosti populacije usled autogenerisane hipoksije, koristeći RUS, uspeva da obnovi populaciju i u normoksičnim i u hipoksičnim uslovima. Sumirano, RUS bi mogao da predstavlja adaptaciju koja povećava fitness *U. maydis* u nepovoljnim uslovima, putem repopulacije nakon delovanja različitih stresogenih faktora.

Ključne reči: repopulacija nakon gladovanja, oksidativni stres, vijabilnost, DNK reparacija, *Ustilago maydis*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Identification and characterization of cells factors involved in regeneration of the *Ustilago maydis* population after oxidative stress

Abstract:

Ustilago maydis is a pathogenic corn fungus, resistant to extreme doses of UV and ionizing radiation. In nature, *U. maydis* passes through two life stages, during which it is exposed to different types of stresses. Studies have shown that DNA reparation makes a major contribution to the recovery of the population after severe stress. However, understanding the molecular basis of environmental success of *U. maydis* remained incomplete. The aim of this research was to provide a clear insight into the mechanisms that enable survival of *U. maydis* population in unfavorable conditions. As methodological approach for investigation of recovery from strong oxidative stress, LH assay (Liquid Holding)- monitoring of viability of treated cells during incubation in water, was applied. The results showed that *U. maydis* had a high degree of population recovery, and that this renewal was accomplished by multiplication of the surviving cells at the expense of the released biomolecules from dead cells. Ten cellular factors (Adr1, Did4, Kel1, Tbp1, Snf8, Slm1, Chk1, Gmt, Snf5, Hsf1) involved in the process were identified and characterized, by isolating mutants that lost the ability to restore population viability (RUS). The roles in various cellular processes of the identified factors have been already known, and this research showed that some of the RUS factors were involved in maintainance of genome integrity. It was also shown that *U. maydis* was metabolically active in water and that after population decline due to autogenerated hypoxia, it managed to reconstitute the population in both normoxic and hypoxic conditions, employing RUS. In summary, RUS could be an adaptation that increases fitness of *U. maydis* in adverse conditions, by repopulation after exposure to various stressors.

Keywords: repopulation under starvation, oxidative stress, viability, DNA repair, *Ustilago maydis*

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular Biology of eukaryotes

Sadržaj:

1	UVOD	1
1.1	Strategije preživljavanja mikroorganizama	1
1.1.1	Formiranje biofilma	2
1.1.2	Morfološke promene ćelije	2
1.1.3	Sporulacija i formiranje cisti	2
1.1.4	Stečena otpornost na stres	3
1.1.5	„Bet-hedging”	4
1.1.6	Programirana ćelijska smrt	4
1.2	Ćelijski odgovor na stres	5
1.3	Abiotički stres	6
1.3.1	Oksidativni stres	6
1.3.1.1	Produkcija reaktivnih vrsta kiseonika tokom respiracije	6
1.3.1.2	Posledice aktivnosti oksidativnog stresa	7
1.3.1.3	Mehanizmi zaštite od oksidativnog stresa	8
1.3.2	Gladovanje - nutritivni stres	9
1.3.2.1	Kriptični rast	9
1.3.2.2	Dormantne spore i oligotrofan rast	10
1.3.2.3	Dugoročno preživljavanje	10
1.3.2.4	„Liquid Holding”	11
1.4	<i>U. maydis</i> kao eksperimentalni model sistem za izučavanje mehanizama ćelijskog odgovora na oksidativni stres	12
1.4.1	Životni ciklus <i>U. maydis</i>	13
1.4.2	<i>U. maydis</i> kao model sistem	13
1.4.3	Genom <i>U. maydis</i>	14
2	CILJEVI	16
3	MATERIJAL I METODE	17
3.1	Osnovne procedure rada sa DNK	17
3.1.1	Izolovanje genomske DNK iz kulture ćelija <i>U. maydis</i>	17
3.1.2	Izolovanje plazmida iz bakterija	17
3.1.3	Elektroforeza DNK na gelu od agaroze	18
3.1.4	Prečišćavanje fragmenata DNK iz agaroznog gela	18
3.1.5	Digestija DNK restrikcionim enzimima	18
3.1.6	Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima	18
3.1.7	Sekvenciranje DNK i analiza transkriptoma	19
3.1.8	Bioinformatička analiza sekvenci	19
3.1.9	Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR)	19
3.2	Osnovne procedure rada sa RNK	21

3.2.1	Izolovanje ukupne RNK iz <i>U. maydis</i> i DNazni tretman	21
3.2.2	Elektroforeza RNK na gelu od agaroze	21
3.2.3	Sinteza cDNK.....	22
3.3	Rad sa bakterijama	22
3.3.1	Bakterijski sojevi, vektori i medijumi.....	22
3.3.2	Gajenje i održavanje bakterija.....	22
3.3.3	Priprema kompetentnih bakterija za transformaciju toplotnim šokom	22
3.3.4	Transformacija <i>E. coli</i> toplotnim šokom.....	23
3.3.5	Priprema elektrokompetentnih ćelija <i>E.coli</i> za elektroporaciju	23
3.3.6	Transformacija <i>E.coli</i> elektroporacijom.....	23
3.4	Rad sa <i>U. maydis</i>	24
3.4.1	Sojevi <i>U. maydis</i> , vektori i medijumi, opšta strategija	24
3.4.2	Gajenje i održavanje <i>U. maydis</i>	24
3.4.3	Priprema početne suspenzije ćelija za tretman	24
3.4.4	Semikvantitativno određivanje senzitivnosti/ preživljavanja.....	25
3.4.5	Tretman ćelija <i>U. maydis</i> vodonik-peroksidom.....	25
3.4.6	Ispitivanje sposobnosti oporavka <i>U. maydis</i> ćelija u uslovima gladovanja nakon stresa... 25	
3.4.7	Ispitivanje mehanizma porasta brojnosti vijabilnih ćelija u uslovima gladovanja nakon izlaganja oksidativnom stresu	26
3.4.8	Ispitivanje ćelijske proliferacije u uslovima gladovanja.....	26
3.4.8.1	Ispitivanje kinetike oslobađanja unutarćelijskog materijala iz ćelija oštećenih oksidacijom.....	26
3.4.8.2	Ispitivanje zavisnosti repopulacije od dostupnih biomolekula	26
3.4.8.3	Ispitivanje efekta supstrata oslobođenog iz ćelija tretiranih peroksidom na proliferaciju svežih ćelija.....	26
3.4.8.4	Ispitivanje uticaja odnosa tretiranih i netretiranih ćelija na efikasnost ćelijske reprodukcije	27
3.4.9	Analiza preživljavanja u vodi	27
3.4.10	UV mutagenesa divljih sojeva UCM520 i UIMG10 i izolovanje mutanata skriningom na gubitak sposobnosti rasta u uslovima gladovanja.....	27
3.4.11	Određivanje stope rasta	28
3.5	Identifikovanje mutiranih gena	28
3.5.1	Identifikovanje gena komplementacionim kloniranjem:	28
3.5.2	Pravljenje protoplasta <i>U. maydis</i>	29
3.5.3	Transformacija <i>U. maydis</i>	29
3.6	Analiza ROS-a kod ćelija <i>U. maydis</i> inkubiranih u vodi.....	29
3.7	Bojenje ćelija <i>U. maydis</i> propidijum-jodidom	29
3.8	Priprema kultura <i>U. maydis</i> za izolaciju RNK.....	30
4	REZULTATI	31
4.1	Ispitivanje oporavka populacije ćelija <i>U. maydis</i> u uslovima gladovanja nakon tretmana vodonik-peroksidom i UV-zračenjem	31

4.2	Mehanizam porasta brojnosti vijabilnih ćelija u uslovima gladovanja nakon izlaganja oksidativnom stresu	32
4.3	Ispitivanje ćelijske proliferacije u uslovima gladovanja	33
4.3.1	Ispitivanje kinetike oslobađanja unutarćelijskog materijala iz ćelija oštećenih oksidacijom 33	
4.3.2	Ispitivanje sposobnosti ćelija da koriste biomolekule oslobođene iz umrlih ćelija (sposobnosti proliferacije).....	34
4.3.3	Ispitivanje efekta supstrata oslobođenog iz ćelija tretiranih vodonik-peroksidom na proliferaciju svežih ćelija	35
4.3.4	Ispitivanje uticaja odnosa tretiranih i netretiranih ćelija na efikasnost ćelijske reprodukcije 37	
4.4	Gubitak vijabilnosti u populaciji ćelija <i>U. maydis</i> zavisano od gustine.....	37
4.5	Metabolička aktivnost ćelija <i>U. maydis</i> tokom inkubacije u vodi	39
4.6	Vremenska kinetika preživljavanja ćelija <i>U. maydis</i> inkubiranih u vodi u uslovima ograničene količine kiseonika	40
4.7	Produkcija ROS-ova autogenerisanom hipoksijom	42
4.8	Izolovanje RUS mutanata	43
4.9	Karakterizacija mutanata.....	44
4.10	Senzitivnost mir mutanata na genotoksične agense.....	49
4.11	Identifikacija inaktiviranih gena u mir mutantima	50
4.12	Analiza transkriptoma	56
5	DISKUSIJA	60
5.1	Uloga LH-a u obnavljanju populacije.....	60
5.2	Uloga identifikovanih ćelijskih faktora u RUS-u	61
5.3	Analiza transkriptoma	65
5.4	Autodegradacija i ćelijsko umiranje	65
5.5	Hipoksija	67
5.6	Eko-evoluciono značaj RUS-a.....	68
6	ZAKLJUČCI	70
7	LITERATURA	71

Biografija autora

Izjava o autorstvu

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Izjava o korišćenju

1 UVOD

Od najpovoljnijih do najsirovijih, gotovo svaki prostor na Zemlji je potencijalno stanište za određene vrste organizama. Prirodna tendencija za efikasnijom upotrebom životnih resursa vodi osvajanju novih životnih prostora, u kojima vladaju različiti ekološki uslovi kojima organizmi moraju da se adekvatno prilagode kako bi preživeli i uspešno proširili svoje populacije. Takođe, ekološki faktori životne sredine mogu varirati i u okviru jednog te istog staništa. Ako intenzitet ovih promena dovede do drastičnog odstupanja od optimalnih vrednosti za datu organsku vrstu, delovanje novonastalih sredinskih uslova postaje nepovoljno, a štetnost nepovoljnih sredinskih faktora se može ispoljiti preko narušavanja unutarćelijske homeostaze, fiziologije i integriteta genoma. Stoga je za opstanak živih bića ključna njihova sposobnost da se prilagode promenljivim uslovima životne sredine. Tako jedan organizam može imati veći broj različitih adaptacija determinisanih genomom, koje se u specifičnim ekološkim uslovima mogu ispoljiti na fiziološkom, morfološkom i/ili ponašajnom nivou. Koliko je veliki potencijal živih bića za pronalaženje adaptivnih rešenja svedoči sva raznolikost živih vrsta koje uspešno preživljavaju i dugoročno kolonizuju najrazličitija ekološka staništa na planeti Zemlji.

1.1 Strategije preživljavanja mikroorganizama

Iako se sva živa bića suočavaju i bore sa promenljivim i često nepovoljnim uslovima staništa, čini se da je za jednoćelijske, slobodnoživeće mikroorganizme ovo poseban izazov. Jedan od razloga je činjenica da mikroorganizmi najčešće nemaju sposobnost aktivne migracije na veće distance, jednu od ključnih osobina živih bića koja bi im obezbedila beg od nepovoljnih, ponekad i katastrofalnih ekoloških promena. S druge strane, mikroorganizmi se karakterišu vrlo malim dimenzijama (oko 1 mikrometra), odnosno velikom površinom koja je u direktnom kontaktu sa spoljnom sredinom.

Promenljive sredinske faktore sa kojima se mikroorganizmi suočavaju, čine biotički i abiotički faktori. Najčešći abiotički faktori su temperaturna variranja, suša, salinitet, osmolarnost, UV zračenje, promene u količini i tipu dostupnih nutrijenata, metaboliti, antimikrobna jedinjenja, dok interakcije sa okolnim živim svetom predstavljaju biotičke faktore (npr. infekcija bakteriofagima). Ukoliko ovi različiti faktori svojim oscilacijama kod mikroorganizama izazovu fiziološke promene koje prete da naruše preživljavanje i reprodukciju, tada za organizam nastupa stres. Mikroorganizmi mogu da prežive vrlo nepovoljne uslove, o čemu svedoči njihova široka rasprostranjenost u veoma različitim tipovima staništa. Primeri su organizmi koji preživljavaju ekstremne abiotičke uslove, kao i patogeni, koji preživljavaju u unutrašnjosti drugog organizma, uprkos potencijalnom riziku od anoksije i imunskog sistema domaćina.

Pripremljenost na potencijalne sredinske promene je neophodna kako bi preživeli i ostali aktivni [1]. Ono što je ključno za dobru adaptaciju bakterija i gljiva na nove, izmenjene uslove sredine, jesu molekularni senzori koji brzo detektuju promene u spoljnoj sredini i pokreću unutarćelijske signalne mreže koje obezbeđuju brzu regulaciju puteva odgovora na osmotski, toplotni, oksidativni i nutritivni stres [1-3]. Odgovor mikroorganizama na stres uključuje i ekonomičnije korišćenje energetskih resursa, odnosno preusmeravanje ćelijskog metabolizma sa rasta na produkciju zaštitnih jedinjenja. Ipak, dramatične promene u sredinskim uslovima mogu redukovati rast mikroorganizama, usmeriti njihove populacije ka dormanciji, a u ekstremnim slučajevima dovesti i do masovnog umiranja [4].

U uslovima stresa mikroorganizmi koriste brojne fiziološke mehanizme i eko-evolucionu strategiju koje obuhvataju specifičnu odbranu i mehanizme popravke makromolekula (npr. reparacija UV-indukovanih lezija na DNK), akumulaciju određenih molekula, sintezu specifičnih enzima,

antibiotika, formiranje biofilмова, cisti, spora, kao i prajming, unakrsnu zaštitu, „bet-hedging” strategije, programiranu ćelijsku smrt i druge.

1.1.1 Formiranje biofilma

Biofilm predstavlja zajednicu mikroorganizama (bakterija, gljiva ili protista) površinski povezanih tako da formiraju zaštitni vanćelijski matriks, na različitim abiotičkim i biotičkim površinama. Ovaj zaštitni matriks se sastoji iz proteina, egzopolisaharida i vanćelijske DNK koji su proizvod samih članova zajednice. Mikroorganizmi biofilma imaju višestruku korist od drugih članova zajednice, a efikasna međućelijska komunikacija tzv. „quorum sensing” je njegova ključna strategija. Zajednicu biofilma obično čine fenotipski različite subpopulacije koje se formiraju putem regulacije genske ekspresije, u zavisnosti od mikrouslava (gradijent nutrijenata, kiseonika) kojima su ćelije izložene u biofilmu. Takođe, unutar biofilma ćelije su prostorno ograničene, što se odražava na brzinu rasta (slično stacionarnoj fazi rasta) [5, 6].

Glavne prednosti biofilma su veća otpornost na stres, kao što su nedostatak vode, nutrijenata, niska ili visoka pH vrednost. Takođe, biofilm služi kao zaštitna barijera od UV zračenja i antimikrobnih agenasa. Koncentracija štetnog agensa se smanjuje difundujući kroz biofilm, tako da ćelije dubljih slojeva biofilma dolaze u kontakt sa neletalnim dozama agensa. Kako bi se dodatno sprečila mogućnost prolaska letalnih koncentracija antibiotika, bakterije biofilma primenjuju još jedan zaštitni mehanizam, a to je ulazak u stanje **fiziološke dormantnosti**. Naime, vanćelijski matriks biofilma funkcioniše kao difuzna barijera za male molekule, tako da je difuzija nutrijenata, vitamina ili kofaktora usporena i posledično, neke od ćelija ove zajednice su neaktivne, dormantne. Kako je za dejstvo većine antibiotika neophodna metabolička aktivnosti ćelije, dormantne bakterije su u ovom slučaju bezbedne [7-9].

1.1.2 Morfološke promene ćelije

Jedna od čestih strategija gljiva u borbi sa biotičkim i abiotičkim stresom su promene morfologije. Za patogene gljive je karakteristično da imaju više različitih morfotipova koji ostvaruju različite uloge u interakciji sa domaćinom, obezbeđujući na taj način optimalni fitness patogena. Tako su hife morfološki najpogodnije za prolaženje fizičkih barijera, kolonizaciju tkiva domaćina i savladavanje nepovoljnih uslova koji nastaju delovanjem odbrambenih mehanizama domaćina. S druge strane, morfološki tip koji nalikuje ćeliji kvasca (engl. „yeast-like” cells) je pogodniji za disperziju među domaćinima i uvećanje populacije patogena. Gljive koje svoj životni ciklus ostvaruju putem tranzicije između ova dva morfotipa se označavaju kao dimorfne. Dimorfne gljive su uglavnom saprotrofne plesni koje žive na mrtvoj organskoj materiji, koje takođe mogu inficirati čoveka, ili su pak biljni patogeni [10]. Kako je većina patogenih gljiva koje inficiraju čoveka, u prirodi saprofitna, smatra se da su ovi mikrobi, pod selektivnim pritiskom sredine, razvili sposobnost inficiranja i preživljavanja unutar domaćina [11]. Istraživanja su pokazala da je promena veličine i oblika ćelije regulisana istim signalnim putevima koji su zaduženi za odgovor na sredinske promene. Tako npr. visoka telesna temperatura predstavlja prepreku mnogim patogenima za infekciju sisara, ali istovremeno predstavlja signal za prelazak iz saprofitske filamentozne forme u formu kvasca. Stoga se smatra da su morfološke promene adaptivna osobina koja je omogućila patogenima da inficiraju domaćina i prilagode se nepovoljnim sredinskim uslovima [11, 12].

1.1.3 Sporulacija i formiranje cisti

Brojni organizmi, od bakterija i protozoa do bljaka i gljiva, koriste sporulaciju kao strategiju za preživljavanje nepovoljnih i pronalaženje novih, boljih uslova za život. Zajedničke karakteristike spora su redukovani metabolizam, otpornost na stres (izuzetno visoke ili niske temperature, UV zračenje, desikaciju, pesticide i antibiotike) i spremnost za klijanje (germinaciju) kada se uspostave

povoljni uslovi. Sposobnost formiranja spora na različite načine povećava verovatnoću preživljavanja mikroorganizama. S jedne strane, patogeni mikroorganizmi u formi spora mogu lako da se zaštite od nepovoljnih spoljnih uslova i nastave svoj životni ciklus tako što inficiraju domaćina. Jedan od primera su spore *Cryptococcus*-a, koje su dijametra 1-2 μm i mogu lako da prođu kroz respiratorni trakt gde ih preuzimaju makrofagi pluća. U samim makrofagima, spore klijaju u inkapsulirani kvasac koji uspešno savladava imunski sistem domaćina. [11, 13].

Protisti i Gram-negativne bakterije (razdeo Actinobacteria) u nepovoljnim uslovima formiraju ciste ili egzospore [14]. Visoka temperatura, nedostatak kiseonika, vlage i nutrijenata pokreću unutarćelijske signalne puteve koji dovode do reorganizacije citoskeleta i formiranja višeslojnog zida ciste. Usled jednostavnije građe zida, ciste su manje otporne od endospora. Formiranje cisti je posebno značajna strategija kod parazita iz carstva Protista, koji su tokom različitih stadijuma životnog ciklusa izloženi veoma nepovoljnim uslovima. Tako intestinalni parazit čoveka *Entamoeba histolyca*, preživljava visoko kisele uslove digestivnog trakta pre nego što dospe do creva. Van domaćina, ove ciste preživljavaju svega nekoliko meseci u takođe nepovoljnim i nepredvidim uslovima desikacije i nedostatka nutrijenata [14, 15].

1.1.4 Stečena otpornost na stres

U prirodnom okruženju organizmi se uglavnom suočavaju sa više vrsta stresogenih faktora istovremeno, ili se oni sukcesivno smenjuju različitim intenzitetom, zbog čega je pripremljenost na iznenadni stres ključna za preživljavanje. Analogno adaptivnom imunitetu životinja i odbrambenom mehanizmu biljaka, mikroorganizmi su razvili tzv. stečenu otpornost na stres (engl. „Acquired Stress Resistance”, ASR), ili prajming, koja obezbeđuje bolji odgovor ćelije pri ponovnom susretu sa istim tipom stresa. ASR se definiše kao otpornost na jak stres koja se stiče prethodnim izlaganjem ćelija blažem stresu istog tipa [16]. Ova strategija se zasniva na postojanju memorije o ćelijskom stanju i ponašanju ćelije pri prethodnom izlaganju stresu. Mehanizmi prajminga se razlikuju kako između različitih taksona, tako i na nivou jedinke. Kod kvasca je pokazano da prajming za tolerantnost na isti tip stresa, npr. izlaganje vodonik-peroksidu, pokreće ekspresiju različitog seta gena u zavisnosti od prajming stimulusa [17]. Istraživanja su pokazala da prajming zahteva regulaciju na epigenetičkom nivou (DNK metilacije, modifikacije histona), transkripcionom, post-transkripcionom, translacionom, post-translacionom. Svi ovi nivoi regulacije zajedno obezbeđuju odgovor na izmenjene sredinske uslove i uspostavljanje ćelijske memorije [18].

Iz ugla efektivnosti, mogu se razlikovati mehanizmi prajminga koji obezbeđuju raniji, brži ili snažniji odgovor na novi sredinski stres. Na primer, postizanje ranijeg odgovora na novi stres, ostvaruje se zahvaljujući ranijem startovanju transkripcije i translacije proteina koji su uključeni u odgovor na stres. U zavisnosti od specifičnosti sredinskih uslova, prajming može da podrazumeva sintezu različitih zaštitnih molekula, kao što su trehaloza, manitol, kao i indukciju proteina toplotnog šoka (engl. „Heat-shock protein”, Hsp), i povećanje aktivnosti određenih signalnih puteva u cilju pripreme ćelije za budući stres [2, 16].

Mehanizam sticanja otpornosti na isti tip stresa zavisi od aktivacije specifičnog odbrambenog odgovora na dati stresogeni faktor. Tako, stečena otpornost na vodonik-peroksid zavisi od nivoa aktivnosti citoplazmatične katalaze, koja nakon izlaganja nižim dozama vodonik-peroksida postiže visoku koncentraciju i štiti ćelije kvasca pri narednom izlaganju većim dozama istog agensa [18].

Pored stečenog imuniteta na isti tip stresa (prajming ili ASR) postoji i unakrsna zaštita (engl. „cross-protection”) koja obezbeđuje otpornost na novi stres različite prirode. Istraživanja su pokazala da inkubacija ćelija u prisustvu alkohola, slabije kiseline ili vodonik-peroksida dovodi do sticanja povećane tolerantnosti na toplotni stres. S druge strane, izlaganje toplotnom stresu slabijeg intenziteta indukuje otpornost na povišen salinitet, niske pH vrednosti (kiselost) sredine, oksidativni

stres i potencijalno letalne doze antibiotika bleomicina [18, 19]. Ova vrsta imuniteta je efekat aktivacije generalnog i specifičnog odgovora na prethodni blaži stres.

1.1.5 „Bet-hedging”

U promenljivim i nepredvidim uslovima životne sredine, mnogi organizmi problem uspostavljanja optimalnog fitnesa rešavaju nekom od „bet-hedging” strategija. Ideja u osnovi „bet-hedging” strategija, jeste da jedinke smanjuju svoj fitnes u povoljnim (trenutnim) uslovima sredine na račun većeg fitnesa u nepovoljnim uslovima, kako bi dugoročno ostvarile bolje preživljavanje. Prema ovoj standardnoj, konzervativnoj „bet-hedging“ teoriji, smanjenje fitnesa u zamenu za manju varijansu fitnesa predstavlja niskorizičnu strategiju. Na primer, ukoliko bi se jedinke specijalizovale za sušne uslove sredine, njihov fitnes bi bio daleko viši u sušnoj godini, za razliku od kišne godine kada bi populacija doživela pad. U ovom slučaju postojalo bi veliko variranje fitnesa tokom godina. Sa druge strane, generalisti, koji održavaju srednji fitnes nezavisno od spoljnih uslova, na duže staze ostavruju veći uspeh. Alternativna, diverzifikaciona „bet-hedging“ strategija podrazumeva da organizmi investiraju u nekoliko različitih strategija istovremeno, i na taj način dugoročno smanjuju varijansu fitnesa [20, 21].

Kanonični primer „bet-hedging“ strategije je generisanje **perzistentnih ćelija** bakterija, gljiva, kvasaca i ćelija kancera. Perzistentne ćelije predstavljaju subpopulaciju ćelija, koje zahvaljujući sposobnosti ulaska u stanje mirovanja, postaju tolerantne na antimikrobni tretman ili na terapiju za kancer. Ova osobina je otkrivena kada je, nakon izlaganja antibiotiku, uočeno da jedan mali udeo bakterijske populacije preživljava tretman, i po ukklanjanju antibiotika nastavlja rast u novu populaciju koja je senzitivna na antibiotik. Dakle, tolerantnost perzistentnih ćelija je za razliku od antimikrobne rezistentnosti reverzibilna i nije genetski determinisana. Istraživanja su pokazala da perzistentne bakterije u odsustvu antimikrobnog agensa imaju sporiji rast u odnosu na ostatak populacije. Smatra se da je sposobnost prelaska u stanje perzistentnosti odlika ćelija stacionarne faze, ali i da postoje ćelije koje spontano ulaze u mirovanje. Smatra se da je pojava perzistentnih ćelija moguća upravo zahvaljujući postojanju reverzibilne fenotipske heterogenosti bakterijske populacije i da su perzistentne ćelije najverovatnije selektovane kako bi povećale verovatnoću preživljavanja u promenljivim uslovima sredine [22, 23].

Formiranje dormantnih spora je primer diverzifikacione „bet-hedging“ strategije. Dormantne spore omogućavaju bakterijama da prežive dug period gladovanja i brzo odgovore na priliv svežih nutrijenata. Kako je sporulacija vremenski i energetski skup proces, posebno imajući u vidu da je ireverzibilan, samo mali broj ćelija će biti podvrgnut dormanciji, kako bi se obezbedio oporavak populacije kada uslovi života postanu povoljni [24].

1.1.6 Programirana ćelijska smrt

Kao važna i široko rasprostranjena životna strategija izdvaja se programirana ćelijska smrt (engl. „Programmed Cell Death”, PCD). PCD se indukuje pod različitim tipovima stresa, kako što su toplotni stres, UV zračenje, nedostatak nutrijenata, virusne infekcije ili oksidativni stres [25]. Osnovna obeležja PCD, kao što su fragmentacija DNK i eksternalizacija fosfatidil-serina su uočena i kod jednoćelijskih organizama, pa se smatra da je se PCD javila rano tokom evolucije. PCD je aktivan, interno (genetički) regulisan i energetski zahtevan proces ćelijskog suicida, koji je ključan za pravilno razviće, homeostazu i integritet višćelijskih organizama. Za razliku od višćelijskih organizama, gde PCD jedne ćelije donosi očiglednu dobrobit čitavom organizmu, aktiviranje PCD od strane jednoćelijskih organizama je dugo predstavljalo enigmnu sa evolucione tačke gledišta. U svetu jednoćelijskih organizama, umiranjem jedne ćelije nastupa smrt čitavog organizma, te se na taj način isključuje mogućnost delovanja prirodne selekcije na bilo koju osobinu, uključujući i PCD [26].

Istraživanje starenja u kulturi jednoćelijskog organizma, *S. cerevisiae* je pokazalo da umiranje putem PCD utiče na fitness okolnih ćelija. Herker i saradnici, 2004 su pokazali da umiranje starih ćelija specifično putem PCD dovodi do oslobađanja supstanci koje poboljšavaju preživljavanje ostalih starih ćelija u kulturi, ali ne i ćelija u eksponencijalnoj fazi rasta [27].

Grupa saradnika koja se bavila ispitivanjem PCD kod zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii*, pokušala je da odgovori na pitanje selektivnog pritiska koji je doveo do pojave i održavanja PCD u pre-PCD svetu. Ova studija je pokazala da supstrat oslobođen iz ćelija umrlih putem PCD utiče povoljno na ćelijski rast *C. reinhardtii*, nezavisno od starosti ćelijske kulture, dok supstrat ćelija umrlih nekrozom ima štetne efekte na ćelije u kulturi. Rezultati su pokazali da od tipa ćelijske smrti zavisi kvalitet supstrata koji se oslobađa u okolnu sredinu, što dalje doprinosi povećanju ili smanjenju fitnessa okolnih ćelija u populaciji. Kako se *C. reinhardtii* smatra jednoćelijskim pretkom kompleksnije volvocine grupe zelenih algi, PCD bi mogla biti ključna za nastanak jednostavnih „socijalnih“ ćelijskih grupacija i prelazak na višećelijski oblik života. Pretpostavlja se da je pojava PCD kao alternativne forme smrti, koja povećava preživljavanje jedinki u populaciji, predstavljala selektivnu prednost. Novija istraživanja na ovoj algi su pokazala da je pozitivan efekat produkata PCD na fitness netretiranih ćelija specifičan za vrstu, [28] što potvrđuje genetičku determinisanost samog procesa.

Novija istraživanja pokazuju da se u okviru bakterijskih zajednica može indukovati smrt jednog dela populacije u odgovoru na različite tipove stresa, uključujući oksidativni stres, zračenje, nedostatak nutrijenata, infekcije bakteriofagom i druge. Imajući u vidu da mikroorganizmi formiraju zajednice, kao što su kolonije, biofilm i agregati u okviru kojih ostvaruju veći fitness, ovakve populacije mikroorganizama bi se mogle posmatrati kao višećelijski organizam. U ovom svetlu, sama pojava PCD kod jednoćelijskih organizama navodi na zaključak da su i mikroorganizmi socijalni organizmi i da ispoljavaju altruističko ponašanje zarad opstanka svoje populacije [29].

1.2 Ćelijski odgovor na stres

Biološki značaj odgovora ćelije na stres jeste zaštita od faktora koji potencijalno mogu da oštete njene makromolekule te tako naruše funkcionisanje ćelije, ali i priprema ćelije za buduće promene i nepovoljne uslove. U odgovoru na stres, metabolička aktivnost ćelije se menja u smeru usporavanja ili zaustavljanja ćelijske deobe, putem smanjene sinteze većine proteina koji funkcionišu u normalnim fiziološkim uslovima i povećane sinteze proteina koji su specifični za odgovor na stres. U grupu proteina specifičnih za odgovor na stres ubrajaju se proteini toplotnog šoka, brojni enzimi uključeni u redoks reakciju i antioksidativnu odbranu, DNK reparaciju, transport metabolita, modifikaciju ćelijskog zida, proces autofagije i drugi [30].

Hsp predstavlja familiju proteina koja se u ćeliji produkuje u odgovoru na različite tipove stresa. U Hsp familiju se ubrajaju šaperoni koji štite proteine od denaturacije i omogućavaju uspostavljanje native konformacije denaturisanim proteinima, dok proteaze toplotnog šoka (engl. „heat-shock proteases”) vrše proteolizu agregata denaturisanih proteina kao i nepravilno uvijenih proteina [18, 31]. Generalno, uloga proteina Hsp familije je u održavanju homeostaze proteina, kao glavnih funkcionalnih jedinica ćelije, kako bi se sprečilo narušavanje ključnih ćelijskih procesa i dalja oštećenja i smrt ćelija.

Kod mnogih fiologenetski udaljenih organizama uključujući i mikroorganizme, u stresnim uslovima se sintetiše trehaloza. Trehaloza je disaharid čija koncentracija u ćeliji strogo zavisi od sredinskih uslova. Kod kvasca, *S. cerevisiae* trehaloza se sintetiše u uslovima toplotnog, alkoholnog i oksidativnog šoka, dehidracije i tokom stacionarne faze rasta. Ovo jedinjenje ima ulogu u zaštiti bioloških membrana, uključujući stabilizaciju polarnih grupa fosfolipida, „scavenger” slobodnih

radikala, koji štite nesaturisane masne kiseline membrana od peroksidacije. Trehaloza takođe funkcioniše kao šaperon, tako što stabilizuje native i neuvijene proteine, štiteći ih od agregacije [18, 32].

Pored osnovne podele na abiotičke i biotičke, faktori stresa mogu da se podele na hemijske i fizičke, endogene i egzogene, prirodne i veštačke, kao što su herbicidi, pesticidi i antimikrobijalne supstance, a razlikuju se i prema intenzitetu. Blaži stres podrazumeva subletalne doze stresa koje samo usporavaju rast ćelije, ne utičući na nivo preživljavanja. Kod kvasca stres većeg intenziteta pokreće odbrambene mehanizme i može privremeno da zaustavi ćelijski ciklus u G1 fazi. Kao posledica snažnog stresa nastaju oštećenja ćelijskih makromolekula, kao i strukturne i funkcionalne promene koje mogu da ubrzaju ćelijsko starenje, ili pak da pokrenu apoptozu ili nekrozu ćelije [18].

Razlikujemo generalni i specifični odgovor na stres. Specifični odgovor na stres je rezultat aktivacije specifičnih odbrambenih i mehanizama popravke u odgovoru na određeni tip stresa, čime se postiže otpornost na primenjeni stresogeni faktor. Tako se u odgovoru na toplotni stres posredstvom Hsf1 proteina (engl. „Heat-shock factor 1”) indukuje sinteza šaperona, a kako je aktivnost šaperona ATP-zavisna, aktiviraju se i geni neophodni za dobijanje energije. Kod kvasca se u odgovoru na oksidativni stres, posredstvom proteina Yap1p i Skn7p aktivira sinteza faktora koji vrše detoksifikaciju od vodonik-peroksida i superoksida [18].

Generalni odgovor na stres opisan kod *S. cerevisiae* je poznat kao ESR (engl. „Environmental Stress Response”). Ovaj program posredstvom transkripcionih faktora Msn2p i Msn4p i regulatornih elemenata STRE (engl. „STress Response Element”) integriše i koordiniše odgovor na različite tipove sredinskog stresa [2]. ESR inhibira ekspresiju čitavog seta gena zaduženih za ćelijski rast i aktivira ekspresiju gena čiji su produkti uključeni u proteolizu i popravku oštećenih proteina, zaštitu od oksidativnog stresa i održavanju metaboličke homeostaze ćelije [18, 30].

1.3 Abiotički stres

Abiotički stres, obuhvata sušu, visok salinitet, visoku i nisku temperaturu, oksidativni stres, toksičnost teških metala i druge faktore sredine koji negativno utiču na živi svet. U zavisnosti od staništa, neki organizmi se češće susreću sa određenim abiotičkim faktorima [33]. Za ovaj rad najznačajniji su oksidativni i nutritivni stres, o kojima će biti više reči.

1.3.1 Oksidativni stres

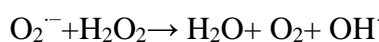
Za preživljavanje većine aerobnih organizama je neophodan kiseonik. Međutim, izlaganje različitim sredinskim faktorima, kao što su UV zračenje (UV-B), suša, salinitet, teški metali, zagađivači iz vazduha, ekstremne temperature, hipoksični uslovi, može indukovati značajnu proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika (engl. „Reactive Oxygen Species”, ROS) [34]. Akumulacija velike količine ROS-ova može uzrokovati oštećenja ćelijskih komponenti, preteći da naruši vijabilnost ćelije. Kako bi se zaštitili od ovih potencijalno toksičnih kiseoničnih vrsta, aerobni organizmi su razvili antioksidativne mehanizme koji precizno kontrolišu proizvodnju i uklanjanje ROS-ova. Međutim, u uslovima različitih vrsta jakog ili dugotrajnog sredinskog stresa, postoji mogućnost disbalansa u delovanju antioksidativnih i prooksidativnih mehanizama, što vodi akumulaciji ROS-ova u ćelijama, a tada nastupa oksidativni stres [35, 36].

1.3.1.1 Produkcija reaktivnih vrsta kiseonika tokom respiracije

Aerobnim organizmima je kiseonik neophodan za osnovne životne procese, respiraciju i proizvodnju energije. Ovi organizmi poseduju visoko efikasan mehanizam za dobijanje energije, tokom kog se vrši prenos elektrona na respiratornim lancu mitohondrija, pri čemu je molekularni

kiseonik njihov terminalni akceptor. Tokom transporta elektrona generiše se gradijent protona koji omogućava sintezu energije u vidu ATP-a. Međutim, nepotpunom redukcijom kiseonika, kao prirodni nusprodukt metabolizma, nastaju reaktivne vrste kiseonika koje u većoj količini mogu biti toksične za ćeliju. Među reaktivnim vrstama kiseonika posebno se izdvajaju superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksi radikal (OH^{\cdot}) i singletni kiseonik (1O_2) [37]. $O_2^{\cdot-}$ je relativno nereaktivan i selektivan radikal, ali može direktno da inaktivira određene proteine, kao što je katalaza. Efikasno uklanjanje superoksidnog anjona je naročito važno za ćeliju, s obzirom da ima tendenciju generisanja toksičnijih ROS-ova. H_2O_2 se kao i $O_2^{\cdot-}$ smatra slabije reaktivnim ROS-om, ali ima potencijal prelaska velikih distanci i prolaska kroz biološke membrane stvarajući tako oksidativna oštećenja daleko od mesta generisanja. Pokazano je i da H_2O_2 deluje i kao signalni molekul, tako što aktivira transkripciju gena koji regulišu ekspresiju gena antioksidativne zaštite [35, 38].

Uopšteno, biološki efekti od ROS-ova zasnivaju se na njihovoj visokoj reaktivnosti, zato što usled nesparenih elektrona teže da preuzmu elektrone od drugih jedinjenja čime se formiraju novi radikale i održavaju ciklus oksidacije. Tako npr. superoksidni anjon koji je primarni ROS, u Fentonovoj i Haber-Weiss-ovoj reakciji interaguje sa vodonik-peroksidom, pri čemu nastaju voda, kiseonik i hidroksi radikal:



Vodonik-peroksid se (katalizatori su joni gvožđa) razlaže na hidroksi anjon i hidroksi radikal:



U ovoj reakciji, fero jon Fe^{2+} se oksiduje do feri jona Fe^{3+} , ali se može ponovo redukovati od strane $O_2^{\cdot-}$ čime se nastavlja ciklus beskonačnog generisanja OH^{\cdot} . Hidroksi radikal je najpotentniji poznati biološki oksidant, koji neselektivno oskuduje ćelijske molekule: DNK, masne kiseline, ćelijske membrane i membrane mitohondrija. Molekuli oksidovani od strane OH^{\cdot} i sami postaju radikali i dalje propagiraju oksidativna oštećenja koja mogu biti osnov za ireverzibilna oštećenja ćelije. Generalno, OH^{\cdot} je uzrok najvećeg dela oštećenja u ćeliji, dok se efekat H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$ meri kapacitetom formiranja OH^{\cdot} [35, 37, 38].

1.3.1.2 Posledice aktivnosti oksidativnog stresa

Delovanjem ROS-ova u ćeliji dolazi do oksidacije lipida, proteina, nukleinskih kiselina, a posledice mogu biti mutacije, kancerogeneza, starenje i smrt ćelije.

Lipidi ćelijskih membrana su glavni target slobodnih radikala. U reakciji sa polinezasićenim masnim kiselinama, ROS dovode do stvaranja lipidnih peroksida i novih lipidnih radikala, čime se započinje proces **lipidne peroksidacije**. Krajnji produkt ovog procesa je mutageno jedinjenje, malonildialdehid (MDA). Lipidna peroksidacija dovodi do smanjene fluidnosti membrane, specifične propustljivosti za jone, aktivnosti membranskih enzima i receptora [35].

Oksidativna oštećenja proteina menjaju njihovu molekulsku masu, putem agregacije proteina ili njihove fragmentacije (raskidanjem peptidnih veza), promenama naelektrisanja i čine ih podložnijim proteolizi. Oksidacija proteina uglavnom dovodi do stvaranja karbonilnih derivata, pa se kao marker oksidativnog oštećenja proteina najčešće koristi karbonilnih grupa. Nastanak karbonilovanih proteina je ireverzibilan proces, stoga ovi derivati proteina dalje podležu proteolitičkoj degradaciji. Neefikasno uklanjanje karbonilovanih proteina dovodi do formiranja velikih proteinskih agregata i dalje akumulacije karbonilovanih proteina, što može da poremeti ćelijsku homeostazu i naruši vijabilnost ćelije [35, 37].

Oksidativna oštećenja DNK molekula obuhvataju modifikacije dezoksiriboze, baza, jednolančane i dvolančane prekide, unakrsno povezivanje lanaca, blokiranje replikacije DNK. Sve vrste ROS-ova mogu da interaguju sa bazama ili šećernom okosnicom DNK molekula i da uzrokuju oksidativna

oštećenja u DNK lancu. Ipak, za nastanak oštećenja na DNK molekulu je posebno važna reakcija generisanja hidroksi radikala (Fentonova reakcija), koji je najpotentniji radikal. Pokazano je da osim što može da reaguje sa svim komponentama DNK molekula, OH[•] ima kancerogeni potencijal putem indukovanja baznih promena u samim onkogenima i tumor supresorima. Nivo oksidativnog oštećenja DNK molekula može da se prati merenjem 8-hidroksiguanina (analog guanina), čija koncentracija raste tokom oksidativnog stresa [35, 39].

1.3.1.3 Mehanizmi zaštite od oksidativnog stresa

Osim što nastaju kao produkt normalnog metabolizma, reaktivne vrste kiseonika mogu se stvarati i pod uticajem raznih sredinskih faktora, zbog čega je održavanje nivoa ROS-ova u fiziološkim granicama ključno za život. Smatra se da aerobni organizmi mogu da prežive u prisustvu kiseonika upravo zahvaljujući postojanju specifičnih sistema odbrane, koje anaerobni organizmi ne poseduju. Odbrambeni sistemi aeroba obuhvataju različite mehanizme, koji su strogo regulisani [38].

Mehanizmi zaštite od oksidativnog stresa deluju na više nivoa:

1. smanjuju produkcije ROS-ova,
2. uklanjaju višak ROS-ova i
3. popravljaju oštećenja nastala dejstvom ROS-ova.

Mehanizmi koji sprečavaju produkciju ROS-ova deluju tako što eliminišu njegov prekursor, a to je kiseonik. Kod mikroorganizama je otkriveno nekoliko ovakvih mehanizma, a jedan od njih koristi enzim **desaturazu masnih kiselina**. U odgovoru na oksidativni stres, povećava se aktivnost ovog enzima, čime se troši kiseonik. Osim toga, desaturacijom masnih kiselina se smanjuje fluidnost membrane i sprečava se dalji ulazak kiseonika. Još jedan primer sistema za eliminaciju kiseonika je **NADH-oksidaza** koja postoji kod nekih laktobacila i troši kiseonik za oksidaciju NADH [37].

Mehanizmi za uklanjanje ROS se mogu podeliti na primarne i sekundarne mehanizme antioksidativne zaštite.

Primarnu odbranu čine antioksidativni enzimi:

Superoksid-dizmutaza (SOD) je enzim koji katalizuje redukciju superoksida do H₂O₂, čime sprečava stvaranje hidroksi radikala i nastavak ciklusa oksidacije. Kod eukariota su opisane dve forme SOD, mitohondrijalna SOD (MnSOD) i citosolna SOD (CuZnSOD) [37, 40].

Katalaza (CAT) je enzim koji se nalazi u peroksizomu i katalizuje rezgradnju (redukciju) H₂O₂ na vodu (H₂O) i kiseonik (O₂), štiteći tako ćeliju od štetnog dejstva peroksida, ali i od hidroksi radikala koji bi nastali u njegovoj reakciji sa superoksidima [37].

Glutation-peroksidaza (GPX) katalizuje reakcije vodonik-peroksida i hidroperoksida masnih kiselina, pri čemu nastaju dva molekula vode. Nosilac uloge reduktanta u reakciji redukcije peroksida je glutation (GSH). S obzirom na specifičan zahtev za visokom koncentracijom redukovanog glutationa, enzimi koji učestvuju u sintezi GSH (γ-glutamilcistein-sintetaza i glutation-sintetaza) takođe doprinose rezistentnosti ćelije na H₂O₂ [37].

Sekundarni mehanizam zaštite od oksidativnog stresa obuhvata brojne **antioksidante**, koji uklanjaju već stvorene slobodne radikale i nazivaju se „hvatači” slobodnih radikala, ili inhibiraju enzimske sisteme koji proizvode ROS. Tu su takođe neenzimski antioksidanti, kao što su askorbinska kiselina, vitamin E, karotenoidi, selen i drugi [37, 38].

Poslednji u nizu mehanizama zaštite mikrobnih ćelija od oksidativnog stresa se zasniva na aktivnosti enzimskih antioksidanata koji vrše **popravku i zamenu oštećenih makromolekula**. Oksidovani proteini se delovanjem proteaza ili proteazoma razgrađuju do aminokiselina, dok se

oksidovane aminokiseline uklanjaju, ili se recikliraju i koriste u popravci oštećenih proteina ili za sintezu novih proteina [37].

Kao posledica lipidne oksidacije nastaju oštećenja na membrani, ali i drugim molekulima mikrobnih ćelija. Zahvaljujući razvijenom mehanizmu za popravku oksidovanih lipida, mikroorganizmi ipak uspevaju da održe integritet i selektivnu propustljivost membrane i zaustavljaju dalje poremećaje koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa. Ovde značajnu ulogu imaju fosfolipaze koje vrše hidrolizu oksidovanih masnih kiselina, a takođe i gore pomenuti enzim GPX [37].

Sistemi za popravku oštećenja na DNK molekulu su naročito važni s obzirom da je DNK molekul od ključnog značaja za deobu ćelije. Ovi sistemi obuhvataju specifične i nespecifične enzime. Popravka baza se uglavnom vrši deovanjem enzima za popravku oštećenja putem diektne ili bazne ekscizije reparacije. Samo neki od enzima uključenih u popravku su: DNK glikozilaza koja učestvuje u prvom koraku bazne ekscizije reparacije putem uklanjanja oštećene baze, DNK metiltransferaza koja popravlja oštećenja nastala oksidativnom demetilacijom, glutation transferaze i peroksidaze uklanjaju perokside timidina, i drugi. Značaj efikasnog uklanjanja nastalih oksidativnih oštećenja ogleda se u njihovom mutagenom potencijalu, koji je direktno proporcionalan broju oksidovanih DNK lezija koje su ostale nepopravljene [35, 37, 39].

1.3.2 Gladovanje - nutritivni stres

Među najčešćim faktorim stresa sa kojim se mikroorganizmi susreću u svom prirodnom okruženju je nutritivni stres. Da bi preživeli duge periode gladovanja, mikroorganizmi su razvili različite strategije koje im omogućavaju da opstanu sve dok se ponovo ne uspostave povoljni uslovi za rast. Brojne studije se bave istraživanjem nutritivnog stresa sa različitih aspekata i u različitim eksperimentnim okvirima. Najekstremnija forma nutritivnog stresa jeste potpuno lišavanje nutrijenata, odnosno, gladovanje. Rana istraživanja su pokazala da Gram-negativne bakterije, među njima i *E.coli*, u uslovima gladovanja ostaju metabolički aktivne, menjaju svoju morfologiju i redukuju ćelijsku deobu. Takođe je uočeno da se u odgovoru na nutritivni stres stiče povećana otpornost na druge tipove stresa (engl. „cross-resistance”). Kod *E. coli* i *Vibrio* sp. gladovanje indukuje povećanu otornost na toplotni stres, vodonik-peroksid i UV zračenje, dok se kod Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* povećana otpornost stiče samo na kisele sredinske uslove i oksidativni stres, a neznatno na UV zračenje [41]. Činjenica da *E.coli* jednu od dve katalaze, sintetiše u stacionarnoj fazi rasta kada nastupa gladovanje, ukazuje na značaj otpornosti na oksidativni stres za preživljavanje gladovanja [42-44].

1.3.2.1 Kriptični rast

Rana istraživanja gladovanja su ukazala na značaj tzv. kriptičnog rasta za preživljavanje gladovanja [45]. Kod *E. coli* i *S. aureus* je uočen pad vijabilnosti kulture od 90-99% tokom prvih dana gladovanja. Nakon ovog početnog pada, vijabilnost kulture ostaje nepromenjena u narednih mesec dana [42]. Pretpostavljeno je da se umiranjem većine ćelija u populaciji oslobađaju nutrijenti neophodni za opstanak male subpopulacije preživelih ćelija. U prilog teoriji o kriptičnom rastu je i činjenica da je preživljavanje dugotrajnog gladovanja *S. aureus* uočeno samo pri visokoj gustini ćelija u vodi, dok pri nižim gustinama nema preživljavanja. Smatra se da velika gustina ćelija *S. aureus* obezbeđuje, umiranjem najvećeg dela ove populacije, dovoljnu količinu nutrijenata za opstanak malog broja ćelija [42]. Kasnija istraživanja na različitim model organizmima su pokazala da tokom dugotrajnog gladovanja CFU (engl. „Colony Forming Units”) ostaje nepromenjen, zahvaljujući uspostavljanju balansa između ćelijskog rasta i lize ćelija [46].

Održavanje ćelijske vijabilnosti tokom ekstremnog gladovanja je zavisno od aktivnosti proteazoma i diferencijalne sinteze proteina. Generalno, sinteza proteina je smanjena u uslovima gladovanja, što

se odražava na nisku ekspresiju gena neophodnih za eksponencijalni rast, dok je povećana sinteza proteina neophodnih za preživljavanje dugotrajnog gladovanja. Kod *E. coli* je otkriveno nekoliko klasa gena koji se u uslovima gladovanja vremenski koordinisano ekspimiraju pod kontrolom nekoliko sigma faktora. Ove klase gena kodiraju 40-80 proteina specifičnih za odgovor na gladovanje, među kojim su proteini toplotnog šoka i reparativni proteini. Degradacija postojećih proteina obezbeđuje glavni izvor pula aminokiselina za sintezu novih proteina specifičnih za preživljavanje gladovanja, čime se ukazuje da bi recikliranje nutrijenata oslobođenih iz mrtvih ćelija bilo značajno za preživljavanje gladovanja [45, 47, 48].

1.3.2.2 Dormantne spore i oligotrofan rast

Neki rodovi bakterija, kao što je *Bacillus*, su razvili specijalizovane dormantne spore za preživljavanje dugih perioda u uslovima nedostatka nutrijenata. Kada nastupi gladovanje, na jednom polu ćelije se formira endospora koja se kasnije oslobađa lizom majke ćelije. Ove spore imaju dehidriranu citoplazmu i višeslojni zaštitni omotač koji im omogućavaju da prežive nutritivni stres [49]. Međutim, na nivou izogene populacije *Bacillus*-a, pored sporulišućih, preživljava i subpopulacija nesporulišućih ćelija. Nesporulišuće ćelije su sporo-rastuće ćelije koje karakteriše oligotrofni rast. Pokazano je da nizak nivo nutrijenata, koji je neophodan za oligotrofan rast, potiče od liziranih ćelija. Ove sporo-rastuće ćelije zadobijaju kokoidni oblik i postaju tolerantne na antibiotike. Takođe, pokazano je da su ove ćelije metabolički aktivne, i da imaju značajno različit transkripcioni profil u odnosu na ćelije stacionarne faze. Oligotrofan rast ima prednost nad sporulacijom, s obzirom da oligotrofne ćelije mogu brzo da se prebace na normalan rast kada uslovi postanu povoljni, za razliku od germinacije spora koja je dugotrajan proces sa neizvesnim ishodom [24, 46].

1.3.2.3 Dugoročno preživljavanje

Još jedan aspekt gladovanja je razvoj potencijala za dugoročno preživljavanje. Ispitivanja na *S. aureus* su pokazala da, u **uslovima inkubacije u vodi** ili u slučaju da je samo glukoza limitirajući nutrijent, dolazi do produženja životnog veka, dok nedostatak fosfata i aminokiselina dovodi do brzog pada vijabilnosti. Sa druge strane, *E. coli* i neki drugi organizmi pokazuju povećan životni vek nezavisno od limitirajućeg nutrijenta. Takođe, studije na kvascu *S. cerevisiae* su pokazale da u eksperimentalnim uslovima, gde se ćelije gajene u bogatom medijumu prebacuju u vodu (engl. „water transfer”), aktivira molekulski mehanizam koji dovodi do porasta dugovečnosti. Odgovor kvasca na ovakav vid nutritivnog stresa obuhvata inaktivaciju aminokiselinskog puta Tor-S6K i glukoznog odgovora Ras-AC-PKA i aktivaciju serin/treonin kinaze Rim15, koja je ključni enzim za kordinaciju puteva odgovora na nutritivni stres [42, 50]. Pokazano je da se, po transferu u vodu, povećava nivo autofagije i da je pored niske stope metabolizma, autofagija jedan od razloga za usporeno hronološko starenjenje ćelija kvasca u vodi [48, 51]. Generalno, po prebacivanju ćelija kvasca u vodu zaustavlja se ćelijska deoba i pokreće se kompleksan odgovor ćelije, koji putem reorganizacije unutarćelijskog miljea ostvaruje produžen životni vek ćelije. Zanimljivo je da, ukoliko se ćelijama kvasca, prethodno izgadnelim u vodi, dodaju fermentabilni ili nefermentabilni šećeri, pokreću se morfološke i fiziološke promene karakteristične za ćelije u mitozu, da bi kroz nekoliko sati došlo do drastičnog pada vijabilnosti. Naime, dodavanje šećera je signal izgadnelim ćelijama da su u medijumu prisutni nutrijenti neophodni za rast. Međutim, usled odsustva preostalih nutrijenata esencijalnih za rast, indukovane fiziološko-morfološke promene su praćene povećanom produkcijom ROS-ova koja dovodi do apoptotske smrti ćelija [52-54].

1.3.2.4 „Liquid Holding”

Istraživanja su pokazala da ćelije kvasca imaju sposobnost oporavka od snažnog stresa ukoliko se pre zasejavanja na hranljivu podlogu inkubiraju duži period u vodi ili razblaženom fosfatnom puferu. Ovaj fenomen je nazvan „Liquid Holding Recovery” (LH), a pokazan je i kod drugih organizama.

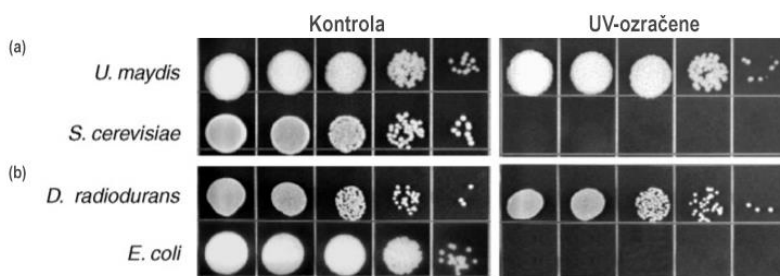
Studije ovog fenomena datiraju još iz „pre-molekularnog perioda”, kada su naučnici Sherman i Chase (1949) otkrili povećanu vijabilnost ozračenih ćelija nakon inkubacije u vodi. Pretpostavili su da je uočeni porast vijabilnosti posledica reprodukcije neoštećenih ćelija na račun produkata lize ćelija oštećenih zračenjem. Istražujući ovaj fenomen preživljavanja na *Saccharomyces cerevisiae*, Korogodin je 1957. godine uočio da se u medijumu bez nutrijenata γ -ozračene ćelije, kao i neozračene, niti dele niti umiru, ali da nakon duže inkubacije u odsustvu nutrijenata dolazi do porasta vijabilnosti. Primenom fluktuacionog testa, dokazao je da se radi o oporavku (engl. „recovery effect”) ozračenih ćelija u vodi i da je on specifičan za diploidne ćelije kvasca. Takođe, pokazano je da su dvolančani prekidi DNK zavojnice oštećenja koja su odgovorna za smrt ozračenih ćelija [55].

Dalja istraživanja su bila usmerena na ispitivanje bioloških mehanizama koji redukuju količinu oštećenja indukovanih zračenjem. Radeći na ćelijama kvasca ozračenim UV i X-zracima, Patrick i saradnici (1964) su otkrili da je proces energetski zavisian i da zahteva aktivnost enzima, što je ukazivalo da ćelije poseduju enzimske sisteme za popravku oštećenja i obnavljanje narušenih ćelijskih funkcija. Takođe, pokazano je da su uslovi neophodni za oporavak slični optimalnim uslovima za rast (temperatura 30°C, aeracija), ali da sam rast, odnosno pokretanje multiplikacije ćelija dodavanjem nutrijenata, ima antagonistički efekat na oporavak [56]. Ovo je navelo na zaljučak da produžena inkubacija u vodi indukuje odlaganje ćelijske deobe ili usporavanje stope rasta, što daje vremena reparacionim sistemima da poprave nastale lezije.

Koristeći fluktuacioni test, istraživačka grupa iz Brazila je pokazala da se povećanje broja vijabilnih ćelija tokom LH-inkubacije zasniva na reprodukciji preživelih ćelija, a ne na reparaciji oštećenih ćelijskih makromolekula. Od *E.coli* sojeva koje su koristili samo su *recA* sojevi bili oporavljeni, ali je u ovom slučaju korišćena daleko manja doza UV zračenja [57]. Prividni oporavak, odnosno rast preživelih ćelija je na sličan način demonstriran i kod *S. cerevisiae* nakon tretmana UV zračenjem talasne dužine između 297 i 313 nm [58]. Interesantno je da je kod *Schizosaccharomyces pombe* nakon tretmana genotoksičnim agensima uočen dodatni pad broja vijabilnih ćelija. Stepenn ovog dodatnog pada vijabilnosti u suspenziji tretiranih ćelija je bio u direktnoj korelaciji s upotrebjenom dozom genotoksičnog agensa, a uočeni efekat je nazvan Negativan-LH [59-61].

1.4 *U. maydis* kao eksperimentalni model sistem za izučavanje mehanizama ćelijskog odgovora na oksidativni stres

Ustilago maydis je patogena gljiva kukuruza iz razdela Bazidiomiceta, poznata po izuzetnoj otpornosti na ekstremne doze UV i jonizujućeg zračenja [62]. Ilustrativan primer rezistentnosti *U. maydis* na UV zračenje, u poređenju sa laboratorijskim sojevima *E. coli* i *Saccharomyces cerevisiae* i predstavnikom izrazito rezistentnog prokariota *Deinococcus radiodurans*, prikazan je na **Slici 1**.



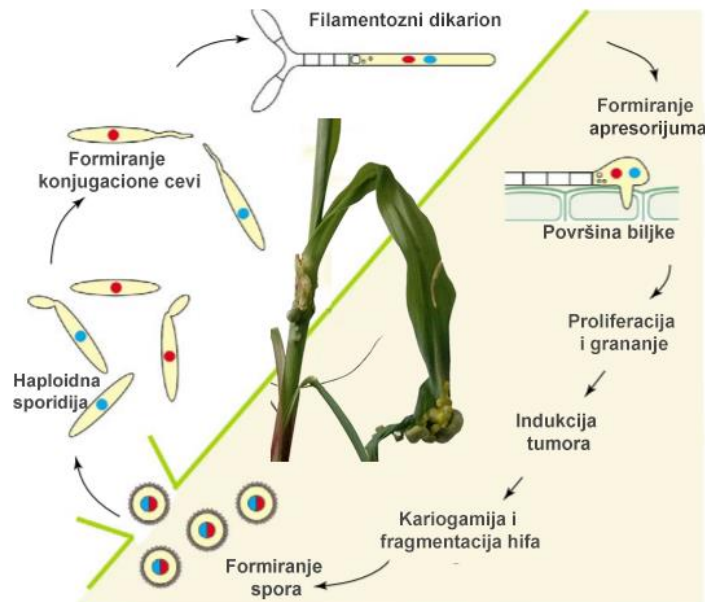
Slika 1 - Preživljavanje laboratorijskih sojeva (a) eukariota *U. maydis* i *S. cerevisiae* (b) prokariota *D. radiodurans* i *E. coli*, nakon tretmana UV zracima. Modifikovano prema [63].

Poznato je da, osim što direktno oštećuje DNK, UV zračenje i indirektno, putem generisanja ROS-ova, dovodi do nastanka lezija na DNK molekulu [64]. Iako su se brojne studije bavile ispitivanjem molekulske osnove ove rezistentnosti, još uvek se malo zna o molekularnim mehanizmima koji su doprineli ekološkom uspehu *U. maydis* u prirodi. Dosadašnje genetičke studije na ovom organizmu pokazuju da centralnu ulogu u rezistenciji na zračenje ima rekombinaciona popravka oštećenja na DNK molekulu, s obzirom da mutacije u genima koji kontrolišu homolognu rekombinaciju dovode do ekstremne senzitivnosti na UV i gama-zračenje. Visoko efikasna popravka oštećenja na DNK molekulu svakako doprinosi fitnessu saprofitske populacije. Međutim, istraživanja su pokazala da su, izuzev *dss1* (engl. „Deletion of Split foot/Split hand 1”), svi drugi rekombinacioni mutanti sposobni da proliferišu, formiraju gale i čak generišu teliospore u biljkama kukuruza [65].

Dominantna hipoteza vezana za evoluciju organizama otpornih na ekstremne doze zračenja, kao što su *D. radiodurans* i rotifera klase Bdelloidea, objašnjava da bi njihova izuzetna rezistentnost na zračenje mogla biti posledica evolucione adaptacije na preživljavanje dugih epizoda desikacije [66]. Imajući u vidu da *U. maydis* vodi poreklo iz aridnih ekosistema centralne Amerike, pretpostavka je da je izloženost genotoksičnim agensima, tokom obe faze životnog ciklusa, predstavljala snažan selektivni pritisak za razvoj rezistentnosti kod ove vrste [67]. Kao dimorfna gljiva, ovaj organizam prolazi kroz saprofitski i parazitski stadijum tokom kojih je izložen različitim, vrlo često nepovoljnim životnim uslovima. U svojoj nepatogenoj saprofitskoj fazi, *U. maydis* raste kao haploidna sporidija i zahteva samo izvor ugljenika i jednostavne minerale za svoj vegetativni rast. U ovom stadijumu, on mora da se izbori sa UV-zračenjem, oksidativnim stresom uzrokovanim desikacijom i rehidratacijom, toksinima koji oštećuju DNK produkovanim od strane zemljišnih bakterija i drugih gljiva i drugim stresogenim faktorima. Po spajanju sa kompatibilnom haploidnom ćelijom prelazi u filamentozni dikarion (poseduje dva nefuzionisana jedra) koji je sposoban da inficira biljku, a potom nastavlja svoj životni ciklus kao biljni parazit. U parazitskom stadijumu, *U. maydis* je izložen imunskom sistemu svog domaćina. U odgovoru na infekciju biljka sintetiše antimikrobne reaktivne kiseonične i azotne vrste, tako da proizvedeni superoksidi, peroksidi i hidroksilni radikali dovode do oksidativnih oštećenja gotovo svih makromolekula patogena [63]. Imajući u vidu da se tokom oba životna stadijuma suočava sa nepovoljnim sredinskim uslovima, *U. maydis* predstavlja veoma dobar model sistem za istraživanje molekularne osnove adaptacije na promenljive uslove životne sredine.

1.4.1 Životni ciklus *U. maydis*

U. maydis je u narodu poznat kao „mehurasta gar” ili „kukuruzna garež” koja izaziva gljivično oboljenje na nadzemnim delovima biljke. Radi jednostavnosti, u ovom radu će se koristiti naziv „ustilago”. Ustilago je diomrfna gljiva, koja prolazi kroz dva životna stadijuma - parazitski i saprofitski. Kao saprofit, ustilago živi u zemljištu u formi haploidnih sporidija koje nalikuju ćelijama kvasca. U ovoj formi, rast je vegetativan, pupljenjem i gljva nije patogena. Kako pripada grupi biotrofnih organizama, ustilago zahteva biljnog domaćina (*Zea mays*) da bi kompletirao svoj životni ciklus. Da bi došlo do infekcije biljke, neophodno je da se na površini biljke prepoznaju dve kompatibilne haploidne ćelije. Sparivanje haploidnih partnera se dešava putem receptor-feromon sistema i genetički je regulisano bialelski *a lokusom*. Vođene feromonskim signalima, dve ćelije se izdužuju formirajući konjugacionu cev. Kada se ćelije fuzionišu, uspostavlja se stabilan dikarion i pokreće se program filamentoznog rasta hifa. Razvojni program za filamentozni rast je regulisan homeodomen transkripcionim faktorom, koji je kodiran višealelskim *b lokusom*. Dikariotski filament formira apresorijum, specijalizovanu infektivnu strukturu koja omogućava patogenu da prodire u biljno tkivo. Intenzivna proliferacija i fragmentacija hifa je praćena neregularnom deobom biljnih ćelija, što rezultuje formiranjem tumora na nadzemnim delovima biljke. Tumori (gale) su ispunjeni crnom masom teliospora. Germinacijom diploidnih teliospora nastaju haploidni mejotički produkti i počinje saprofitska faza u životu ustilaga [68, 69].



Slika 2 - Životni ciklus *Ustilago maydis*. Modifikovano prema [70].

1.4.2 *U. maydis* kao model sistem

U. maydis se već nekoliko decenija koristi kao model sistem u molekularno-genetičkim studijama. Kao biljni patogen, koji dovodi do formiranja tumora na svim nadzemnim delovima kukuruza, ustilago je vrlo važan model organizam u istraživanju patogeneze i odnosa biljka-patogen. Intenzivna istraživanja osnovnih bioloških procesa na ovom organizmu, kao i anotacija genoma pokazali su da je mnogo sličniji metazoama nego srodnim askomicetama, pa je tako našao primenu u istraživanju kompleksnih ćelijskih procesa, kao što su mitoza, transkripciona i post-transkripciona regulacija, organizacija mikrotubula i regulacija ćelijskog ciklusa kod viših eukariota [68]. Takođe, ustilago je postao važan model sistem u studijama koje se bave neuronima i transportom na velike distance duž mikrotubula, s obzirom da je pokazano da su duge hife i filamentozni rast fenotipski

slični neuronima sisara. Ipak, ustilago je najviše doprineo u oblasti reparacije i rekombinacije DNK molekula. Zahvaljujući studijama na ovom model sistemu, Robin Holidej je 1960. godine postavio svoj koncept heterodupleksa, Holidejeve strukture, u DNK rekombinaciji i u ovom organizmu su izolovani prvi mutanti u reparaciji DNK kod eukariota. Genetičke analize mutanata u DNK reparaciji su utvrdile da *U. maydis* poseduje *Brh2*, homolog humanom BRCA2 (engl. „Breast Cancer Type 2”), koji je jedan od ključnih učesnika homologne rekombinacije čime je nagoveštena mogućnost da je prisustvo *BRCA2* gena u živim sistemima rasprostranjeno univerzalnije nego što je do tada smatrano. Ovo paradigmatično otkriće, u jednostavnom i genetički brzom model sistemu, kao i činjenica da *BRCA2* homolog nije prisutan kod *S. cerevisiae*, dodatno je intenziviralo istraživanja i otvorilo jedinstvenu priliku da se neka goruća pitanja vezana za funkciju BRCA2 u procesima homologne rekombinacije i DNK reparacije ubrzo razreše [62]. Tako je prva ubedljiva demonstracija da je *Dss1* zaista funkcionalno vezan za *BRCA2* urađena elegantnom konstrukcijom i analizom *dss1* mutanta u ovoj jednoćelijskoj bazidiomiceti [71].

Pored bioloških i genetičkih osobina koje su slične višim eukariotima te ga čine dobrim model sistemom, rad sa *U. maydis* nudi i niz tehničkih prednosti:

1. Ima kratko vreme generacije (oko 90 min) i relativno kratak životni ciklus (oko 3 nedelje) u laboratorijskim uslovima.
2. Efikasno uzgajanje na čvrstoj podlozi ili u tečnom hranljivom medijumu, u haploidnoj ili diploidnoj formi.
3. U haploidnoj formi raste kao kvasac i formira kompaktne pojedinačne kolonije na čvrstoj podlozi (odsustvo filamentoznog rasta), što olakšava primenu klasičnih mikrobioloških metoda, poput testa otiskivanja (eng. “*replica plating*”).
4. Gajenje haploida isključuje mogućnost heterozigotnog stanja, čime je olakšano ispitivanje funkcije mutiranog gena.
5. Dobro razvijene metode za transformaciju olakšavaju identifikovanje i ispitivanje gena. Procedura za transformaciju zahteva pripremu protoplasta, a činjenica da ćelije protoplastiranjem prelaze iz štapićastog u sferičan oblik, omogućava jednostavno utvrđivanje stepena efikasnosti protoplastiranja.
6. Razvijeni „shuttle vektori“ za propagaciju u bakterijskim ćelijama i ćelijama *U. maydis*. Efikasno umnožavanje u bakterijskim ćelijama omogućava izolovanje plazmidnog vektora u velikoj količini.
7. Razvijeni genetički markeri koji omogućavaju lako identifikovanje sojeva, što je značajno za selekciju transformanata ili diploida, ukrštanje, praćenje segregacije hromozoma i rekombinacije.
8. Moguće je pratiti mejozu, što se postiže zasejavanjem teliospora dobijanih iz inficiranih biljaka na hranljivu podlogu i praćenjem njihovog klijanja u mejotičke produkte.
9. Genom je sekvenciran, mali je i kompaktan, organizovan u 23 hromozoma. Sekvenca je dostupna u javnoj bazi podataka.

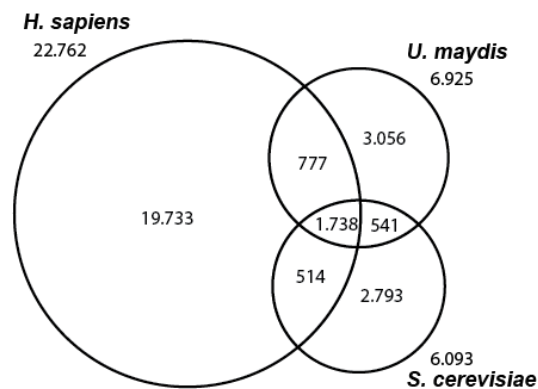
1.4.3 Genom *U. maydis*

Genom *U. maydis* je sekvenciran 2006. godine i istovremeno je među prvim kompletno sekvenciranim genomima biljnih patogena. Oko 20,5 Mb DNK sekvence je organizovano u 23 hromozoma. Genom sadrži 6902 gena i kompaktan je organizovan, tako da samo 30% gena sadrže introne [72]. Sekvenca genoma *U. maydis* je dostupna na:

- https://mycocosm.jgi.doe.gov/Ustma2_1/Ustma2_1.home.html
- https://fungi.ensembl.org/Ustilago_maydis/Info/Index?db=core

Poređenjem genoma *U. maydis* i *S. cerevisiae* (14Mb, 6600 gena, 5% gena sadrži introne) nije uočena značajna razlika između ova dva organizma [63]. Međutim, uporedna analiza genomske

sekvence *U. maydis*, *S. cerevisiae* i *H. sapiens* je pokazala da *U. maydis* ima veći broj gena (777) koji su sličniji humanim nego genima kvasca (514). Takođe, funkcionalnom analizom na bazi homologije aminokiselinske sekvence je ustanovljeno da ~10% proteina *U. maydis* (681) pokazuje homologiju sa proteinima čoveka, što ukazuje da su procesi u kojima učestvuju ovi proteini, najverovatnije očuvani u humanim ćelijama [62, 73].



Slika 3 - Poređenje sekvence predikovanih proteina *U. maydis*, *S. cerevisiae* i *H. sapiens*. Modifikovano prema [62].

Značajno je da oko 30% gena kod *U. maydis* je ili hipotetične ili potpuno nepoznate funkcije.

2 CILJEVI

U. maydis je izložen različitim vrstama stresa tokom obe faze svog životnog ciklusa. Dosadašnja istraživanja su bila pretežno usmerena ka izučavanju molekularnih mehanizama odgovornih za održavanje integriteta genoma ove bazidiomicete. Po sebi se razume da mehanizmi očuvanja integriteta genoma mogu doprineti oporavku populacije nakon izlaganja stresu putem unutarćelijske popravke oštećenih makromolekula (DNK). Međutim, to nije jedini način obnove stresom devastirane mikrobijalne populacije mikroorganizama. Naime, pokazano je kod *E. coli* i *S. cerevisiae* da se, nakon stresa, ruinirana populacija može obnoviti i putem multiplikacije preživelih ćelija [57, 58]. Naravno, ovde se odmah postavlja pitanje same sposobnosti *U. maydis* da obnovi populaciju nakon izlaganja snažnom stresu.

Budući da su preliminarni rezultati pokazali da *U. maydis* ima izuzetnu sposobnost oporavka nakon delovanja jakog oksidativnog stresa izazvanog peroksidom i UV zračenjem, utvrđena je polazna tačka za sveobuhvatnije istraživanje ovog procesa pri čemu su formulisana dva primarna cilja:

1. Utvrđivanje mehanizma uspostavljanja vijabilnosti populacije *U. maydis* nakon delovanja stresogenih faktora u uslovima gladovanja (uslovima nepovoljnim za proliferaciju). Osnovno pitanje je da li se obnavljanje populacije zasniva na unutarćelijskoj popravci oštećenih makromolekula ili na sposobnosti preživelih ćelija da se razmnožavaju koristeći nutritivni materijal poreklom iz umrlih ćelija.
2. Identifikovanje ćelijskih faktora uključenih u ovaj fenomen u cilju detaljnijeg razumevanja molekularne osnove procesa neophodnih za efikasnu obnovu populacije. Činjenica da je oko 30% gena *U. maydis* nepoznate funkcije [1] ostavlja mogućnost da bar neki od ovih ćelijskih faktora može biti specifično uključen u obnovu populacije nakon dramatičnog smanjenja broja vijabilnih ćelija pod dejstvom oksidativnog stresa.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Osnovne procedure rada sa DNK

3.1.1 Izolovanje genomske DNK iz kulture ćelija *U. maydis*

Genomska DNK iz *U. maydis* ćelija je izolovana upotrebom DNeasy mericon Food Kit (Qiagen), po uputstvu proizvođača, uz nekoliko modifikacija. U prvom koraku 5-6 mL tečne prekonocne kulture ($\sim 3 \times 10^8$ ćelija/mL) je oboreno centrifugiranjem 1 min na maksimalnoj brzini. Talog ćelija je resuspendovan u 1 mL pufera za lizu koji je sadržavao 50 $\mu\text{g/mL}$ proteinaze K. Radi efikasnijeg razbijanja ćelijskog zida, u smešu je dodavana 1/10 volumena staklenih kuglica (425-600 μm , Sigma). Smeša je potom vorteksovna 1-2 min kako bi se ćelije lizirale. Nakon inkubiranja smeše na 60°C /10 min, dodavana je ista zapremina SEVAG-a (hloroform:izoamil alkohol u odnosu 1:1), smeša je intenzivno mešana okretanjem tube i potom centrifugirana na 14000 x g, 10 min. Gornja faza koja sadrži nukleinske kiseline je prebacivana u čiste tube i ponovljeno je prečišćavanje SEVAG-om. Nakon dodavanja 2/3 zapremine hladnog izopropanola u gornju fazu i mešanja, DNK je taložena centrifugiranjem na 16000 x g, 5 min. Talog je ispiran sa 700 μL 70% etanola, sušen na 37°C, 30 min ili u vakuum uparivaču, 5 min. Finalno, talog je resuspendovan u 80 μL vode sa RNazom A (1 mg/mL).

Alternativno, u cilju povećanja čistoće izolovane DNK ista je nakon sušenja, restvorena u 300 μL vode i dodavan je komercijalni pufer PB u odnosu 1:1. Smeša je naneta na QIAquick kolonu, za koju se DNK vezuje. Nakon centrifugiranja na 16000 x g/1 min, kolona je ispirana sa 500 μL AW2 pufera i dodatnim centrifugiranjem 1 min/16000 x g uklonjeni su tragovi etanola koji bi mogao inhibirati kasnije enzimske reakcije. DNK je eluirana u 80 μL EB pufera, centrifugiranjem na 16000 x g/1 min.

3.1.2 Izolovanje plazmida iz bakterija

Za izolovanje plazmidne DNK, pojedinačne kolonije *E. coli* su zasejane u 3 mL LB medijuma u koji je dodat antibiotik (ampicilin 100 $\mu\text{g/mL}$) i inkubirane peko noći na orbitalnom šejkeru (37°C, 180 rpm). Korišćene su dve metode, u zavisnosti od potrebnog nivoa čistoće izolata.

Ukoliko su izolati korišćeni samo za analizu dobijenih klonova, plazmidi su izolovani brzom procedura koja daje izolate manje čistoće. Prekonocna kultura je gajena do logaritamske faze rasta ($A_{600}=0,6-0,8$), nakon čega su ćelije istaložene centrifugiranjem 2 min, 6800 x g. Talog ćelija je resuspendovan u 200 μL E1 pufera (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) kratkim i intenzivnim mešanjem na vorteksu. U rastvor je dodato 200 μL E2 pufera (200 mM NaOH, 1% SDS) uz oprezno i lagano mešanje do homogenizacije lizata. Nakon toga, dodato je 200 μL rastvora E3 (3 M Na-OAc/3 M K-acetat, pH 5), čime se postigla neutralizacija reakcije. Smeša je centrifugirana 5 min, 15800 x g. Supernatant je pažljivo prebačen u nove mikrotube, a zatim je DNK precipitirana dodavanjem 2/3 zapremine izopropanola i centrifugiranjem 5 min, 15800 x g. Nakon centrifugiranja, izdvojeni supernatant je odliven, a višak soli iz taloga DNK je uklonjen pranjem sa 500 μL hladnog 70% etanola. Talog je izdvojen centrifugiranjem 2 min/15800 x g i nakon sušenja (na 65°C ili RT) je rastvoren u 30-50 μL rastvora RNKaze A (1 mg/mL). Da bi se uklonila RNK iz rastvora, izolat plazmidne DNK je inkubiran na 37°C tokom 20 min. Ovako dobijeni izolati plazmida su analizirani elektroforezom na agaroznom gelu.

Za izolovanje plazmidne DNK u preparativne svrhe primenjen je GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) prema protokolu proizvođača [74]. 2 mL prekonocne kulture je nasloženo u

mikrotubi od 1,5 mL 2 min na 6800 x g. Talog bakterija je resuspendovan u 250 μ L Rastvora za resuspenziju koji obezbeđuje alkalne uslove za liziranje bakterija. U sledećem koraku dodato 250 μ L Rastvora za lizu i 350 μ L Neutralizacionog rastvora koji sadrži visoku koncentraciju soli i obezbeđuje precipitaciju genomske DNK i vezivanje plazmidne DNK za silika kolone. Smeša je centrifugirana 15800 x g 5 min, izdvojeni supernatant je nanošen na GeneJET Spin kolonice koje su potom centrifugirane 15800 x g 1 min. Kolonice su ispirane 2 puta sa 500 μ L pufera za pranje, koji efiksano uklanja soli centrifugiranjem na 15800 x g, 1 min. Dodatnim centrifugiranjem pod istim uslovima, eliminisani su zaostali tragovi etanola, koji bi potencijalno mogli da inhibiraju enzimske reakcije na prečišćenim plazmidima. U poslednjem koraku, na kolonu je nanešeno 50 μ L vode ili pufera za eluciju i nakon 2-5 min inkubacije DNK je eluirana kratkim centrifugiranjem. Ovako prečišćeni plazmidi su korišćeni za sekvenciranje, transformacije i PCR.

3.1.3 Elektroforeza DNK na gelu od agaroze

Fragmenti DNK su razdvajani elektroforezom na agaroznom gelu (Serva) koncentracije 1 ili 2% (w/v) pripremljenom u TAE puferu (0,04 M Tris-acetate, 1 mM EDTA) [75]. Procenat agara u gelu je zavisio od veličine fragmenata koje je trebalo razdvojiti. Radi vizualizacije DNK, u gel je dodavan etidijum bromid (0,5 μ g/mL). Primenjeni napon za elektroforetsko razdvajanje je bio od 5-10 V/cm gela. Nakon završene elektroforeze, razdvojeni DNK fragmenti su vizualizovani na UV transiluminatoru na talasnoj dužini od 266 nm (Biometra). DNK marker, korišćen kao standard za utvrđivanje dužine fragmenata je bio „1 kb ladder“ (Thermo Scientific). Fragmenti DNK od interesa (dobijeni posle PCR umožavanja ili tretmana restrikcionim enzimima) su određivani na gelu upoređivanjem dužine puta DNK trake koja se ispituje u odnosu na dužinu puta koju su prešli fragmenti poznate dužine (DNK marker).

3.1.4 Prečišćavanje fragmenata DNK iz agaroznog gela

Fragmenti DNK od interesa su prečišćeni upotrebom QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), prema protokolu proizvođača. DNK je razdvojena elektroforezom na 1% gelu od agaroze (Sigma), a potom su fragmenti DNK od interesa vizualizovani na UV transiluminatoru, isecani iz gela skalpelom i inkubirani u 3V pufera QG (100 mg gela u 300 μ L pufera) na 50°C tokom 10 min uz povremeno mućkanje. Nakon rastvaranja gela u smešu je dodan 1V izopropanola. Smeša je naslojena na QIAquick kolone i centrifugirana 1 min na 15800 x g. Kolone su zatim prane sa 500 μ L pufera QG, a potom sa 750 μ L pufera PE. Radi uklanjanja zaostalog etanola koji bi potencijalno mogao da inhibira enzimske reakcije, kolone su dodatno centrifugirane pod istim uslovima. Za eluciju DNK, na kolonu je dodato 50 μ L vode ili EB pufera, i nakon 1 min inkubacije, centrifugirano 1 min na 15800 x g. U cilju povećanja prinosa prečišćene DNK, kolone su inkubirane u puferu za eluciju do 5 min na sobnoj temperaturi.

3.1.5 Digestija DNK restrikcionim enzimima

Digestija DNK restrikcionim enzimima je vršena komercijalnim preparatima enzima i pufera, prema protokolu proizvođača. Smeša za restrikcionu digestiju je sadržavala oko 1 U/ μ g DNK i inkubirana je na preporučenoj temperaturi od strane proizvođača (za većinu enzima 37°C, a za *Sma*I 30°C). Digestija plazmida je trajala 3-4 sata ili preko noći, kako bi se izbegla parcijalna digestija u slučaju kada je potrebna veća količina inserta za dalje kloniranje. Reakcija restrikcione digestije je prekidana kratkom inkubacijom na 65°C.

3.1.6 Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima

Reakciona smeša za ligaciju DNK fragmenta od interesa i vektora je sadržavala 50-100 ng plazmidnog vektora u 1X T4 DNK ligacionom puferu sa 1 U T4 DNK ligaze (Thermo Scientific).

Kako bi se povećala efikasnost i prinos ligacije, insert je bio u 3 puta molarnom višku u odnosu na vektor. Reakciona smeša je inkubirana preko noći na 16°C.

3.1.7 Sekvenciranje DNK i analiza transkriptoma

Uslužno sekvenciranje plazmidne DNK je rađeno u kompaniji MacroGen, Holandija (<https://dna.macrogen.com/>).

Sekvenciranje transkriptoma i bioinformatička analiza rezultata je rađena u kompaniji Novogene (<https://en.novogene.com/>). Ova usluga je obuhvatila utvrđivanje količine i kvaliteta uzoraka izolovane totalne RNK (≥ 400 ng, ≥ 20 μ l, ≥ 20 ng/ μ l, ≥ 6.3 flat base line), pripremu iRNK biblioteke (uz tzv. „poly A enrichment“), sekvenciranje (NovaSeq 6000; PE150, Q30 $\geq 80\%$; 6G raw data per sample) i analizu rezultata: kontrola kvaliteta, mapiranje na referentni genom (HISAT2 softver), predikcija novih gena, kvantifikacija nivoa genske ekspresije preko RPKM (engl. „Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads“), analiza diferencijalne ekspresije (DESeq2 R), funkcionalna GO i KEGG analiza (engl. „Enrichment analysis“).

3.1.8 Bioinformatička analiza sekvenci

Za identifikovanje komplementirajućih genomskih fragmenata i njihove pozicije u genomu *U. maydis* korišćen je program JGI MycoCosm, The Fungal Genomic Resources (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Ustma1>).

Bioinformatičkom analizom sekvence su utvrđivane pozicija i tip mutacije, kao i mogući efekti mutacije na strukturu i funkciju proteina. Rezultati sekvenciranja su obrađivani prvo poređenjem sa sekvencama iz GenBank baze podataka kako bi se potvrdila mutacija u DNK sekvenci. Za ovu analizu korišćen je BLAST search program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dalja analiza i utvrđivanje mutacije na proteinskom nivou je rađena u okviru programskog paketa ExPASy (<http://www.expasy.org>).

Dizajniranje prajmera je rađeno pomoću programa Primer3Plus, dok je za dizajniranje restrikcionih mapa korišćen program NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

3.1.9 Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR)

Umnožavanje fragmenata DNK od interesa reakcijom PCR (od engl. „Polymerase Chain Reaction“) vršeno je u epruvetama od 0,5 mL, a reakciona smeša je sadržavala 10-20 ng DNK matrice, 0,2 mM dNTP smešu, 0,2 μ M prajmera i odgovarajući pufer i polimerazu u zapremini 25 ili 50 μ L. Za umnožavanje kraćih fragmenata (ispod 500 bp) korišćena je DreamTaq Green DNK polimeraza (Thermo Scientific). Za potrebe sekvenciranja čitavih gena radi potvrđivanja prisustva mutacije, često je bilo potrebno umnožiti duže fragmente (oko 1kb), pa je rad/i postizanja veće tačnosti umnožavanja korišćena Phusion High-Fidelity DNK polimeraza (Thermo Scientific). Profil reakcije je zavisio od konkretne aplikacije. Generalno, program je obuhvatao sledeće korake: inicijalna denaturacija, odgovarajući broj ciklusa denaturacije, vezivanja prajmera, ekstenzija, i finalna produžena ekstenzija. Imena prajmera koji su korišćeni za identifikovanje mutacije, njihove sekvence, target geni, matrica i dužina PCR produkta su prikazani u **Tabeli 1**. Takođe, u tabeli su date sekvence prajmera 54R2 i 54Hy koji su korišćeni za sekvenciranje genomskih fragmenata u izolovanim plazmidima iz transformanata *U. maydis* tokom komplementacionog kloniranja.

Uslovi lančanog umnožavanja za identifikovanje mutiranih gena bili su sledeći:

1. Inicijalna denaturacija dvolančane DNK na 95°C/5 min;
2. 30 ciklusa: -denaturacija DNK na 95°C / 45 s,
-hibridizacija prajmera ("annealing") na 59°C/30 s,
- polimerizacija 72°C / 1 min;
3. Finalna elongacija produkata umnožavanja na 72°C/2 min.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za sekvenciranje fragmenata iz genomske biblioteke (54Hy, 54R2) i za umnožavanje delova kodirajućih sekvenci identifikovanih mutiranih gena.

Gen	Prajmeri	Sekvenca 5'-3'	Dužina PCR produkta	Matrica
/	54R2	CACACAGGAAACAGCTATGACC	/	pCM54 plazmid (genomska biblioteka)
	54Hy	ACACGACTCACATCTGC		
adr1 UMAG_04456	mir107F	GTCGATGACGACCAAGTGTG	1050 bp	Genomska DNK mutanta mir107
	mir107R	GATCAAAGATGTCCTTCTCAACAG		
did4 UMAG_04865	mir237F	CCCTCATCGGTTCTGCTATC	950 bp	Genomska DNK mutanta mir237
	mir237R	ACTGAGTAATTGAAGGAAGGTAAGGAC		
kel1 UMAG_15019	mir354S1F	GTA CTCCGGTATTCCCACTTCC	966 bp	Genomska DNK mutanta mir354
	mir354S1R	TAGATCTTGTCTTGTAGGTGACG	933 bp	
	mir354S2F	GCACCTTTATGAACGATCTCTGG		
	mir354S2R	GTTGCGACTGTATCTGTGTGG	865 bp	
	mir354S3F	GATCGTGGCATCAATCAAGC		
	mir354S3R	GTTGTGCTATGGTAGCCTTGG	991 bp	
	mir354S4F	GCACTTGCTGTCAAGAAAGG		
	mir354S4R	GCATCGATGTCTCGTCTTTCC	1142 bp	
	mir354S5F	GTCAAGCGAAGCATCTAGCC		
mir354S5R	CTCGTGTCTGTCCAGAGAGC			
tbp1 UMAG_10143	mir754F	CATACGGCCTCATCCTTACC	980 bp	Genomska DNK mutanta mir754
	mir754R	ATTTAAGAGATGGATAGGTGAATGC		
snf5 UMAG_04381	mir27S1F	AGCCACCCAAGACGTATCAC	952 bp	Genomska DNK mutanta mir27
	mir27S1R	CATAGTCTGCGGATTGAGACC	872 bp	
	mir27S2F	TTTGGTCAGATGGGTGGTATG		
	mir27S2R	GGCAATGAATGTACCTGTGATG	1009 bp	
	mir27S3F	AAACCAAACCAGACACCAGTC		
	mir27S3R	GGATGTACTGAGGGCGAGAC	1061 bp	
	mir27S4F	ATACATGCGCCTTACCTATG		
	mir27S4R	AGCGACGTTTCCATCTCTTG	1001 bp	
	mir27S5F	GGTACGTCTATTACTCACTTCAATACG		
	mir27S5R	ATCAGATTCATGGCACCTACG	1066 bp	
	mir27S6F	TGATCAAACCTCGATATCACCGTAG		
	mir27S6R	CGCGTGTACTCTAAAAGATGACC	1006 bp	
	mir27S7F	GCCCGACTATATGGAAGAGGAG		
	mir27S7R	TGAGCCTGTGACTTCTGTCATC	851 bp	
mir27S8F	ATCAAGACGGAGGCAGACAC			
mir27S8R	ACTCGTAACTCGCAACTCAAGAC			
snf8 UMAG_11539	mir2F	CAGCTTCTGTGTCCATCTTTCTAC	947 bp	Genomska DNK mutanta mir2
	mir2R	GTAGCATCGCCGCATACAG		
slm1	mir3S1F	CGTCGTCCACCTCTGTTCTT		Genomska DNK

UMAG_03678	mir3S1R	GAGACTGAGCCAGGTGTCCT	913 bp	mutanta mir3
	mir3S2F	GCAGACCTTTGACGAGTGGT	1008 bp	
	mir3S2R	AAGAATGCCGAGTAGAGTGAGTG		
chk1 UMAG_11087	mir20S1F	CTCCATCGAATACCAGACCATAG	1114 bp	Genomska DNK mutanta mir20
	mir20S1R	CAAGACCCTGCAAGAGTTTCTC	1056 bp	
	mir20S2F	GCTGGTTCAAGCGTGCTAAC		
	mir20S2R	ATGGCGGTGATGAGAAAAAG		
hsf UMAG_10368	mir29S1F	TCATCTACAATACACCACGCTACC	1093 bp	Genomska DNK mutanta mir29
	mir29S1R	TGCTGGTTTGAGCATTCTTG		
	mir29S2F	TAGTGTCTCAACGCCATCAAC	964 bp	
	mir29S2R	AGCATCCAGTCCGAGTGC		
	mir29S3F	GCTGTCTCCTCGTCCAACCTC	966 bp	
	mir29S3R	CCACCAAGCGTGTGTA AAAAAG		
vrg4 UMAG_1062	mir7S1F	GACCACTTCCATCTTGATCATCTAC	898bp	Genomska DNK mutanta mir7
	mir7S1R	CCTGAAAGCCCTCAATAACATC	889bp	
	mir7S2F	CTGTTTATGGTGCTCTCGTCTG		
	mir7S2R	AAAATGCTTTACGCTTTGTCAAG		

3.2 Osnovne procedure rada sa RNK

3.2.1 Izolovanje ukupne RNK iz *U. maydis* i DNazni tretman

Ukupna RNK izolovana je divljeg soja *U. maydis* upotrebom GeneJET RNA Purification kita (Thermo Scientific) po protokolu za izolovanje totalne RNK kvasca koji je modifikovan u početnom koraku. Suspenzija ćelija (2×10^7 /mL) je taložena centrifugiranjem na 16000 x g/2 min i talog je resuspendovan u zaostalom medijumu. Dodate su staklene kuglice i 100 μ L Yeast lysis buffer sa DTT i enzim za lizu (engl. „Lyizing enzymes from *Trichoderma harzianum*”) u cilju protoplastiranja ćelija. Smeša je intenzivno mešana 2 min, a potom inkubirana 30 min na 30°C uz konstantno mešanje na orbitalnom šejkeru (220 rpm). Pod mikroskopom je određen broj neprotoplastiranih ćelija, a potom je iz smeša uzeta zapremina sa jednakom količinom protoplasta, dodato je 300 μ L pufera za lizu sa DTT i dalje je izolovana RNK po protokolu iz uputstva proizvođača.

Nakon završene izolacije, izjednačena je količina RNK u oba izolata a potom je vršeno uklanjanje DNK iz RNK izolata pomoću DNA-free DNase Treatment and Removal Kit (Ambion), prema uputstvu proizvođača. U 44 μ L izolovane RNK (maksimalno 200 ng/ μ L), dodavano je 5 μ L 10 x DNaseI pufera i 0,5 μ L DNase I, smeša je inkubirana na 37°C 20-30 min, a potom je dodato još 0,5 μ L DNaseI (finalno 2U Dnase) i smeša je inkubirana još 30 min. DNaza I je inaktivirana inkubiranjem sa 5 μ L Dnase Inactivation reagensa na sobnoj temperaturi 2 min. Nakon centrifugiranja na 90 s/10000 x g, supernatant sa prečišćenom RNK je prebacivan u čistu tubu.

3.2.2 Elektroforeza RNK na gelu od agaroze

Elektroforeza RNK se zbog sekundarne strukture RNK, koja utiče na njenu pokretljivost, vrši u denaturišućim uslovima. Pripremljen je 1% agarozni gel u TAE puferu sa etidijum bromidom u (0,5 μ g/mL). U izolat RNK je dodata boja Orange G i 0,25% SDS, i nakon inkubacije 65°C/5min odmah je stavljen na led 10 min. Za elektroforetsko razdvajanje RNK je upotrebljen napon od 5 V/cm. Po završenoj elektroforezi RNK je vizualizovana na UV transiluminatoru.

3.2.3 Sinteza cDNK

Sinteza cDNK je vršena upotrebom RevertAid RT kompleta (Thermo Scientific) prema protokolu proizvođača. Prečišćen izolat RNK (do 500 ng) je inkubiran sa 0,5 µL random heksamernim prajmerima (10 pM) 65°C/5 min u finalnoj zapremini od 5 µL. Smeša je zatim prebacivana na led 2 min i potom je dodavan pripremljena smeša koji sadrži: 2 µL RT pufer (5x), 1 µL dNTP mix (10 mM), 0,25 µL Ribolock RNase Inhibitor, 0,5 µL RevertAid Reverse Transcriptase. Smeša je inkubirana u sledećim uslovima:

1. sobna temperatura (25°) /10 min (vezivanje prajmera);
2. 43°C /1 h (reakcija reverzne transkripcije);
3. 70°C /10 min (inhibicija reverzne transkriptaze).

Sintetisana cDNK je čuvana na -20°C.

3.3 Rad sa bakterijama

3.3.1 Bakterijski sojevi, vektori i medijumi

Sojevi *E. coli*:

DH5 alfa: F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ⁻*

Mega X DH10B T1: F⁻ *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG tonA*

Vektori:

pGEM-T Easy, Amp^r (Promega).

Hranljivi medijumi:

LB medijum: 1% (w/v) tripton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca, pH 7,5 sa ili bez 0,2% glukoze

LA hranljiva podloga-LB medijum sa 1,5% (w/v) agarom

U LB/LA medijum za uzgajanje *E. coli* dodavan je antibiotik ampicilin u koncentraciji 100 µg/mL.

3.3.2 Gajenje i održavanje bakterija

Za potrebe izolovanja plazmida ili transformacije, kulture *E. coli* su uzgajane preko noći na 37°C u tečnom LB ili na čvrstom LA medijumu, koji je sadržavao ampicilin. Kulture u tečnom medijumu su gajene uz konstantno mešanje na orbitalnom šejkeru (LabTherm) (180 rpm) radi optimalne aeracije. Petri šolje sa bakterijama su čuvane na 4°C i korišćene tokom tri do četiri nedelje, nakon čega su obnavljane. Za dugoročnu upotrebu bakterijske kulture su zamrzavane u 15% (v/v) glicerolu na -80°C.

3.3.3 Priprema kompetentnih bakterija za transformaciju toplotnim šokom

5 mL LB medijuma je inokulisano sa pojedinačnom kolonijom soja DH5α i kultura je inkubirana preko noći na 37°C na rotacionom šejkeru (180 rpm). 100 mL svežeg medijuma je inokulisano sa 1 mL prekonocne kulture i inkubirano na 37°C uz intenzivnu aeraciju (180 rpm) do dostizanja

srednje logaritamske faze rasta ($OD_{620}=0,3-0,4$). Rast bakterijske kulture je zaustavljen premeštanjem na led i inkubiranjem 10 min. Od ovog momenta sve je rađeno na ledu, hladnim nastavcima i rastvorima. Bakterije su centrifugirane (4°C , 10 min, $1600 \times g$) u kliničkoj centrifugi (Eppendorf 5702R) i talog ćelija je resuspendovan u 25 mL hladnog $0,1 \text{ M CaCl}_2$. Ćelije su ponovo istaložene (4°C , 10 min, $1100 \times g$), supernatant je odliven a talog resuspendovan u 25 mL hladnog $0,1 \text{ M CaCl}_2$ i suspenzija je inkubirana na ledu 30 min. Nakon obaranja ćelija centrifugiranjem pod istim uslovima, talog je resuspendovan u 5 mL $0,1 \text{ M CaCl}_2/15\%$ glicerol. Suspenzija ćelija je razdeljena u alikvote od po 100 μL . Ovako pripremljene ćelije su brzo zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80°C do upotrebe.

3.3.4 Transformacija *E. coli* toplotnim šokom

Transformacija *E. coli* toplotnim šokom je vršena izlaganjem ćelija toplotnom stresu u prisustvu DNK, plazmida ili ligacione smeše. Alikvot od 50 μL kompetentnih bakterija (DH5 α), čuvan na -80°C , je otopljen i inkubiran na ledu sa oko 200 ng DNK (30 minuta ili sat vremena). Smeša je potom izlagana toplotnom šoku tako što je iz leda prebačena u vodeno kupatilo (Mettler) na 42°C u trajanju od 90 s, a po isteku vremena odmah je vraćena na led i inkubirana 5 min. Transformisane ćelije su stavljen na oporavak u 1 mL neselektivnog LB medijuma (37°C , 1 h, uz aeraciju). Po oporavku, transformaciona smeša je razmazana na LA podloge sa ampicilinom i gajene preko noći na 37°C .

3.3.5 Priprema elektrokompetentnih ćelija *E.coli* za elektroporaciju

Pojedinačna bakterijska kolonija DH5 α soja je zasejavana u 5 mL LB medijuma, i inkubirana preko noći na temperaturi 37°C na orbitalnom šejkeru (180 rpm). Prekonoćna kultura je 10 x razblažena u 200 mL svežeg LB medijuma i inkubirana na 37°C uz aeraciju. Po dostizanju srednje logaritamske faze rasta ($OD_{600}=0,3-0,4$) kultura je razdeljena u 4 tube od 50 mL i rast ćelija je zaustavljen inkubiranjem na ledu 30 min. Nakon toga, vršeno je centrifugiranje u kliničkoj centrifugi ($+4^{\circ}\text{C}$, 15 min, $1000 \times g$) (Eppendorf 5702R), a talozi ćelija su resuspendovani na ledu u po 50 mL hladne destilovane vode i ponovo oboreni centrifugiranjem pod istim uslovima. Pranje ćelija u hladnoj vodi je ponovljeno, a potom su po 2 taloga spojena i oprana sa po 50 mL hladne vode. Talozima su resuspendovani na ledu u po 40 mL hladnog 10% glicerola i ponovo centrifugirani pod istim uslovima. Ćelije su finalno resuspendovane u 1,5 mL 10% glicerola i alikvotirane po 100 μL u sterilne, hladne mikrotube i inkubirane na ledu 10 min. Kompetentne ćelije su korišćene odmah, ili su trenutno zamrzavane u tečnom azotu i čuvane na -80°C do upotrebe.

3.3.6 Transformacija *E.coli* elektroporacijom

Transformacija *E.coli* elektroporacijom je rađena na uređaju Electroporator 2510 (Eppendorf). Korišćene su DH5 α kompetentne ćelije napravljene u laboratoriji ili komercijalne MEGAX DH10B T1R elektrokompetentne ćelije (Invitrogen). U 10 μL -aliquote komercijalnih DH10B ćelija je dodavana H_2O do 80 μL . Ćelije su inkubirane sa po 5-10 μL genomske DNK *U. maydis* na ledu 5 min. Smeša je prebacivana u ohlađenu kivetu za elektroporaciju (1 mm razmak između elektroda), stavljana u komoru elektroporatora i vršena je elektroporacija na 1250 V. Odmah po elektroporaciji bakterije su prebačene u 1 mL LB medijuma i oporavljane 1 h na 37°C . Po isteku vremena oporavka, transformacione smeše su razmazivane na LA hranljive podloge sa 100 $\mu\text{g/mL}$ ampicilina i inkubirane preko noći na 37°C .

3.4 Rad sa *U. maydis*

3.4.1 Sojevi *U. maydis*, vektori i medijumi, opšta strategija

Sojevi *U. maydis*:

UCM350 (*nar1-6 pan1-1 alb1*) - nominalni divlji soj

UCM520 (*nar1-1, a2b2*) - nominalni divlji soj i mutantni sojevi dobijeni u radu sa UCM520

UIMG10 (*nar1-6 -1 alb1*) - nominalni divlji soj i mutantni sojevi dobijeni u radu sa UIMG10

UCM666 (*nar1-6 pan1-1 alb1, recl*)

AB33did2Δhig AB33yupts, AB33ΔRab5, AB33HOOK, generisani od AB33 (*a2 P_{nar1}:bW2 P_{nar1}:bE1*) divljeg soja.

Vektori: “shuttle” vektor pCM54 (ori, Amp^R, UmARS, Hyg^R)

Hranljivi medijumi:

YEPS (engl. *Yeast Extract Peptone Succrose*) tečni medijum: 1% ekstrakt kvasca, 2% pepton i 2% saharoza (Torlak) [76]

YEPS čvrsta hranljiva podloga-YEPS medijum sa 2% (w/v) agrom (Torlak)

U hranljivi medijum je dodavan odgovarajući antibiotik: tetraciklin (15 µg/mL) (Sigma), higromicin (100 µg/mL) (Sigma), geneticin (100 µg/mL) (Sigma).

Za regeneraciju protoplasta su pripremane YSH hranljive podloge, koje sadrže YEPS, 1M sorbitol (Centrohem) i higromicin u finalnoj koncentraciji 150 µg/mL. Sorbitol se dodaje u hranljive podloge u kako bi se održala izotonična sredina i sprečilo pucanje protoplasta, dok je higromicin korišćen za selekciju transformanata.

3.4.2 Gajenje i održavanje *U. maydis*

Divlji i mutantni sojevi *U. maydis* su uzgajani preko noći na 30°C u tečnom ili na čvrstom YEPS medijumu, koji je sadržavao antibiotik tetraciklin (15 µg/mL), dok su transformanti održavani uz selekcionu antibiotik higromicin (100 µg/mL). Kulture u tečnom medijumu su gajene uz konstantno mešanje na orbitalnom šejkeru (LabTherm) (180 rpm) radi optimalne aeracije. Petri šolje sa *U. maydis* su čuvane na 4°C i korišćene tokom tri do četiri nedelje, nakon čega su obnavljane. Za dugoročnu upotrebu kulture su zamrzavane u glicerolu na -80°C.

3.4.3 Priprema početne suspenzije ćelija za tretman

U pripremi početne ćelijske suspenzije za tretman, prekonoćna kultura *U. maydis* je taložena centrifugiranjem na 16000 x g u trajanju od 2 min na sobnoj temperaturi i resuspendovana u 1-1,5 mL sterilne destilovane vode. Ukoliko su ćelije pripremane za tretman vodonik-peroksidom, prekonoćna kultura je dva puta prana u nekoliko mililitara vode, kako bi se uklonio hranljivi medijum koji bi mogao da umanjí efikasnost reakcije. U gotovo svim tretmanima, početna koncentracija ćelija je bila 2x10⁷ ćelija/mL. Broj ćelija u vodenoj suspenziji je precizno određivan upotrebom komore za brojanje krvnih ćelija (hemocitometar) pod 10 x uveličavajućim objektivom svetlosnog mikroskopa (BA80, Motic).

3.4.4 Semikvantitativno određivanje senzitivnosti/ preživljavanja

Po tretmanu ćelija, stepen preživljavanja ćelija je određivan semikvantitativno. Pripremano je pet 10 x serijskih razblaženja tretirane i netretirane (kontrolne) suspenzije ćelija, a potom je po 10 µL svakog od serijskih razblaženja zasejano na čvrstu hranljivu podlogu (s desna na levo) i praćena sposobnosti formiranja kolonija na hranljivoj podlozi. Ćelije zasejane na čvrstu YEPS podlogu su rasle 2 dana na 30°C, do postizanja jasno uočljivih kolonija.

3.4.5 Tretman ćelija *U. maydis* vodonik-peroksidom

Ćelije stacionarne faze laboratorijskog divljeg soja, gajene u bogatom medijumu, su tretirane sa H₂O₂ u Fentonovoj reakciji. U pripremi za tretman, 2x10⁷ ćelija/mL je inkubirano u 10 mM rastvoru FeNa-EDTA (Merck). Nakon 10 min inkubacije na 30°C, dodavan je H₂O₂ odgovarajuće koncentracije (0,1-1,1%) i inkubirano je 10 min na 30°C uz mešanje na 3 min. Odmah po isteku vremena reakcije, ćelije su taložene centrifugiranjem na 16000 x g, dva puta isprane vodom, i finalno resuspendovane u 1 mL vode, odnosno do početne koncentracije 2x10⁷ ćelija/mL. Stepem preživljavanja pri različitom nivou oštećenja ćelija meren je semikvantitativno, pripremom 10 x serijskih razblaženja tretirane i netretirane (kontrolne) suspenzije ćelija, zasejavanjem po 10 µL svakog razblaženja na čvrstu podlogu i praćenjem sposobnosti formiranja kolonija.

3.4.6 Ispitivanje sposobnosti oporavka *U. maydis* ćelija u uslovima gladovanja nakon stresa

Ćelije tretirane rastućim dozama H₂O₂ su nakon pranja vodom zasejane na podlogu radi merenja preživljavanja, a potom inkubirane u vodi i/ili razblaženom fosfatnom puferu na 30°C, uz aeraciju, tokom 24, 48, 72 sata. U ovim vremenskim tačkama je meren oporavak, uzimanjem alikvota inkubiranih kultura za pripremu serijskih razblaženja i njihovim zasejavanjem na čvrst hranljivi medijum.

Za tretman UV zračenjem, 2x10⁷ ćelija je resuspendovano u vodi u otvorenim Petri šoljama i uz kontinuirano mešanje, tretirano rastućim dozama UV zračenja (0, 120, 240, 360, 480, 600 J/m²). Za merenje preživljavanja, odmah po tretmanu uzeti su alikvoti ćelija za pripremu serijskih razblaženja tretiranih suspenzija koja su potom zasejana na podlogu. Ozračene ćelijske suspenzije su prebaćene u tube od 2 mL, i inkubirane su u vodi na 30°C uz konstantno mešanje. Nakon 24, 48, 72 sata meren je oporavak tretiranih ćelija, zasejavanjem serijskih razblaženja inkubiranih suspenzija na hranljivu podlogu.

Postojanje ćelijskog oporavka je utvrđeno poređenjem stepena preživljavanja ćelija koje su nakon tretmana direktno zasejane na hranjivu podlogu i ćelija koje su prethodno inkubirane u medijumu bez nutrijenata.

3.4.7 Ispitivanje mehanizma porasta brojnosti vijabilnih ćelija u uslovima gladovanja nakon izlaganja oksidativnom stresu

Mehanizam porasta vijabilnosti ćelija testiran je na dva načina:

1. Ćelije *U. maydis* su tretirane dozom H₂O₂ pri kojoj je preživljavanje 0,01% ili manje (0,3-0,5% H₂O₂). Ćelijska suspenzija je oprana i pripremljena su 10 x serijska razblaženja. I inicijalna suspenzija i razblaženja su stavljena na inkubaciju 3 dana, a serijska razblaženja su dodatno iskorišćena za iskapavanje na podlogu radi semikvantitativnog utvrđivanja preživljavanja. Alikvoti iz inicijalnih tretiranih suspenzija su uzimani nakon 24, 48, 72 sata, pripremana su 10 x serijskih razblaženja i zasejavana na podlogu (kao u 3.4.5.). Paralelno je u istim vremenskim tačkama praćena i vijabilnost ćelija iz serijskih razblaženja koja su pripremljena odmah nakon tretmana i inkubirana u istim uslovima.
2. Pored toga, mehanizam oporavka ćelija u uslovima gladovanja proveren je modifikovanim fluktuacionim testom. Nakon tretmana 0,5% H₂O₂ i pranja ćelija, preživljavanje manje od 0,01% je potvrđeno iskapavanjem serijskih razblaženja na čvrstu hranljivu podlogu. Oprana suspenzija ćelija u vodi je razdeljena na veliki broj alikvota (36) koji su inkubirani u vodi, u 1 mL-tubama tokom 3 dana i potom zasejavani na čvrstu hranljivu podlogu.

3.4.8 Ispitivanje ćelijske proliferacije u uslovima gladovanja

3.4.8.1 Ispitivanje kinetike oslobađanja unutarćelijskog materijala iz ćelija oštećenih oksidacijom

Ćelije *U. maydis* su tretirane rastućim koncentracijama H₂O₂ (0-0,6%), a potom je praćeno oslobađanje biomolekula iz oštećenih ćelija u ekstraćelijski medijum. Tokom 24 sata od reakcije, periodično je uziman alikvot, izdvojen supernatant i merena apsorbanca na 260 nm/280 nm kako bi se odredio ukupan nukleotidni/proteinski sadržaj u supernatantu.

3.4.8.2 Ispitivanje zavisnosti repopulacije od dostupnih biomolekula

Za utvrđivanje zavisnosti repopulacije od biomolekula oslobođenih iz ćelija ubijenih tretmanom, ćelije su periodično (na 15 minuta) prane vodom u toku prva 4 h inkubacije, kako bi se iz medijuma uklonili nutrijenti oslobođeni iz umrlih ćelija. Nakon pranja, ćelije su vraćene na inkubaciju u vodi i pratila se njihova vijabilnost 24, 48, 72 sata od tretmana pripremom i zasejavanjem serijskih razblaženja inkubiranih suspenzija na hranljivu podlogu.

Pored toga, fiksni broj netretiranih ćelija (8×10^3) je inkubiran u vodi, supernatantu netretiranih ćelija i supernatantu ćelija tretiranih 0,4% H₂O₂. Praćeno je povećanje vijabilnosti ćelija nakon 24, 48, 72 sata inkubacije. Supernatant je dobijen centrifugiranjem tretirane ćelijske suspenzije i filtriranjem kroz filtere sa porama od 0,22 μm (Millipore).

3.4.8.3 Ispitivanje efekta supstrata oslobođenog iz ćelija tretiranih peroksidom na proliferaciju svežih ćelija

Suspenzija ćelija (koncentracije 2×10^7 ćelija/mL) je tretirana rastućim dozama od 0-1,1% H₂O₂. Ubijanje ćelija je mereno semikvantitativno, direktnim zasejavanjem 10 x serijskih razblaženja tretiranih suspenzija na hranljivu podlogu. Svaka od tretiranih ćelijskih suspenzija je podeljena na dva alikvota i stavljena na inkubaciju. Jedan alikvot je pre same inkubacije inokulisan svežim netretiranim ćelijama (8×10^3 ćelija/mL). Drugi alikvot je nakon 4 sata inkubacije istaložen, a supernatant profiltriran i potom inokulisan netretiranim ćelijama (8×10^3 ćelija/mL). Netretirane

ćelije koje se dodaju u suspenziju i u supernatant su bile genetin rezistentnog divljeg soja, kako bi se razlikovala proliferacija netretiranih ćelija od preživelih tretiranih ćelija. Nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije, pripremana su 10 x serijska razblaženja i zasejavana na YEPS medijum i YEPS medijum koji sadrži genetin (100 µg/mL).

3.4.8.4 Ispitivanje uticaja odnosa tretiranih i netretiranih ćelija na efikasnost ćelijske reprodukcije

Suspenzije ćelija tretiranih prema opisu iz poglavlja 3.4.8.1. su 10 x razblažene i inokulisane istim brojem gentamicin rezistentnih ćelija (8×10^3 ćelija/mL). Nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije, pripremana su 10 x serijska razblaženja i zasejana na YEPS medijum i YEPS medijum koji sadrži genetin (100 µg/mL).

3.4.9 Analiza preživljavanja u vodi

Ćelije su gajene na 30°C uz rotaciju od 200 rpm u trajanju od 16-20 sati do rane stacionarne faze, kada je broj ćelija bio približno $2-4 \times 10^8$ ćelija/mL. Ćelije su oborene na 4000 x g, oprane dva puta u sterilnoj vodi i resuspendovane u vodi do koncentracije 4×10^8 ili 4×10^7 ćelija/mL. Ukoliko nije drugačije naglašeno, 1 mL pripremljene ćelijske suspenzije je inkubiran u u tubama od 1,5 mL, 30°C pri 200 rpm. Tube su dodatno zaptivene parafilmom. Da bi se odredila vijabilnost ćelija, uzimani su alikvoti u naznačenim vremenskim tačkama, pravljena su razblaženja i zasejavana na YEPS podlogu. YEPS šolje su inkubirane 2 dana na 30°C, kada se uočavaju jasne kolonije. Voda korišćena u eksperimentima je sterilisana, bidestilovana pomoću sistema za reverznu osmozu vode (C.C.K.). Atmosferski kiseonik je izmenjen ultra-čistim N₂ gasom (Messer Tehnogas).

3.4.10 UV mutageneza divljih sojeva UCM520 i UIMG10 i izolovanje mutanata skринingom na gubitak sposobnosti rasta u uslovima gladovanja

Po 10^6 ćelija prekonoćne kulture divljeg soja *U. maydis* je zasejano na petri šolje i izloženo UV zračenju jačine 250 J/m². Prosečno preživljavanje u ovakvim uslovima UV mutageneze je oko 500 ćelija po petri šolji (0,05%).

Prva grupa mutanata je izolovana iz divljeg soja UCM520 po sledećoj proceduri. Pojedinačne, nasumično izabrane, kolonije mutanata su gajene preko noći u tečnom YEPS medijumu, potom su prane vodom i tretirane 0,4% H₂O₂. Nakon tretmana, ćelijske suspenzije su prane i resuspendovane u vodi, a potom inkubirane 24 h, kada su serijska razblaženja zasejana na YEPS kako bi se ispitala sposobnost da rekonstituišu vijabilnost. Od 1200 testiranih, četiri su izgubila sposobnost rasta i bila su kandidati za dalja istraživanja.

Druga grupa mutanata je izolovana iz divljeg soja UIMG10 soja, selekcijom kandidata kroz supernatant ćelijske suspenzije tretirane peroksidom. Ćelijska suspenzija divljeg soja je tretirana 1% H₂O₂. Nakon 16 h inkubacije na 30°C na orbitalnom šejkeru (220 rpm) uzet je supernatant i profiltriran (Millipore, 0,45 µm) je od ćelija. Nasumično izabrane kolonije mutanata su resuspendovane u 1 mL H₂O, a potom je po 10 µL zasejano u 1 mL profiltriranog supernatanta. Nakon 48 h inkubacije na 30°C na orbitalnom šejkeru (220 rpm), pripremljena su 10 x razblaženja i po 10 µL od svakog je zasejano na YEPS podlogu. Skринing mutanta je vršen praćenjem sposobnosti mutanata da formiraju kolonije nakon zasejavanja na YEPS hranljivu podlogu. Testirano je približno 3500 kandidata od kojih je 33 pokazalo fenotip od interesa i testirano je na sposobnost rasta u supernatantu tretmana 0,6%, 0,8% i 1% H₂O₂.

Dalje ispitivanje odabranih kandidata iz obe grupe je obuhvatilo ispitivanje vijabilnosti u supernatantu ćelija tretiranih rastućim dozama peroksida (0,1-1,1% H₂O₂), senzitivnosti na genotoksične agense (UV, MMS, HU) i identifikovanje mutiranih gena.

3.4.11 Određivanje stope rasta

U tečni YEPS medijum je zasejana kultura divljeg soja UCM520 ili UIMG10 i mutantnih sojeva. Posle prekonoćne inkubacije, 300 µL prekonoćne kulture je prebačeno u svež YEPS medijum i gajeno nekoliko sati na 30°C na orbitalnom šejkeru (180 rpm). Po dostizanju logaritamske faze, ćelije su izbrojane pod mikroskopom, a potom je 1×10^6 ćelija/mL je zasejano u 4 mL YEPS-a u tubama od 50 mL. Ovako pripremljene ćelijske suspenzije su inkubirane na orbitalnom šejkeru (180 rpm, 30°C) tokom 10 sati, i na svaka 2 sata su uzimani alikvoti za brojanje ćelija pod mikroskopom. Stopa rasta je određena na osnovu logaritamskog grafika upotrebom formule $k = (\log N_2 - \log N_1) \times 2,303 / (t_2 - t_1)$. N_1 i N_2 predstavljaju broj ćelija u vremenskim tačkama t_1 i t_2 , redom. Rezultati su analizirani pomoću Student t-testa, upotrebom SPSS statističkog softvera. p-vrednost < 0,05 je smatrana statistički značajnom razlikom.

3.5 Identifikovanje mutiranih gena

3.5.1 Identifikovanje gena komplementacionim kloniranjem:

Geni komplementarni mutiranim alelima su klonirani transformacijom protoplasta mutanata genomskom bibliotekom divljeg soja, koja je pripremljena na samoreplikujućem plazmidnom vektoru pCM54. Za mutante senzitivne na neki od genotoksičnih agenasa, transformanti koji su nosioci komplementirajućeg genomskog fragmenta (genomski fragment koji komplementira mutaciju) su selektovani na odgovarajućem genotoksičnom agensu metodom otiskivanja (engl. „Replica plating”). Oni transformanti koji su pokazali rezistentnost na primenjeni genotoksični agens (fenotip približan divljem soju) su bili kandidati za semikvantitativnu analizu, koja podrazumeva da se iz prekonoćnih kultura transformanata pripreme ćelijske suspenzije koncentracije 2×10^7 /mL, a potom se serijska 10 x razblaženja zasejavaju na YEPS podlogu (kontrola) i YEPS podlogu sa selektivnim agensom. Odabrani transformanti su dodatno testirani tako što je nasumično izabrana pojedinačna kolonija svakog transformanta i testirana je njihova vijabilnost nakon tretmana 0,3 i 0,4% peroksidom i oporavak nakon 1, 2 i 3. dana.

Za mutante koji nisu pokazali veću senzitivnost na genotoksične agense, transformanti su selektovani kroz tretman 0,3% H₂O₂ ili inkubaciju u supernatantu poreklom od tretmana 1% H₂O₂. Nakon transformacije genomskom bibliotekom divljeg soja, svi transformanti su pokupljeni sa šolje, gajeni su kao prekonoćna kultura, a potom selektovani kroz tri ciklusa tretmana peroksidom/inkubacije u supernatantu i praćenja vijabilnosti (rast kolonija na petri šolji). Oni transformanti koji nose komplementirajući genomski fragment su pokazali rast nakon tretmana peroksidom. Tri kruga selekcije su vodila do obogaćivanja populacije ćelijama koje pokazuju komplementirajući fenotip. Nakon poslednjeg kruga, nasumično su izabrane pojedinačne kolonije i testirana je njihova sposobnost za obnovu populacije nakon tretmana 0,3 i 0,4% peroksidom/inkubacije u supernatantu poreklom od tretmana 1% H₂O₂. Posle ovog koraka sledilo je izolovanje totalne DNK i svi dalji koraci su zajednički za obe grupe mutanata.

Iz odabranih kandidata je izolovana totalna DNK, koja je potom korišćena za elektrotransformaciju ili transformaciju toplotnim šokom DH5α, kako bi se plazmidi umnožili u *E. coli*. Komplementirajući genomski fragmenti su identifikovani sekvenciranjem i bioinformatičkom analizom DNK sekvence. Potom su subklonirani pojedinačni geni i testirani na komplementaciju. Kada je utvrđeno koji od kandidat-gena komplementira fenotip mutanta, sekvenciran je alel gena mutanta. Prajmeri korišćeni za potvrdu mutacije su prikazani u **Tabeli 1**.

3.5.2 Pravljenje protoplasta *U. maydis*

Pojedinačna kolonija *U. maydis* sa YEPS petri šolje je zasejavana u 3 mL tečnog medijuma i gajena na 30°C na u orbitalnom šejkeru (180 rpm) 16 h. 30 mL svežeg YEPS medijuma je inokulisano sa 0,5 mL prekonocne kulture i inkubirano u erlenmajeru od 250 mL na 30°C pri 220 rpm. Nakon 1,5 sat inkubacije kultura je prebačena u tube od 50 mL i centrifugirana u kliničkoj centrifugi 5 min/ na 4°C pri 3000 x g. Supernatant je odbačen, a zatim su ćelije jednom oprane u H₂O, a potom u 5 mL SCS-a i istaložene centrifugiranjem na 2500 x g, 5 min na 4°C. Nakon odlivanja supernatanta, telog je resuspendovan u preostalom puferu i dodat je 1 mL SCS pufera koji je sadržavao 60 mg/mL enzima za liziranje ćelijskog zida (Lysing enzymes from *Trichoderma harzianum*, Sigma). Ćelije su inkubirane 25-30 min na 30°C/na rotacionom šejkeru (220 rpm). Efikasnost protoplastiranja je proveravana na 10 x uvećanju svetlosnog mikroskopa, stavljanjem 2 µL protoplastirane kulture i 10 µL SCS na predmetno staklo. Pod uspešnim protoplastiranjem smatrano je kada se uoči više od 80% protoplasta. Nadalje, sve je rađeno na ledu i sa hladnim rastvorima, i sa blagim mešanjem protoplastne suspenzije (bez upotrebe vorteksa). Protoplasti su oprani dva puta u 5 mL hladnog SCS-a, i jednom u 5 mL hladnog STC-a i taloženi centrifugiranjem 8 min/4°C/2500 x g. Talog opran u STC-u je resuspendovan u maksimalno 0,5 mL STC-a, i protoplasti su alikvotirani i zamrznuti na -80°C ili su odmah korišćeni za transformaciju.

3.5.3 Transformacija *U. maydis*

Za transformaciju protoplasta *U. maydis*, pripremano je 5 µL rastvora DNK sa heparinom (30% heparin, 1 µg totalne DNK ili 500 ng plazmidne DNK) i rastvor je inkubiran na ledu 5 min. U rastvor DNK je dodavano je 50-100 µL protoplasta, smeša je blago promešana invertovanjem tube i inkubirana na ledu 10 min. Potom je dodato 0,5-0,7 mL SPTC-a, tuba je invertovana 4-5 puta i inkubirana na sobnoj temperaturi. Posle 15 min smeša je razlivena na YEPS petri šolje i blago razmazana sprederom bez pritiskanja. Šolje su inkubirane na 30°C tri dana, do pojave jasnih kolonija.

3.6 Analiza ROS-a kod ćelija *U. maydis* inkubiranih u vodi

Određivanje nivoa ROS-a je urađeno prema protokolu po Kretschmer, 2018. [77] Ćelije su inkubirane u vodi tokom naznačenog vremenskog perioda (12, 16, 18 i 24 sata), a potom je gustina ćelija podešena na 4x10⁶ ćelija/mL. U 100 µL ove suspenzije je dodat 2,7- dihlorofluorescin diacetat (DCF-DA) (Life Technologies) u finalnoj koncentraciji od 100 µM. Ćelijske suspenzije su inkubirane u mraku 30 min na 37°C, a potom je fluorescenca merena na 480 nm (ekscitacija) i 530 nm (emisija) u mikrotitar pločama (BioLite 96 well, Thermo Scientific) na uređaju za čitanje plejtova (Plate Reader Infinite M200 PRO, Tecan Austria GmbH). Svi eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta. Statistička analiza produkcije ROS-a u hipoksiji tokom vremena je urađena testiranjem varijanse (ANOVA). Značajnost razlika između srednjih vrednosti uzoraka je analizirana pomoću post-hoc Tukey testa na nivou značajnosti od 0.05, upotrebom statističkog softvera SPSS 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

3.7 Bojenje ćelija *U. maydis* propidijum-jodidom

U 200 µL PBS pufera (1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄) je resuspendovano 4x10⁶ ćelija/mL, dodat je propidijum-jodi (PI) u finalnoj koncentraciji 100 ng/µL i inkubirano je 30 min u mraku. Ćelije su stavljene na staklenu pločicu i posmatrane pod

fluorescentnim mikroskopom BX51 (Olympus) sa 10 x uvećanjem objektiva, upotrebom filter bloka sa ekscitacijom 530-570 nm.

3.8 Priprema kultura *U. maydis* za izolaciju RNK

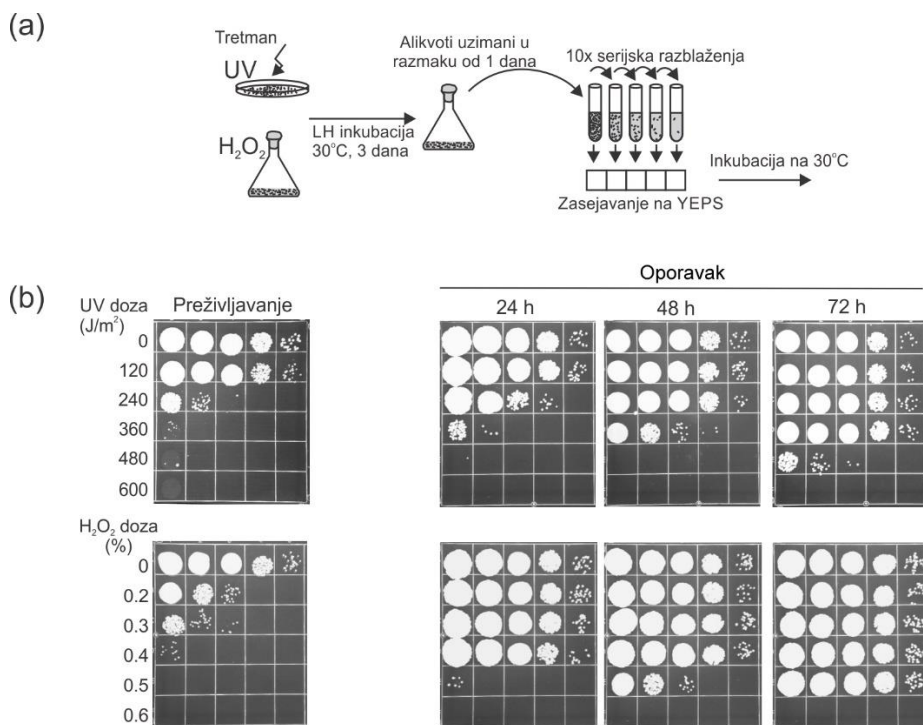
Prekonoćna kultura u eksponencijalnoj fazi rasta je oprana vodom 2 puta i talog je reuspendovan u vodi. Nakon brojanja suspenzije ćelija, pripremljeno je i istaloženo 2×10^7 ćelija u dve tube od 50 mL. U jednu tubu je dodato 13 mL YEPS medijuma (kontrola), a u drugu i treću 13 mL profiltriranog supernatanta ćelija tretiranih 0,4% i 0,7% H_2O_2 , redom. Ćelije su inkubirane u ovim supstratima 30 min, a potom oborene centrifugiranjem (RT, 5000 rpm, 20 min). Supernatant je odliven, talog ćelija je resuspendovan u zaostalom medijumu. Dalje je izjednačen broj ćelija u sve tri suspenzije (približno 2×10^7) i RNK je izolovana po prethodno opisanom protokolu (poglavlje 3.2.1) i za analizu transkriptoma je pripremljen 1 μ g prečišćene totalne RNK iz sva tri uzorka (dva tretmana i kontrola). Kratak opis same analize transkriptoma je dat u poglavlju 3.1.7.

4 REZULTATI

Ustilago maydis je tokom obe faze svog životnog ciklusa (saprofitne i parazitske) izložen nepovoljnim sredinskim faktorima. Za visoku rezistenciju na jonizujuća i UV zračenja odgovorna je efikasna popravka DNK lezija putem homologne rekombinacije (HR). Isključivanje bilo kog od ključnih HR gena dovodi do gubitka rezistencije, ali su ovi mutanti, izuzev *dss1* i dalje sposobni da nadvladaju odbrambene mehanizme biljke, da dovedu do infekcije, formiranja gala i teliospora. Generalno, molekularne osnove ekološkog uspeha ustilaga u nepovoljnim uslovima su uglavnom nepoznate. Dosadašnja molekularna i genetička istraživanja, koja bi mogla doprineti razumevanju visokog preživljavanja *U. maydis* u nepovoljnim sredinskim uslovima, proistekla su iz studija DNK reparacije u optimalnim laboratorijskim uslovima (temperatura, aeracija, nutrijenti) koji omogućavaju brz rast populacije, deobu ćelija. Međutim, u prirodi vladaju vrlo promenljivi uslovi, češće nepovoljni, tako da se većina mikroorganizama u prirodi nalazi pretežno u stanju mirovanja (odsustva deoba, rasta populacija). Esej koji bi omogućio izučavanje DNK reparacije u stanju ćelijskog mirovanja je „Liquid Holding” (LH), koji podrazumeva inkubaciju ćelija u vodi ili puferu, nakon izlaganja stresu. Tako bi ovaj eksperimentalni pristup imitirao nepovoljne sredinske uslove-nedostatak nutrijenata (gladovanje), nakon delovanja stresa, što je situacija sa kojom se *U. maydis* može sretati u prirodnim uslovima, kao što je npr. poplava nakon dužih sušnih perioda. Praćenje preživljavanja tokom LH-a je vršeno na *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *E. coli* [57-61], ali nikad nije ni na jednom organizmu koji je visoko rezistentan na zračenje, kao što je *U. maydis*.

4.1 Ispitivanje oporavka populacije ćelija *U. maydis* u uslovima gladovanja nakon tretmana vodonik-peroksidom i UV-zračenjem

Radi ispitivanja načina na koji ćelije mikroorganizama održavaju integritet genoma u nepovoljnim uslovima, testirana je uloga LH u oporavku ćelija *U. maydis* od stresa. Postavljen je eksperiment koji je imao za cilj da ispita da li produžena inkubacija tretirane suspenzije ćelija u uslovima bez nutrijenata, pre zasejavanja na hranljivu podlogu, ima ulogu u oporavku populacije od oštećenja indukovanih stresom. Šematski prikaz postavke eksperimenta dat je na **Slici 4a**. Ćelije (2×10^7 /mL) su tretirane rastućim dozama UV-a (od 120 do 600 J/m²) ili vodonik-peroksida (0,2-0,6%) u prisustvu jona gvožđa kako bi se generisale reaktivne kiseonične vrste (ROS) Fentonovom reakcijom, a potom su duži period (1, 2, 3 dana), pre zasejavanja na hranljivu podlogu, inkubirane u vodi ili razblaženom fosfatnom puferu. Oporavak je praćen tako što su periodično uzimani alikvoti za pravljenje serijskih razblaženja, koja su potom zasejavana na hranljivu podlogu. Sa porastom doza UV i H₂O₂ dolazi do postepenog smanjenja preživljavanja, što se uočava nakon iskapavanja dilucija na podlogu, odmah nakon tretmana (levi paneli na **Slici 4b**). Dodatni period inkubacije tretirane suspenzije ćelija u vodi (ili fosfatnom puferu), na 30°C i uz kontinuirano mešanje, dovodi do porasta vijabilnosti populacije (desni paneli na **Slici 4b**). Kako nisu uočene razlike između inkubacije u vodi i razblaženom fosfatnom puferu, prikazan je samo oporavak ćelija nakon inkubacije u vodi. Brzina i nivo oporavka zavisi od primenjene doze i uočava se da nakon delovanja UV zračenja većeg od 360 J/m² oporavak ne dovodi do reskonstitucije početnog broja vijabilnih ćelija nakon 72 h. Oporavak nakon delovanja H₂O₂ je nešto brži i dovodi do potpunog oporavka populacije. Nakon primene većih doza (600 J/m² UV i 0,6 % H₂O₂), ne dolazi do oporavka populacije.

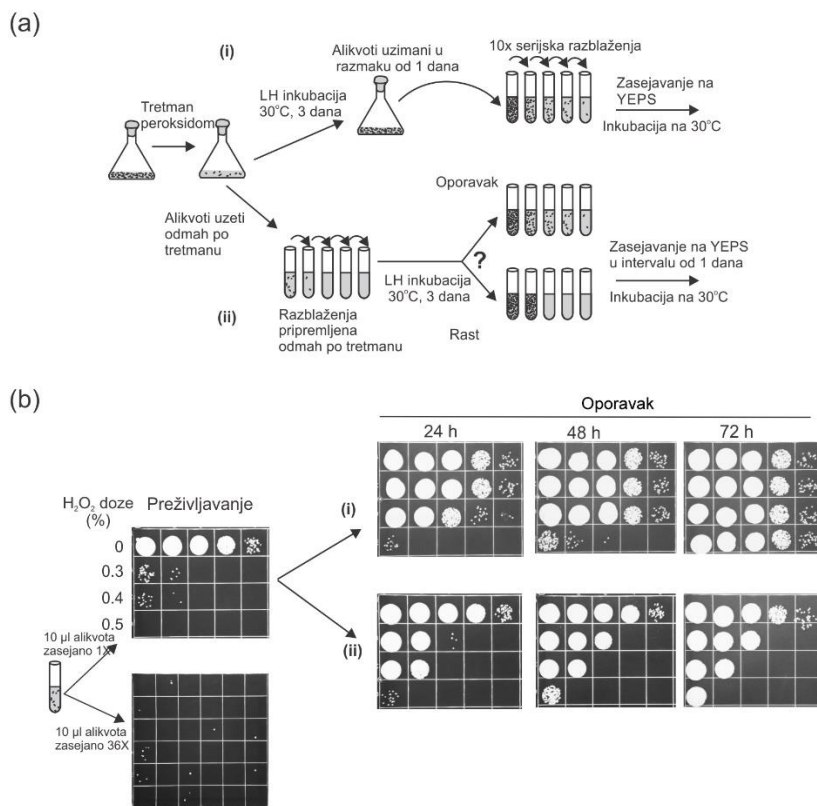


Slika 4 - LH restitucija vijabilnosti *U. maydis*. U eksperimentu su korišćene ćelije divljeg soja, UCM520, gajene do stacionarne faze, oprane i resuspendovane u vodi (2×10^7 /mL). (a) Šematski prikaz postavke eksperimenta. (b) UV-ozračene ili ćelije tretirane sa $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{3+}$ -EDTA (tretman peroksidom) su odmah po tretmanu zasejane na podlogu radi određivanja preživljavanja (paneli levo), ili su inkubirane u vodi tokom naznačenog vremena pre zasejavanja na podlogu (paneli desno).

4.2 Mehanizam porasta brojnosti vijabilnih ćelija u uslovima gladovanja nakon izlaganja oksidativnom stresu

Posle ovih prvih saznanja, zanimalo nas je koji mehanizam stoji iza uočene rekonstitucije vijabilnosti populacije, tj. da li je ona efekat unutarćelijske popravke oštećenih molekula ili rezultat rasta i deobe preživelih ćelija. Kako smo prethodno uočili da se nakon tretmana vodonik-peroksidom brže postiže porast vijabilnosti nego nakon jednako letalnih doza UV-a, dalja istraživanja su bila usmerena na praćenje oporavka od oksidativnih oštećenja izazvanih peroksidom. Pored toga, oksidativni stres je u osnovi i abiotičkih i biotičkih kompleksnih stresova, te nam je on bio od većeg značaja. Dizajniran je eksperiment (**Slika 5a**) u kome je sa periodičnim praćenjem vijabilnosti tretirane suspenzije ćelija (aliquoti zasejavani na podloge nakon 24, 48, 72 sata), paralelno praćena i vijabilnost ćelija iz serijskih razblaženja koja su pripremljena odmah/neposredno posle tretmana i inkubirana u identičnim uslovima i zasejavana u istim vremenskim intervalima. Dakle, u slučaju da se porast vijabilnosti ostvaruje kroz unutarćelijsku popravku oštećenja (pravi oporavak), očekivano bi bilo da porast frakcije vijabilnih ćelija bude podudarno prisutan u oba seta serijskih razblaženja. Sa druge strane, ukoliko je porast vijabilnosti posledica umnožavanja preživelih ćelija, onda bi se u serijskim razblaženjima pripremljenim odmah po tretmanu rast uočio samo u onim dilucionim tubama koje su u trenutku distribucije sadržavale vijabilne ćelije. Dakle, da bismo ispitali mehanizam koji leži u osnovi porasta vijabilnosti, ćelije *U. maydis* su tretirane dozom H_2O_2 pri kojoj je preživljavanje 0,01% ili niže i suspenzije su distribuirane na gore opisan način. Na **Slici 5b** se vidi da porast broja vijabilnih ćelija nije podjednako prisutan u oba seta serijskih razblaženja ((i) i (ii)). Set dilucija koji je pripremljen odmah po tretmanu i inkubiran na 30°C pre zasejavanja na podlogu, ne beleži porast vijabilnosti u svim tubama, nego samo u onim za koje bi se procenilo/preračunalo (na osnovu preživljavanja) da sadrže preživele ćelije u momentu distribucije (**Slika 5b, ii**). Nejednaka distribucija ćelija je

potvrđena i iskapavanjem na podlogu alikvota suspenzije tretirane 0,5% peroksidom, gde se uočava da većina alikvota ne sadrži žive ćelije (**Slika 5b**, donji panel). Ovaj rezultat ukazuje na to da je porast vijabilnosti koji uočavamo tokom LH posledica rasta i proliferacije preživelih ćelija, verovatno, putem usvajanja unutarćelijskih jedinjenja oslobođenih iz oštećenih i umrlih ćelija.



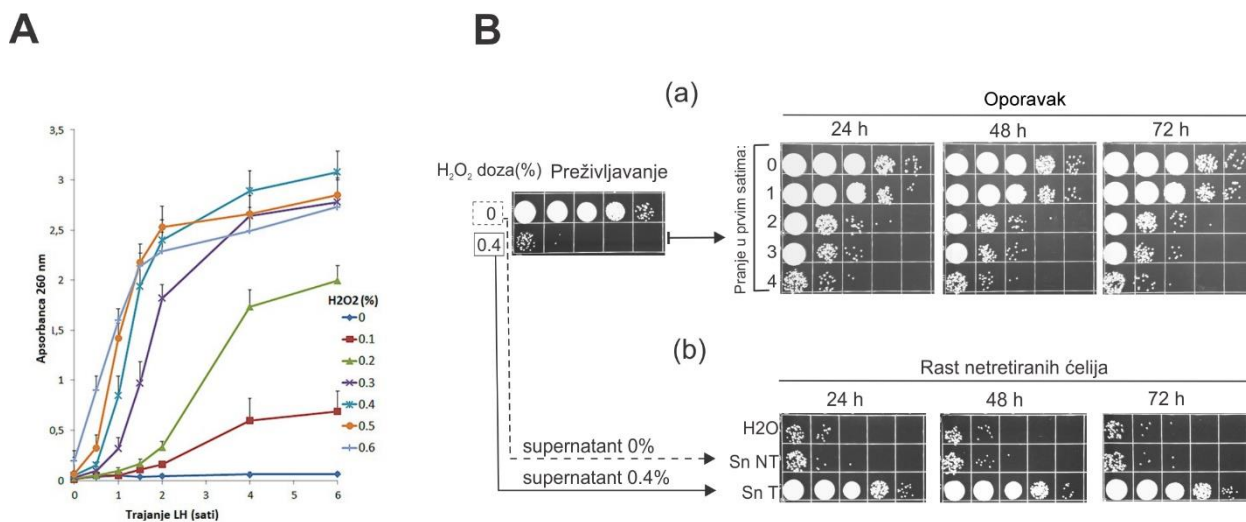
Slika 5 - Mehanizam porasta vijabilnosti ćelija u uslovima gladovanja nakon izlaganja oksidativnom stresu (a) Šematski prikaz postavke eksperimenta. (b) Čelije tretirane peroksidom su odmah po tretmanu zasejane na podlogu radi merenja preživljavanja. Porast ćelijske vijabilnosti je praćen na svaka 24 h (i) u originalnoj suspenziji tretiranih ćelija, koja je inkubirana na 30°C, uz kontinuirano mešanje, pre pravljenja serijskih razblaženja i zasejavanja na podlogu i (ii) u 10 x serijskim razblaženjima koja su inkubirana pod istim uslovima.

4.3 Ispitivanje ćelijske proliferacije u uslovima gladovanja

4.3.1 Ispitivanje kinetike oslobađanja unutarćelijskog materijala iz ćelija oštećenih oksidacijom

Kako se porast vijabilnosti u populaciji tretiranih ćelija ostvaruje putem umnožavanja preživele subpopulacije ćelija, i to bez suplementacije nutrijentima, pretpostavljeno je da su nutrijenti neophodni za rast i umožavanje preživelih ćelija potekli od liziranih ćelija. Da bi se istražila biološka dostupnost endogenih metabolita, prvo je ispitano oslobađanje unutarćelijskog materijala iz ćelija oštećenih oksidativnim stresom u okolni medijum. Čelije UCM520 su tretirane rastućim dozama vodonik-peroksida (0-0,6%), a kao pokazatelj curenja unutarćelijskih jedinjenja je merena apsorbanca supernatata na 260 nm, koja odražava ukupni nukleotidni sadržaj (nukleozidi, nukleotidi i drugi derivati nukleinskih kiselina). Vremenski tok curenja biomolekula iz ćelija tretiranih peroksidom i iz netretiranih ćelija je grafički prikazan na **Slici 6A**. Sa grafika se jasno vidi da tretman peroksidom indukuje oslobađanje nukleotidnog materijala u okolni medijum. U netretiranoj kontroli gotovo da nema curenja ili je ono minimalno. Međutim, curenje raste sa tretmanom peroksidom i zavisno je od doze: porast doze prati povećanje brzine (nagib krive) i ukupne količine oslobođenog materijala. Pri većim dozama peroksida (0,3-0,6%), curenje je bilo

veoma brzo u prva dva sata, kada je dostiglo plato. Dakle, razložno je pretpostaviti da curenje unutarćelijskih jedinjenja, indukovano pri tretmanu peroksidom, može obezbediti količinu dostupnih nutrijenata dovoljnu za ponovno uspostavljanje brojnosti populacije desetkovane jakim oksidativnim stresom.



Slika 6 - (A) Oslobođanje nukleotidnog sadržaja iz ćelija tretiranih H₂O₂. 2x10⁷ ćelija divljeg soja je tretirano naznačenim dozama peroksida, oprano i inkubirano u vodi tokom 6 h. Periodično su uzimani alikvoti ćelijske suspenzije, centrifugirani, filtrirani od ćelija, i ovakvi supernatanti su korišćeni za merenje apsorbance na 260 nm. Vertikalne linije pokazuju standardnu devijaciju tri nezavisna eksperimenta. **(Ba)** Ćelije tretirane peroksidom su oprane na svakih 15 min u periodiu od 0-4 h nakon tretmana, a zatim su inkubirane u vodi do trenutka zasejavanja na podlogu (24 h, 48 h, 72 h). **(b)** 8x10³/mL netretiranih, genicinin-rezistentnih ćelija je inkubirano u H₂O, supernatantu netretiranih ćelija (Sn NT) i supernatantu dobijenom od suspenzije ćelija tretiranih 0,4% H₂O₂, pa inkubiranih u vodi 4 h na 30°C (Sn T). Alikvoti su zasejani na YEPS medijum koji sadrži genicinin 100 µg/mL

4.3.2 Ispitivanje sposobnosti ćelija da koriste biomolekule oslobođene iz umrlih ćelija (sposobnosti proliferacije)

Da bismo pokazali da brojnost vijabilnih ćelija zaista raste na račun biomolekula oslobođenih iz umrlih ćelija, postavili smo dva eksperimenta koja direktno ukazuju na sposobnost ćelija da te biomolekule iskoriste. Prvi eksperiment se zasniva na ideji da, ukoliko ćelije zaista recikliraju biomolekule radi obnove populacije, onda bi odstranjivanje iscurelog materijala (periodičnim pranjem ćelija) trebalo da redukuje umnožavanje ćelija tokom LH inkubacije. Ovaj eksperiment je pokazao da je povećanje udela vijabilnih ćelija značajno smanjeno, ukoliko su tretirane ćelije periodično, tokom prva četiri sata od tretmana peroksidom, prane i iznova resuspendovane u destilovanoj vodi (**Slika 6Ba**). Drugi, recipročan eksperiment je trebao da ispita da li je količina oslobođenog ćelijskog materijala dovoljna da podrži tako robustan rast kakav vidimo nakon oporavka populacije u LH uslovima? Da bi se ovo ispitalo, fiksni broj (8x10³/mL) netretiranih ćelija je zasejan u filtrirane supernatante (SN), dobijene od 4 sata inkubiranih suspenzija netretiranih i ćelija tretiranih sa 0,4% H₂O₂. Za kontrolu eksperimenta je isti broj ćelija zasejan u destilovanoj vodi. Kao što se vidi na **Slici 6Bb**, supernatant dobijen od tretirane ćelijske suspenzije je sadržavao dovoljnu količinu nutrijenata da podrži rast netretiranih ćelija do nivoa koji postižu i tretirane ćelije (uporediti **Slike 6Bb i 6Ba**). U poređenju sa kontrolom, rast u supernatantu poreklom od netretiranih ćelija je neznačajan. Na osnovu ovih rezultata, zaključujemo da je tretman nepohodan kako bi se obezbedili nutrijenti neophodni i dovoljni za rast preživelih ćelija. Imajući u vidu da je UCM520 auktrotrof za metionin, rezultati pokazuju da je lizat tretiranih ćelija dovoljan izvor metionina za ovaj soj, a takođe su i potvrda da ćelije *U. maydis* zaista mogu da koriste unutarćelijski sadržaj oslobođen iz mrtvih ćelija kao izvor nutrijenata za ćelijsku proliferaciju. Kako

bi se ispitala mogućnost da je metionin ograničavajući faktor za postizanje maksimalnog rasta UCM520, pod istim uslovima je ispitan i prototrof R521, ali nije uočena razlika u proliferaciji (rezultati nisu prikazani).

Na osnovu ovih rezultata, zaključak je da se porast vijabilnosti ćelija koje su, nakon velikih oštećenja pretrpljenih u tretmanu, inkubirane u vodi duži period pre zasejavanja na podlogu, ostvaruje umnožavanjem preživelih ćelija na račun unutarćelijskih jedinjenja oslobođenih iz umrlih ćelija. Imajući u vidu posledice tretmana: curenje unutarćelijskih jedinjenja i njima podržan rast populacije, ovaj fenomen bi se mogao nazvati „repopulacija u uslovima gladovanja”, što se odnosi na specifične uslove rasta bez spoljašnje suplementacije nutrijentima. Radi jednostavnosti koristiće se akronim „RUS” (engl. „Repopulation Under Starvation”) i termin „recikliranje” koji se ovde odnosi na sam proces efikasnog iskorišćavanja nutrijenata iz umrlih ćelija.

4.3.3 Ispitivanje efekta supstrata oslobođenog iz ćelija tretiranih vodonik-peroksidom na proliferaciju svežih ćelija

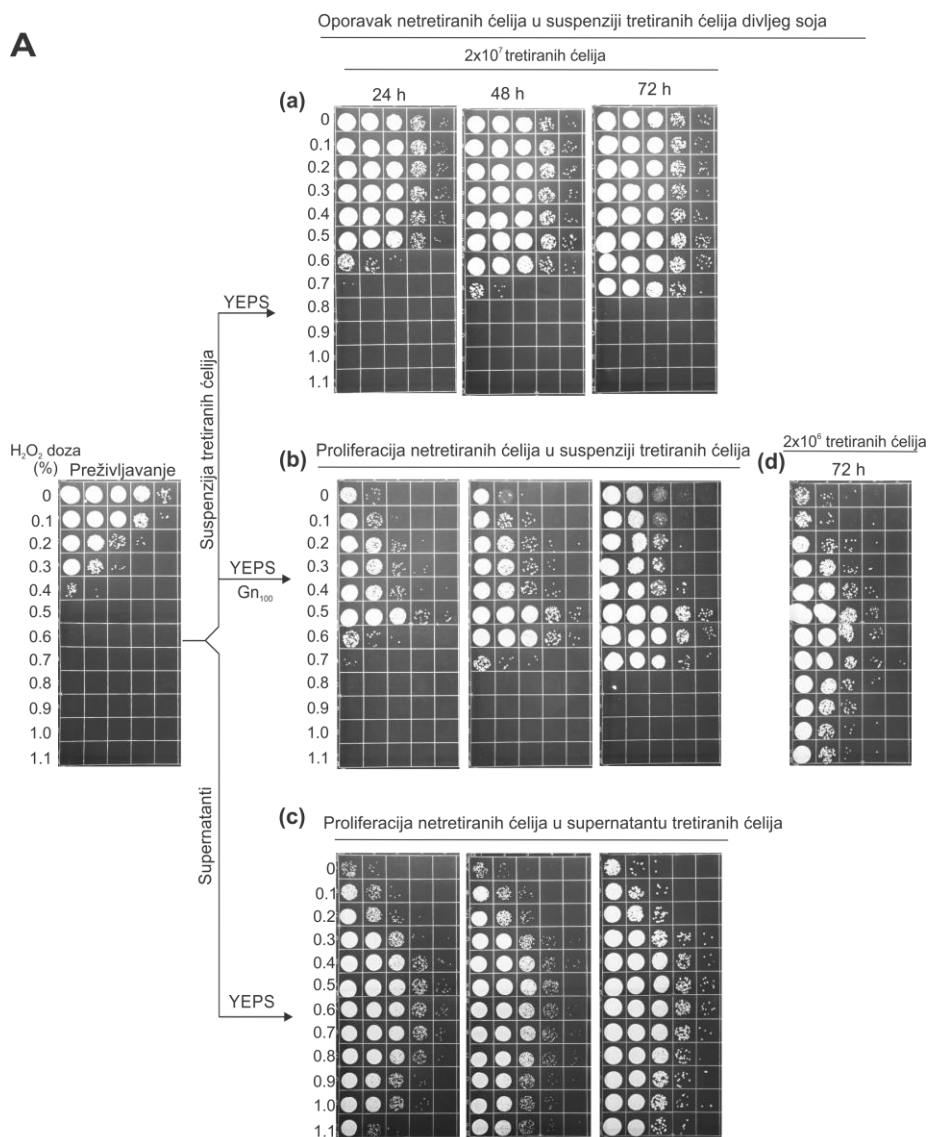
Da bi se ispitao efekat supstrata oslobođenog iz ćelija tretiranih peroksidom na proliferaciju ćelija, praćena je vijabilnost netretiranih, svežih ćelija paralelno u tretiranoj ćelijskoj suspenziji i u supernatantu poreklom od ćelija tretiranih rastućim dozama (0-1,1% H₂O₂) peroksida (**Slika 7A**). Fiksni broj svežih, genocin-rezistentnih ćelija (8×10^3 /mL) je zasejan u ove supstrate, a potom inkubiran 24, 48 i 72 sata (**opis u 3.4.8.3**). Kako bi se nedvosmisleno pratio rast netretiranih ćelija, koje su u tretiranoj ćelijskoj suspenziji u kompeticiji sa ćelijama preživelim tretman, ćelije su po inkubaciji zasejane na YEPS podloge i YEPS podloge koje sadrže genocin.

Tokom prvih 24 sata inkubacije, rast u suspenzijama kao i u supernatantima je proporcionalan sve do doze peroksida od 0,5%, kada dolazi do naglog (u suspenziji- **Slika 7Ab**) ili postepenog (u supernatantu- **Slika 7Ac**) pada, što ukazuje na produkciju i oslobađanje jedinjenja koja ometaju proliferaciju. Ovo smanjenje rasta ćelijske kulture se prevazilazi nakon 72 sata inkubacije u suspenzijama tretiranim sa 0,6 i 0,7% peroksidom. U suspenzijama tretiranim dozama većim od 0,7% H₂O₂ ne samo da nema umnožavanja, nego čak dolazi i do smrti inokuliranih ćelija.

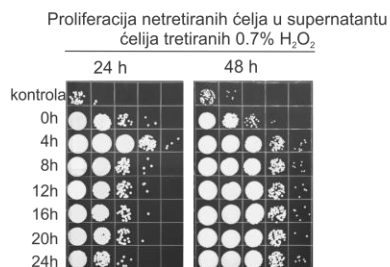
U supernatantima dobijenim iz tretmana visokim dozama peroksida (višim od 0,7%), gustina ćelija progresivno raste sa vremenom inkubacije, nakon inicijalnog pada broja svežih ćelija posle 24 h (**Slika 7A**). Stoga bi se manji broj vijabilnih ćelija u ovim supernatantima inkubiranim 24 sata mogao pripisati povećanom nivou toksičnih molekula i neophodnom vremenu da se ova toksičnost nadvlada. Dalje se uočava da je koncentracija genocin-rezistentnih ćelija u suspenzijama tretiranim sa 0,3% i 0,4% H₂O₂ primetno manja u poređenju sa njihovom koncentracijom u odgovarajućim supernatantima, što ukazuje na verovatnu kompeticiju za nutrijente između svežih i ćelija koje su preživele tretman. Međutim, u suspenzijama tretiranim 0,8%-1,1% nema ove kompeticije za nutrijente, s obzirom da nema ćelija koje su preživele tretman. Ipak, za razliku od njihove ekspanzije u odgovarajućim supernatantima, netretirane ćelije ne mogu da proliferišu u ovim suspenzijama, što bi se moglo objasniti oslobađanjem inhibitornog/inhibitornih jedinjenja u kasnijim fazama dekompozicije umirućih ćelija. Da bi se ispitala ova mogućnost, UCM520 je tretiran 0,7% H₂O₂ i suspenzija je inkubirana 24h u LH uslovima, tokom kojih su na svaka 4 sata uzimani alikvoti za pripremu supernatanta. Ovi supernatanti su inokulisani svežim ćelijama i inkubirani 48 sati. Rezultat ovog eksperimenta je prikazan na **Slici 7B**. Prvi panel prikazuje rast u supernatantima nakon 24 sata inkubacije, gde se u supernatantu pripremljenom 8 sati nakon tretmana vidi pad koncentracije ćelija od 10 puta u poređenju sa onim dobijenim u supernatantu napravljenom 4 sata posle tretmana. Takođe se uočava da je u supernatantima pripremljenim nakon prolongirane inkubacije (više od 8 sati) dalji pad rasta slabije izražen, tako da je u supernatantu od 24. sata koncentracija ćelija 50 puta niža nego u supernatantu od 4. sata. Na drugom panelu, se vidi

da nakon 48 sati inkubacije dolazi do rasta gustine ćelija u svim supernatantima uzetim posle 8. sata i njihovog ujednačavanja sa onim pripremljenim nakon 4. sata. Ovo ukazuje da pad nakon 24. sata inkubacije (prvi panel) nije posledica smanjene dostupnosti nutrijenata, nego efekat akumulacije inhibitornih molekula oslobođenih tokom progresivne degradacije ćelijskih komponenti. Bitno je uočiti i da toksičnost supernatanta iz kasnih sati inkubacije nije postigla tako velik inhibični efekat kao ćelijska suspenzija, što sugerise da su same tretirane ćelije (prisutne samo u suspenzijama) značajni nosioci toksičnosti ovog medijuma. Priroda ovog procesa, kao i sama priroda inhibitornih jedinjenja zahtevaju dodatna istraživanja.

A



B



Slika 7 - Uticaj suspenzije i supernatanta tretiranih ćelija na rast. **(A)** Za testiranje efekta suspenzije tretiranih ćelija, suspenzija 2×10^7 **(a,b)** ili 2×10^6 ćelija divljeg soja/mL **(d)**, tretiranih naznačenim dozama peroksida je inokulisana sa 8×10^3 /mL svežih, genecicin-rezistentnih ćelija i inkubirana 3 dana u vodi, na 30°C , uz aeraciju, pre zasejavanja njihovih razblaženja na YEPS podlogu **(a)** ili YEPS medijum koji sadrži genecicin ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) **(b, d)** Preživljavanje tretiranih ćelija je prikazano na levom panelu. **(c)** supernatant dobijen od 2×10^7 tretiranih ćelija je inokulisan sa 8×10^3

/mL netretiranih, genetiĉin-rezistentnih ćelija, inkubiran kao Ńto je opisano i zasejan na podlogu. (B) Rast netretiranih ćelija ($8 \times 10^3/\text{mL}$) u supernatantu ćelija divljeg soja tretiranih 0,7% H_2O_2 . Alikvoti supernatanta su uzimani u intervalima od 4 h, tokom 24 h inkubacije u vodi.

4.3.4 Ispitivanje uticaja odnosa tretiranih i netretiranih ćelija na efikasnost ćelijske reprodukcije

Kako je uoĉeno da u suspenziji tretiranoj većim dozama od 0,7% H_2O_2 dolazi do smrti netretiranih ćelija i da toksiĉnost ovog medijuma u znaĉajnoj meri potiče od samih ćelija iz tretirane suspenzije, postavljen je eksperiment koji je imao za cilj da se ispita kako promena odnosa tretiranih i netretiranih ćelija utiče na efikasnost reprodukcije. Na **Slici 7Ad** se vidi da ukoliko se tretirana suspenzija ćelija 10 puta razblaži, negativan efekat suspenzije na rast se delimiĉno nadvladava posle 72 sata inkubacije. Ovaj rezultat ukazuje da je za efikasnu ćelijsku reprodukciju u odreĉenoj suspenziji tretiranih ćelija vaŃan odnos tretiranih i netretiranih ćelija.

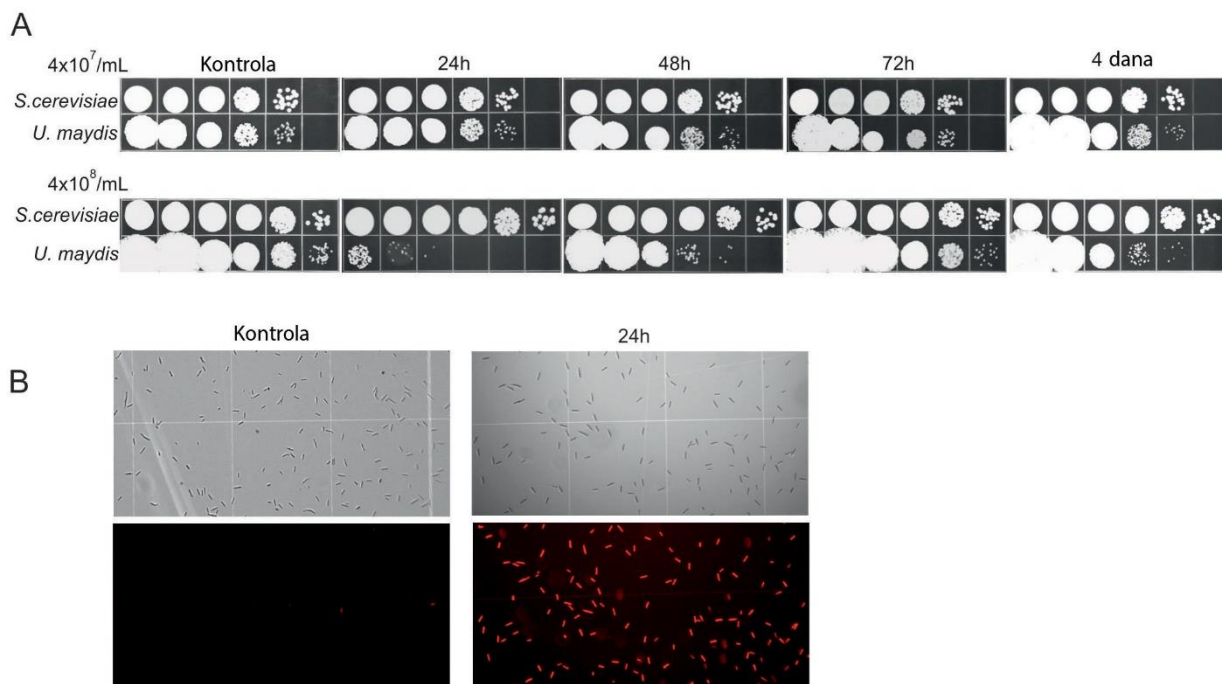
Sumirano, ovi eksperimenti pokazuju da unutarćelijska jedinjenja osloboĉena usled tretmana peroksidom predstavljaju susstrate sa razliĉitim, ĉak i suprotnim bioloŃkim efektom. ViŃa doza peroksida, kao i duŃe vreme inkubacije tretiranih suspenzija, povećavaju toksiĉnost medijuma. Sa druge strane, toksiĉnost osloboĉenih materija moŃe da se prevaziĉe povećanjem odnosa netretiranih i tretiranih ćelija ili produŃavanjem vremena inkubacije. Degradacija ćelijskih komponenti indukovana tretmanom predstavlja novu temu za istraŃivanja, ali u ovom radu interesovanje je usmereno na pitanje kako *U. maydis* reciklira osloboĉene biomolekule tokom repopulacije u LH uslovima. Tako bi primarni interes u nastavku rada bio da se istraŃi koji su to ćelijski faktori ukljuĉeni u ovaj proces. Meĉutim, eksperimenti ĉiji opis neposredno sledi govore najpre o fenomenu koji je relativno povezan s procesima ĉiji su bitni aspekti do sada izloŃeni. Naime, istraŃivanja koja su izvedena u cilju utvrĉivanja uticaja razliĉitih faktora (koncentracije neorganskih soli, pufera, gustine suspenzija ćelija) na efikasnost repopulacije ukazala su na potencijalnu povezanost izmeĉu gustine ćelijske suspenzije i gubitka vijabilnosti tokom LH-inkubacije.

4.4 Gubitak vijabilnosti u populaciji ćelija *U. maydis* zavisn od gustine

Tokom rada na *U. maydis*, brojna praćenja rasta u bogatom medijumu su pokazala da kultura ćelija ove bazidiomicete dostiŃe gustinu od pribliŃno $4 \times 10^8/\text{mL}$ nakon prekonoećne inkubacije i ispoljava neznatan pad vijabilnosti posle nekoliko dana inkubacije na 4°C . Prilikom pripreme ćelija za testiranje RUS-a ili za tretman genotoksiĉnim agensima, sveŃe prekonoećne kulture se rutinski peru u vodi i resuspenduju tako da koncentracija ćelija bude oko $2-4 \times 10^7/\text{mL}$. Ono Ńto je primećeno je da gotovo nema pada vijabilnosti, ukoliko se 1 mL ovakve suspenzije inkubira u tubama od 1,5 mL na 30°C tokom 4 dana. Stoga je bilo iznenaĉujuće kada je uoĉeno da, kada se oprane ćelije resuspenduju tako da gustina bude kao u originalnoj prekonoećnoj kulturi (tj. $\sim 4 \times 10^8/\text{mL}$) i inkubiraju u istim uslovima (vodi), one podleŃu masovnoj smrti u toku jednog dana, nakon ĉega sledi oporavak populacije (**Slika 8A**). Sasvim suprotno, *S. cerevisiae* nije pokazao pad vijabilnosti pod istim uslovima ni posle 4 dana (**Slika 8A**). Zapravo, kod *S. cerevisiae* nisu uoĉeni znaci umiranja ćelija ĉak ni kada su ćelije inkubirane pri gustini od $4 \times 10^9/\text{mL}$ (rezultati nisu prikazani).

Imajući u vidu da su prethodni rezultati zasnovani na proceni vijabilnosti/preŃivljavanja ćelija preko CFU (engl. „Colony Forming Units”), odnosno, preko njihove sposobnosti reprodukcije, postojala je mogućnost da su ćelije nakon inkubacije od 24 sata u velikoj gustini ipak vijabilne. U tom sluĉaju, njihova sposobnost da formiraju kolonije bi mogla biti inhibirana rapidnim ulaskom u neku vrstu dormancije, stanja zasutavljanog rasta. Kako bi se proverila ova mogućnost, ispitana je vijabilnost ćelija u vodi pre i nakon 24 sata inkubacije, pomoću bojenja propidijum jodidom (PI), koji ulazi u ćelije sa naruŃenim integritetom ćelijske membrane, tj. boji mrtve ćelije (**Slika 8B**). Dakle, za razliku od kontrolnih uzoraka, u suspenzijama koje su inkubirane 24 sata, gotovo su sve

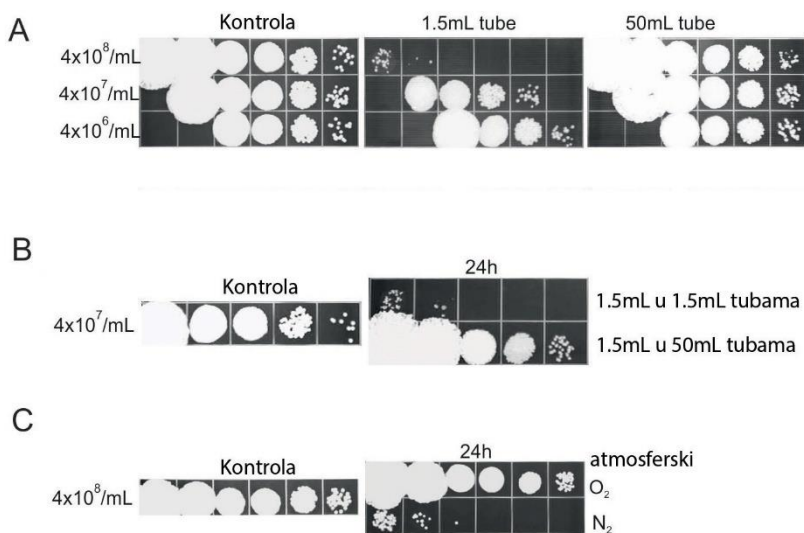
ćelije bile pozitivne na bojenje PI-om, što potvrđuje da su ove ćelije zaista lizirane. Stoga se može zaključiti da, za razliku od *S. cerevisiae*, *U. maydis* pokazuje neku vrstu „efekta gustine“, koji za posledicu ima pad vijabilnosti za 5 redova veličine. Postavlja se pitanje da li *U. maydis* pri velikoj gustini proizvodi i šalje suicidalni signal koji posreduje katastrofalnom padu vijabilnosti populacije?



Slika 8 - Vijabilnost ćelija *S. cerevisiae* i *U. maydis* nakon inkubacije u vodi. (A) 1 mL suspenzije ćelija u vodi, gustine od 4×10^7 /mL (gornji panel) i 4×10^8 /mL (donji panel) su inkubirane u 1,5 mL tubama 4 dana. Na svaka 24 h su uzimani alikvoti za pripremu 10 x serijskih razblaženja, i zasejani na hranljivu podlogu. (B) Mikrografije bojenja propidijum jodidom (PI) slikane svetlosnim i fluorescentnim mikroskopom. Rana stacionarna faza ćelija inkubiranih u vodi (4×10^8 /mL) obojena PI pre (Kontrola, leva mikrografija) i posle 24 h inkubacije (desna mikrografija) u cilju detekcije oštećenih/mrtvih ćelija.

U nastavku istraživanja je planirano da se testira ova mogućnost. Međutim, pre nego što se krenulo u tom smeru, uočeno je da je za uspostavljanje odgovarajuće metodološke strategije, najpre potrebno precizno ustanoviti kinetiku umiranja ćelija *U. maydis* tokom inkubacije u vodi. U tu svrhu, inkubirana je suspenzija *U. maydis* ćelija (4×10^8 /mL) pod istim, gore opisanim, uslovima i testirana je vijabilnost uzimanjem alikvota na svaka 4 sata tokom 24 sata inkubacije. Zanimljivo, gubitak vijabilnosti nije uočen ni u jednoj vremenskoj tački tokom trajanja eksperimenta (rezultati nisu prikazani). Jasno je bilo da je kratak period izlaganja atmosferskom vazduhu, u vremenskim tačkama uzimanja alikvota, bio dovoljan da se potpuno spreči indukcija mortaliteta. Sa ovim zapažanjem je odbačena mogućnost da je drastični gubitak vijabilnosti, posle inkubacije od 24 sata, na neki način indukovano visokom gustinom ćelija u suspenziji. Drugim rečima, izlaganje atmosferskom kiseoniku (na svaka 4 sata) je bilo dovoljno da se održi vijabilnost u suspenziji visoke gustine. Stoga je izveden zaključak da je ključni faktor u održavanju vijabilnosti dostupnost dovoljne količine kiseonika, odnosno, adekvatan odnos broja ćelija u suspenziji i količine dostupnog kiseonika. Dobijeno je još nekoliko eksperimentalnih rezultata koji idu u prilog ovoj tezi. Prvo, pad vijabilnosti nije uočen kada je 1 mL suspenzije visoke gustine (4×10^8 /mL) inkubiran u tubi od 50 mL (Slika 9A). U recipročnom eksperimentu, 1,5 mL suspenzije manje gustine (4×10^7 /mL) inkubiran je u tubi od 1,5 mL što je dovelo do drastičnog pada vijabilnosti (Slika 9B). Konačni dokaz je dobijen kada je atmosferski kiseonik u tubi od 50 mL, u kojoj je inkubiran 1 mL suspenzije visoke gustine (4×10^8 /mL), zamenjen sa N_2 , što je za posledicu imalo pad vijabilnosti

nakon jednog dana inkubacije (**Slika 9C**). Ovaj eksperiment je potvrda da je kiseonik limitirajući element iz vazduha, odgovoran za održavanje/pad vijabilnosti tokom inkubacije populacije *U. maydis* u vodi. Dakle, sama gustina ćelija ne može da se dovede u direktnu vezu sa indukovanjem mortaliteta, već je nedostatak kiseonika uzrok masovnog umiranja.



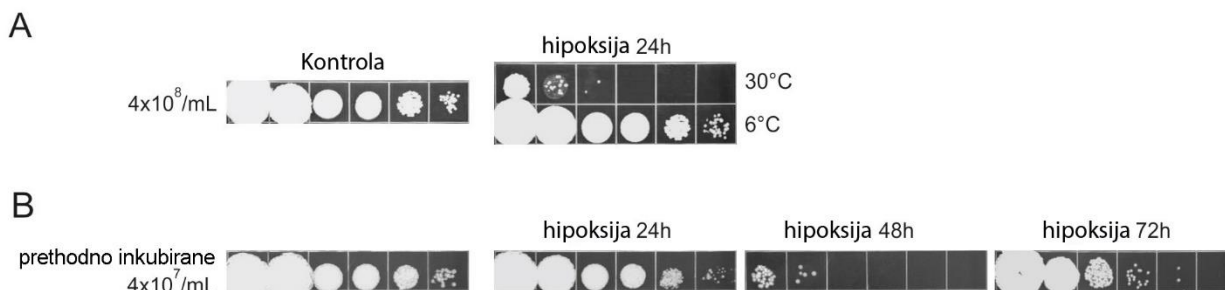
Slika 9 - Uticaj gustine ćelija i dostupnog kiseonika na vijabilnost ćelija *U. maydis* (A) po 1 mL ćelijske suspenzije *U. maydis* (4×10^8 /mL, 4×10^7 /mL i 4×10^6 /mL) je inkubiran u vodi u tubama od 1,5 mL i 50 mL tokom 24 h. 10 x serijska razblaženja su zasejana na čvrst hranljivi medijum. (B) po 1,5 mL ćelijske suspenzije *U. maydis* (4×10^7 /mL) je inkubiran u vodi u tubama od 1,5 mL i 50 mL tokom 24 h (C) po 1 mL ćelijske suspenzije *U. maydis* gustine 4×10^8 /mL je inkubiran u vodi u tubama od 50 mL tokom 24 h, pod atmosferskom aeracijom (O₂) ili pod N₂. 10 x serijska razblaženja su zasejana na čvrst hranljivi medijum. Paneli sa leve strane prikazuju početni broj ćelija u suspenziji (Kontrola).

4.5 Metabolička aktivnost ćelija *U. maydis* tokom inkubacije u vodi

Svi eksperimenti opisani u prethodnom poglavlju podržavaju hipotezu da je osnovni uslov za efikasno preživljavanje tokom inkubacije *U. maydis* ćelija u vodi dostupnost dovoljne količine kiseonika. Takođe, uočeno je da je periodična aeracija ćelijske suspenzije visoke gustine dovoljna da spreči pad vijabilnosti, što bi se moglo uzeti kao snažna indikacija da su ćelije metabolički aktivne u vodi i da respiracijom smanjuju početnu količinu kiseonika, što dovodi do ćelijske smrti. Za testiranje ove hipoteze, postavljena su dva eksperimenta sa ciljem da se ispita da li usporavanje ćelijskog metabolizma može da odloži pad vijabilnosti. U prvom eksperimentu, usporavanje ćelijskog metabolizma je postignuto inkubacijom ćelija na niskoj temperaturi (**Slika 10A**). Zaista, smanjenje ćelijskog metabolizma inkubacijom ćelijske suspenzije visoke gustine na 6°C nije dovelo do pada vijabilnosti, uprkos ograničenoj količini dostupnog kiseonika. Dalje, jedini izvor nutrijenata za ćelije koje se inkubiraju u čistoj vodi mogu biti samo sopstevne organske rezerve. Stoga je ideja sledećeg eksperimenta bila da se ćelije najpre nutritivno iscrpe kroz obavljanje metaboličkih aktivnosti (inkubiranjem u vodi uz aeraciju), a potom tako osiromašene inkubiraju u uslovima ograničenog kiseonika. Pretpostavka je bila, da prethodno inkubirane ćelije imaju, usled iscrpljenih rezervi, smanjenu metaboličku aktivnost, te bi njihovo preživljavanje u uslovima bez kiseonika bilo produženo, za razliku od situacije kada su ćelije direktno iz stacionarne faze prebačene u vodu i uslove limitiranog kiseonika. Rezultati ovog eksperimenta prikazani su na **Slici 10B**. Kao što je očekivano, kada su ćelije inkubirane u vodi (4×10^7 /mL) 24 sata uz intenzivnu aeraciju, a potom ukoncentrisane do gustine od 4×10^8 /mL i naknadno inkubirane pod uslovima limitiranog kiseonika, došlo je do povećanog preživljavanja. Međutim, u naredna 24 sata (hipoksija

48 h) došlo je ipak do pada vijabilnosti, što ukazuje da iscrpljivanje rezervi nutrijenata može samo kratkotrajno da odloži ćelijsku smrt, ali ne i da je potpuno spreči.

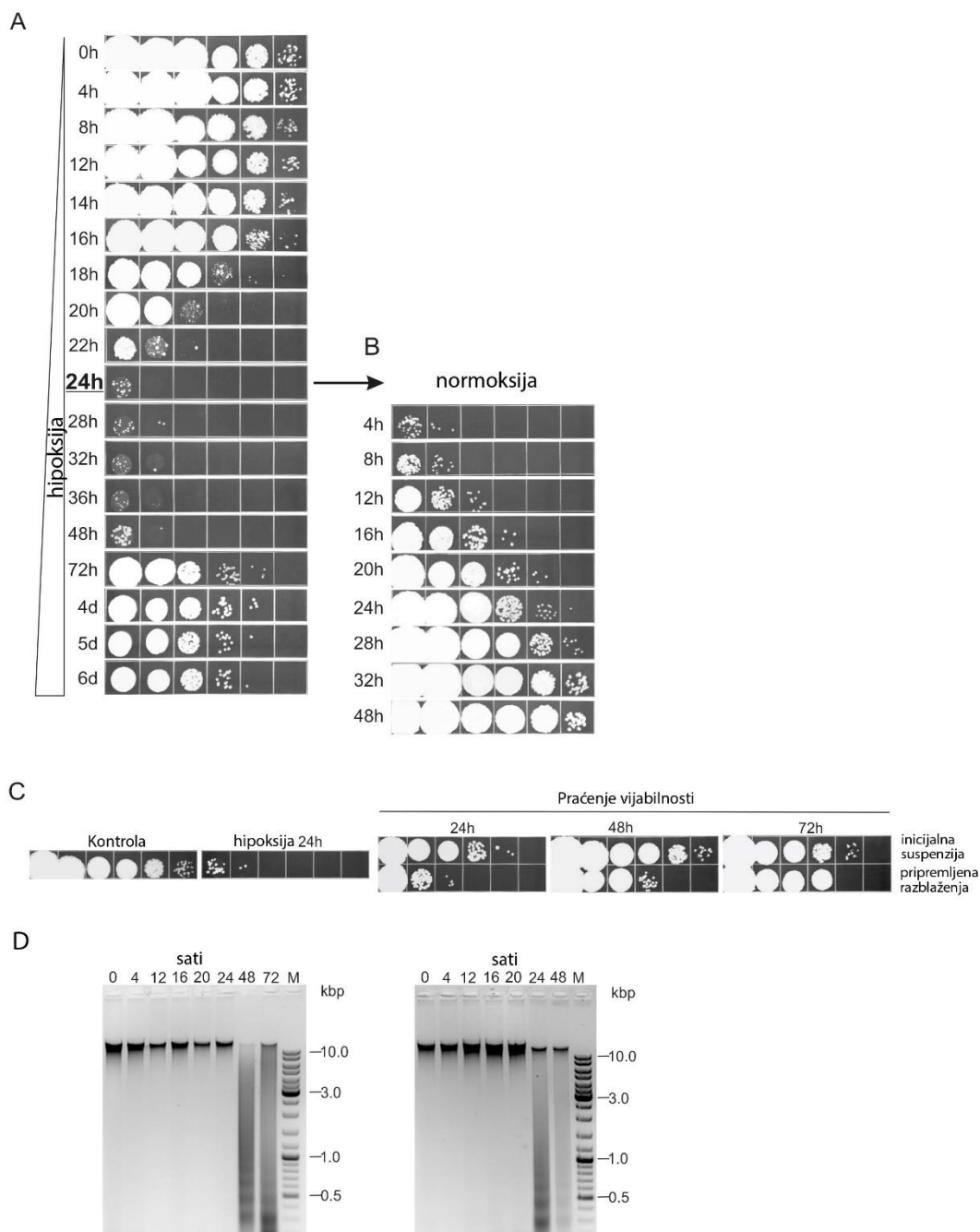
Sveukupno, rezultati pokazuju da je tokom inkubacije u vodi, ćelijama *U. maydis* kiseonik neophodan za efikasno održavanje vijabilnosti. U uslovima limitiranog kiseonika, uočeni pad populacije nastaje kao posledica autogenerišuće hipoksije (engl. „Self-generated Hypoxy”, SH) izazvane ćelijskim metabolizmom.



Slika 10 - Metabolička aktivnost utiče na preživljavanje ćelija u uslovima limitiranog kiseonika. **(A)** 1 mL ćelijske suspenzije gustine 4×10^8 /mL je inkubiran u vodi u tubama od 1,5 mL na 6°C i 30°C tokom 24 h. 10 x serijska razblaženja su zasejana na čvrstu podlogu. **(B)** Stacionarna ćelijska kultura oprana i podešena na gustinu od 4×10^7 /mL je inkubirana 24 h, a potom ukoncentrisana na gustinu 4×10^8 /mL. Po 1 mL ove suspenzije je alikvotiran u tri tube od 1,5 mL i dalje je inkubiran u uslovima ograničene aeracije 24, 48 i 72 h. U ovim vremenskim tačkama su iz pojedinačnih tuba pripremana razblaženja i zasejana na čvrstu podlogu.

4.6 Vremenska kinetika preživljavanja ćelija *U. maydis* inkubiranih u vodi u uslovima ograničene količine kiseonika

Imajući u vidu rezultate koji pokazuju da je smanjenje vijabilnosti kod ćelija *U. maydis* inkubiranih u vodi uzrokovano autogenerisanom hipoksijom, ukazala se potreba za detaljnijim ispitivanjem kinetike preživljavanja. Međutim, kako se autogenerisana hipoksija razvija postepeno tokom inkubacije i uspostavlja samo ukoliko je kiseonik početno ograničen, javio se problem eksperimentalnog dizajna koji bi omogućio efikasno merenje preživljavanja, bez rizika od reaeracije uzoraka. Dakle, adekvatan eksperiment je zahtevao pojedinačne alikvote za svaku vremensku tačku za uzorkovanje ćelijske suspenzije u kojoj se meri preživljavanje. Prekonoćna kultura je oprana i podešena na gustinu od 4×10^8 /mL. Po 1 mL ove suspenzije je alikvotiran u tube od 1,5 mL. Kako bi se dodatno sprečila aeracija, zatvorene tube su umotane parafilmom i gajene uz aeraciju na 30°C. Tokom 6 dana u različitim vremenskim tačkama, određivana je ćelijska vijabilnost iz pojedinačnih tuba. Značajno je istaći da je kinetika preživljavanja dobijena ovom procedurom, bila visoko reproducibilna u ponovljenim eksperimentima. Reprezentativni rezultati su prikazani na **Slici 11A**.



Slika 11 - Kinetika preživljavanja *U. maydis* u ćelijskoj suspenziji visoke gustine tokom inkubacije u vodi u uslovima hipoksije i normoksije. (A) 4×10^8 / mL ćelija je inkubirano u vodi u tubi od 1,5 mL za indukovanje hipoksije. U naznačenim vremenskim tačkama, pojedinačne tube su uzorkovane za pripremu 10 x serijskih razblaženja i zasejavane na čvrstu podlogu. (B) Ćelijske suspenzije koje su inkubirane u tubama od 1,5 mL 24 h su dalje inkubirane u tubama od 50 mL (normoksija) i razblaženja su zasejana u označenim vremenskim tačkama za praćenje oporavka. (C) Obnavljanje vijabilnosti ćelija umrlih tokom inkubacije u vodi u tubama od 1,5 mL (24 h hipoksije). Inicijalna suspenzija divljeg soja (umrla posle 24 h inkubacije u uslovima limitiranog kiseonika) i njena serijska razblaženja (pripremljena odmah po tretmanu) su inkubirane u tubama od 50 mL pod aeracijom na 30°C, 3 dana i zasejane su na čvrstu podlogu intervalima od jednog dana. (D) Elektroforeza na agaroznom gelu. Genomska DNK izolovana u naznačenim vremenskim tačkama iz ćelijskih suspenzija koje su inkubirane u vodi u uslovima hipoksije (levo) i normoksije (desno). M - DNK lestvica (DNA ladder Mix, Thermo Scientific).

Kao što se vidi sa slike, tokom prvih 14 sati inkubacije, vijabilnost ćelija je ostala nepromenjena. Nakon toga, ćelije postepeno gube vijabilnost i u narednih 10 sati broj vijabilnih ćelija pada za

skoro 5 redova veličine (~100000 puta). Ovaj pad vijabilnosti, iako dramatičan, nije doveo do potpunog potiranja populacije. Mali broj ćelija ipak preživljava i nakon 48 sati inkubacije.

Nakon 24 sata inkubacije, jedan alikvot je prebačen u tubu od 50 mL, tako da je dalja sudbina populacije praćena paralelno u hipoksičnim (**Slika 11A**, levi panel) i normoksičnim uslovima (**Slika 11B**). Prvo što je uočeno je da, nakon uspostavljanja aeracije, broj vijabilnih ćelija eksponencijalno raste, bez naglašene lag faze, dostižući nivo brojnosti početne suspenzije kroz 32 sata. Sa druge strane, mali broj preživelih vijabilnih ćelija ima kapacitet da nakon 24 sata adaptacije, obnovi populaciju u gotovo istim uslovima (hipoksije) koji su prethodno doveli do katastrofalnog pada vijabilnosti, iako se postiže manja gustina nego u uslovima reaeracije (normoksije). Ovaj rast vijabilnosti se uočava i na **Slikama 8a** i **10b**. Dakle, ova malobrojna preživela subpopulacija predstavlja ostatak populacije koji je sposoban da se prebaci na fermentacijski način rasta. Ono što se još ne zna je tačan razlog zašto se u uslovima hipoksije ne dostiže puna brojnost kao u uslovima normoksije.

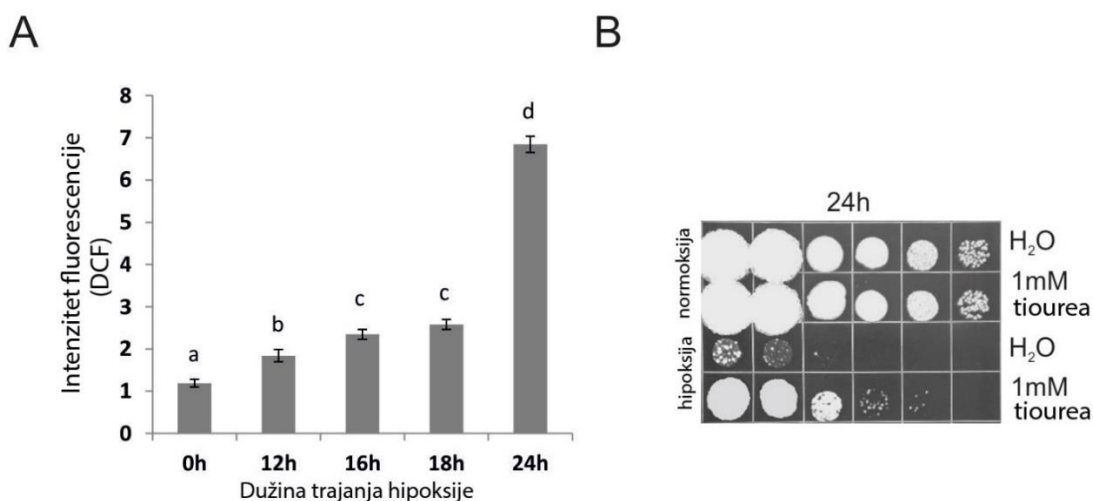
Oporavak populacije nakon umiranja usled generisanja hipoksičnih uslova podseća na oporavak nakon delovanja peroksida. Međutim, sam način umiranja ćelija ne mora biti isti nakon delovanja ova dva stresogena faktora, a samim tim ni oporavak populacije. Da bi se utvrdilo da li je, nakon faze smrti, porast vijabilnosti posledica umnožavanja preživelih ćelija, ćelije (4×10^8 / mL) su inkubirane u vodi 24 sata kako bi se generisali hipoksični uslovi koji dovode do smrti ćelija, a potom su napravljena serijska razblaženja i u naredna tri dana inkubacije paralelno je praćena vijabilnost u originalnoj suspenziji i u setu inkubiranih razblaženja. Eksperimentalni dizajn je šematski prikazan na **Slici 5A**. Na **Slici 11C** se vidi da je rast prisutan samo u tubama za koje se procenjuje da su u trenutku distribucije sadržale preživlele ćelije, što jasno ukazuje da je i pri ovim uslovima, rast broja vijabilnih ćelija rezultat reprodukcije preživelih ćelija.

Drugi zanimljiv aspekt ove analize je kinetika i patern degradacije DNK u hipoksiji. Tokom ovakve inkubacije uočavamo uniformne i jasno fragmentisane DNK produkte (**Slika 11D**). Ovaj patern fragmentacije DNK podseća na "lestvičastu" fragmentaciju (engl. „DNA laddering”) koja se sreće kod programirane ćelijske smrti (PCD), kao rezultat sećenja DNK između nukleozoma. Ovi rezultati su značajno drugačiji nego posle tretmana peroksidom, gde se već u prvih 12 sati inkubacije DNK naglo i brzo degraduje. [78] Međutim, na **Slici 11D** se vidi da, u slučaju inkubacije u hipoksičnim uslovima gotovo da nema degradacije DNK u prva 24 sata, da bi u naredna 24 sata došlo do značajne fragmentacije. Sveukupno, ovi rezultati ukazuju da populacija *U. maydis* podleže različitim formama smrti u odgovoru na različite tipove i intenzitet stresogenih faktora. Svakako, značajno bi bilo sprovesti jedno detaljno istraživanje o načinu umiranja usled autogenerisane hipoksije.

4.7 Produkcija ROS-ova autogenerisanom hipoksijom

Postavilo se pitanje kako autogenerisana hipoksija dovodi do ćelijske smrti. U mnogim eksperimentalnim sistemima, uključujući i gljive, je pokazano da hipoksija uzrokuje povećanu produkciju ROS-ova. [79, 80] S obzirom da se smatra da akumulacija ROS-ova uzrokuje ćelijsku smrt, [81-84] sledeći cilj je bio da se takva mogućnost ispita i kod autogenerisane hipoksije. Za ovaj eksperiment su, za nekoliko različitih vremenskih tačaka, pripremljene pojedinačne ćelijske suspenzije visoke gustine i inkubirane na 30°C do trenutka kada su uzorkovani za merenje produkcije ROS-ova. Tačke merenja produkcije ROS-ova su izabrane tako da pruže uvid u produkciju i akumulaciju ROS-ova pre i nakon što dođe do pada vijabilnosti. Za merenje produkcije ROS-ova korišćen je DCF-DA (engl. „2',7'- dichlorofluorescein diacetate”) fluorescentni reporter, koji se prevodi u fluorescentnu formu nakon oksidacije putem vodonik-peroksida ili hidrosilnih radikala. Merenja su pokazala da ćelije *U. maydis* zaista podležu oksidativnom stresu u opisanim

eksperimentalnim uslovima. Naime, detektovan je značajan rast nivoa ROS-ova pre nego što je nastupila faza smrti i tokom njenog trajanja (**Slika 12A**).



Slika 12 - Produkcija ROS-ova indukuje ćelijsku smrt u uslovima limitirane aeracije. (**A**) Proizvodnja ROS-ova određena merenjem DCF fluorescencije. Ćelijska suspenzija ($4 \times 10^8/\text{mL}$) *U. maydis* je inkubirana u vodi, u čvrsto zatvorenim tubama od 1,5 mL tokom 12 h, 16 h, 18 h i 24 h. Za svaku vremensku tačku su korišćene pojedinačne tube, u četvoroplikatu. Prikazane su standardne devijacije za četiri nezavisna merenja. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između kontrolnih ćelija i ćelija u hipoksiji je prikazana različitim slovima. (**B**) Preživljavanje *U. maydis* u suspenziji visoke gustine ($4 \times 10^8/\text{mL}$) inkubiranoj 24 h u vodi i u prisustvu 1 mM tiouree. Inkubacija u tubama od 50 mL je označena kao normoksija, a hipoksija u tubama od 1,5 mL. 10 x serijska razblaženja su zasejana na čvrst medijum.

Iako je povišena produkcija ROS-ova izmerena i pre nego što je uočena ćelijska smrt, moglo bi se uzeti da ovi rezultati pokazuju samo pozitivnu korelaciju, a ne i uzročno-posledičnu vezu. Da bi se dokazalo da je povećana produkcija ROS-ova uzrokovala SH-indukovanu ćelijsku smrt, ćelije su tretirane tioureom koja je efikasna u vezivanju hidroksilnih radikala. I zaista, uočeno je da izlaganje *U. maydis* 1 mM tiourei značajno povećava (više od 100 puta) preživljavanje u datim eksperimentalnim uslovima (**Slika 12B**). Kako bi se isključila mogućnost toksičnog efekta tiouree, kao kontrola je paralelno postavljena ćelijska suspenzija tretirana sa 1 mM tioureom, ali je inkubirana u aerobnim uslovima. Na **Slici 12B** (gornji panel) se vidi da nije došlo do pada vijabilnosti u kontroli. Rezultati ovog eksperimenta, potvrđuju da produkcija ROS-ova igra ključnu ulogu u indukovanju ćelijske smrti. Stoga, zaključak bi bio da SH dovodi do oksidativnog stresa i akumulacije ROS-ova do određenog nivoa, što dovodi do ćelijske smrti i ogromnog pada vijabilnosti populacije *U. maydis*.

4.8 Izolovanje RUS mutanata

Na osnovu rezultata opisanih u poglavljima 4.1-4.3, koji su jasno pokazali da su oslobođena jedinjenja iz umrlih ćelija “ambivalentni” izvor nutrijenata koje *U. maydis* može ipak efikasno da koristi, postulirane su 3 teze koje su usmerile dalja istraživanja: (1) *U. maydis* bi morao da poseduje i koristi ćelijske mehanizme za reapsorpciju, obradu i ponovnu upotrebu oslobođenih jedinjenja kako bi ćelije naprosto mogle da rastu i umnožavaju se u uslovima LH, (2) za recikliranje oslobođenog supstrata su zaduženi isti ćelijski faktori i procesi koji su uključeni u regularni rast u bogatom medijumu, (3) *U. maydis* bi mogao da koristi specifične ćelijske faktore zadužene isključivo za prerađivanje/obradu toksičnih derivata oslobođenih iz umirućih ćelija. Naime, moguće je zamisliti da su ćelijski faktori uključeni u regularni rast sasvim dovoljni za procesovanje toksičnih derivata, tj. ćelijski procesi i faktori koji održavaju “regularan” rast konstituišu sav kapacitet neophodan da se adekvatno odgovori i na zahteve povećane toksičnosti biomolekula

tokom recikliranja devastirane populacije. Sa druge strane, ne bi bilo iznenađujuće da za efikasnu operativnost ovog procesa ćelije *U. maydis* poseduju dodatne faktore koji su nužni isključivo za detoksikaciju oslobođenog ćelijskog sadržaja. Ono što ovu hipotezu čini dodatno zanimljivom je činjenica da je trećina identifikovanih gena *U. maydis* hipotetične ili nepoznate funkcije [72], tako da bi RUS mogao biti baziran na posebnom pod-setu faktora, koji do sada nisu opisani upravo zbog usmerenosti istraživanja primarno na razumevanje fiziologije i dinamike ćelija tokom intenzivnog rasta u bogatom hranljivom medijumu.

Da bi se identifikovali geni koji leže u osnovi mašinerije za reapsorpciju i obradu oslobođenog ćelijskog sadržaja, pristupilo se izolovanju mutanata koji su defektni u ovim procesima (označeni kao mir mutanti od engl. „Mutants In RUS”). Mutanti su izolovani na dva načina: 1. kroz testiranje gubitka sposobnosti rasta u suspenziji ćelija tretiranoj peroksidom i 2. putem testiranja gubitka sposobnosti rasta u supernatantu tretiranih ćelija. Na prvi način je, od 1200 analiziranih kandidata, izolovano četiri mutanta koji su pokazali fenotip od interesa te su stoga odabrani za dalju analizu (mir107, mir237, mir354, mir754). Kroz drugi pristup, od 3500 testiranih kandidata, 33 mutanta je posedovalo fenotip od interesa, a 6 je odabrano za dalju analizu (mir2, mir3, mir7, mir20, mir27 i mir29).

4.9 Karakterizacija mutanata

Prva grupa mutanata je izolovana tako što su nakon UV mutageneze, pojedinačne kolonije mutanata gajene preko noći, a zatim su kroz tretman sa 0,4% H₂O₂, testirane na sposobnost da rekonstituišu vijabilnost inkubacijom u vodi tokom 24 h. Nakon pretrage mutanata i odabira onih sa najizraženijim RUS fenotipom, sledila je detaljna analiza njihove sposobnosti da se oporave u uslovima gladovanja. Na **Slici 13A** se uočava da u odnosu na divlji soj (engl. „wild-type”, wt), sva četiri mir mutanta pokazuju značajno zaostajanje u rastu kada su ćelije tretirane peroksidom inkubirane 24 sata u vodi pre samog zasejavanja na podlogu. U slučaju mutanata mir107 i mir354 prisutan je samo neznatan porast broja vijabilnih ćelija čak i nakon 72 sata inkubacije. Kod mutanata mir237 i mir754 se uočava poboljšanje u rastu sa produžavanjem inkubacije, ali mir754 ipak zaostaje za divljim sojem i nakon 72 sata inkubacije. mir237 ima drugačiji odgovor na uslove gladovanja. Naime, netretirane ćelije sva četiri mutanta efikasno održavaju vijabilnost tokom 24 sata gladovanja. Međutim, vijabilnost netretiranih ćelija mir237 opada sa produžavanjem vremena inkubacije u vodi (oko 3 loga (1000 puta) nakon 72 h). Ono što je još više iznenađujuće je da ćelije mir237 koje su pretrpele veća oštećenja u tretmanu peroksidom pokazuju (srazmerno količini oštećenja) bolju proliferaciju sa produženjem perioda inkubacije. Ovaj fenomen je nazvan “invertovani fenotip”, s obzirom da izgleda kao slika u ogledalu preživljavanja zasejanog odmah po tretmanu peroksidom (**Slika 13**, poređenje panela preživljavanja mir237 i panela 72 sata inkubacije). Sumirano, ova četiri mutanta imaju smanjenu sposobnost za RUS, ali se međusobno razlikuju u paternu odgovora na tretman.

Nakon ove početne karakterizacije mutanata, nametnulo se pitanje da li je smanjena sposobnost rekonstitucije populacije mutanata samo odraz njihove redukovane stope rasta ili oni uz to imaju i smanjenu sposobnost savladavanja toksičnosti izazvane tretmanom? Da bi se dobio odgovor na ovo pitanje, prvo je procenjena stopa rasta za divlji soj i za svakog mutanta gajenjem u YEPS-u. Kao što se vidi na **Slici 13B**, mutanti mir237, mir354 i mir754 rastu sporije od divljeg soja. Međutim, ne bi se mogla uspostaviti jasna korelacija između stope rasta mutanata i njihovog kapaciteta za RUS. Na primer, mir107, koji ni nakon 72 sata inkubacije ne može da rekonstituiše vijabilnost i formira najsitnije kolonije od svih mutanata (nakon inkubacije u YEPS medijumu), bio je najbliži divljem soju po stopi rasta u tečnoj kulturi. Posledično, dalja istraživanja su bila usmerena na detaljniju karakterizaciju LH odgovora mir mutanata i praćenje njihovog ponašanja u širem spektru tretmana.

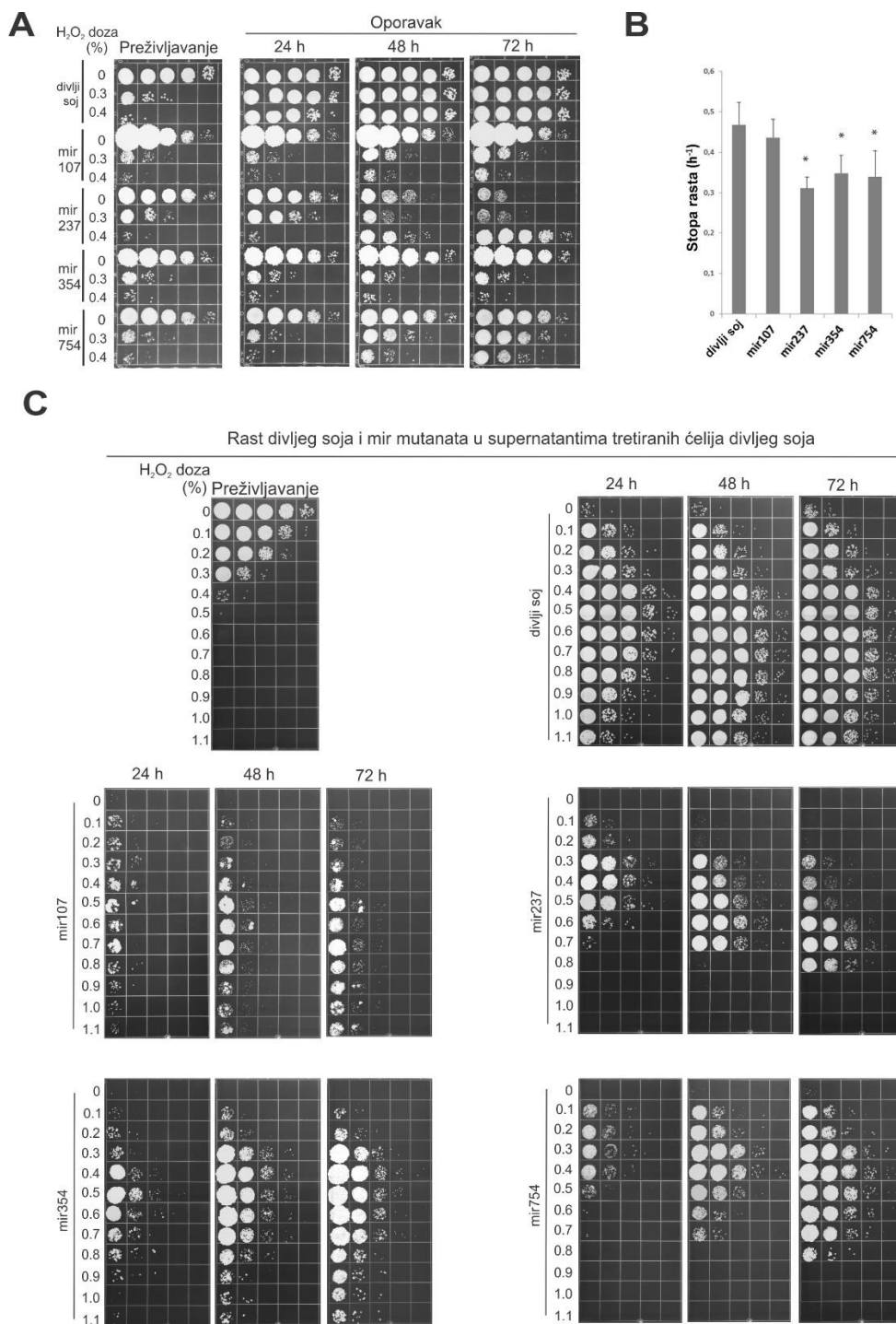
Najpre je testirana sposobnost mutanata da rastu u supernatantima dobijenim iz ćelijskih suspenzija (gustina 2×10^7 / mL) UCM520 tretiranih rastućim dozama vodonik-peroksida (0-1,1%). Tako je 8×10^3 netretiranih ćelija divljeg soja ili ćelija mutanata zasejano u svaki alikvot i praćen je rast tokom 24, 48 i 72 sata inkubacije. Rezultati rasta u supernatantima su prikazani na **Slici 13C**. Iako je svaki od mutanata pokazao drugačiji obrazac rasta, generalni zaključak je da sva četiri mutanta imaju narušenu sposobnost rasta u ovim uslovima.

Mutant mir107 ima najizraženiji gubitak sposobnosti rasta u supernatantima od svih mutanata i daleko zaostaje za divljim sojem kroz čitav spektar supernatanta. Sa produžavanjem vremena inkubacije, ne dolazi do značajnijeg porasta vijabilnosti.

Mutant mir237 pokazuje blago usporen rast nakon 24 sata inkubacije u supernatantima poreklom od tretmana sa nižim dozama peroksida (0,1%-0,5%). U 0,6%-supernatantu, rast se znatno usporava u odnosu na wt, dok pri višim dozama dolazi do pada vijabilnosti i odsustva rasta nakon 24 h inkubacije. Ovaj mutant može da reciklira biomolekule iz tretmana sa 0,7% i 0,8% peroksidom, ali mu je za to potrebno više vremena (oporavak je vidljiv posle 48 h i posle 72 h, redom). Kao što je već uočeno, mir237 ima problem da održi vijabilnost ako se duže vremena inkubira u vodi, što se takođe dešava i u onim supernatantima u kojima je ovaj mutant već mogao da prolifериše (nakon rasta tokom 48 h u supernatantima 0,3%, 0,4% i 0,5% , dolazi do pada vijabilnosti nakon 72 h inkubacije). Ovakav patern rasta mir237 je vrlo interesantan i zahteva dalje studije kako bi se utvrdio razlog ovakvog ponašanja.

Mutanti mir 354 i mir754 pokazuju donekle sličan obrazac rasta u supernatantima. Mutant mir354 ima usporen rast u supernatantima poreklom od tretmana sa 0,1-0,7% peroksidom i pad oporavka koji je još izraženiji pri višim dozama. Mutant mir754 pokazuje usporen rast populacije u supernatantima do 0,8%, dok pri višim dozama rast izostaje i nakon 72 h.

Iz ovih rezultata mogu se izvesti dva zaključka. Prvi je da dinamika rasta svakog mutanta ima sopstveni (specifični) patern. Drugo, kako svaki od ovih mutanata pokazuje dramatičnu inhibiciju rasta u visokodoznim supernatantima u kojima divlji soj i dalje prolifериše, može se zaključiti da su ćelijski faktori narušeni kod ovih mutanata odgovorni i za prevazilaženje toksičnosti indukovane tretmanom.



Slika 13 - Mutanti defektni u RUS-u. (A) Ćelije ($2 \times 10^7/\text{mL}$) iz označenih sojeva su tretirane sa $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{3+} - \text{Na EDTA}$ i inkubirane 72 h u vodi. Uzorci ($10 \mu\text{L}$) su odmah zasejani na YEPS podlogu za merenje preživljavanja ili su inkubirani u vodi 24 h, 48 h i 72 h pre zasejavanja na YEPS. (B) Stopa rasta divljev soja i mir mutanata u bogatom hranljivom medijumu (YEPS). Prikazane su standardne devijacije 3 eksperimenta. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između stope rasta svakog od mutanata i divljev soja. (C) Supernatanti ($2 \times 10^7/\text{mL}$) ćelija divljev soja tretirani označenim dozama peroksida su inokulisani sa $8 \times 10^3/\text{mL}$ ćelija (divlji soj i četiri mutanta) i inkubirani u vodi na 30°C , uz kontinuiranu aeraciju, tokom 3 dana, kada su pravljena njihova serijska razblaženja i zasejana na hranljivu podlogu. Preživljavanje tretiranih ćelija je prikazano na levom gornjem panelu.

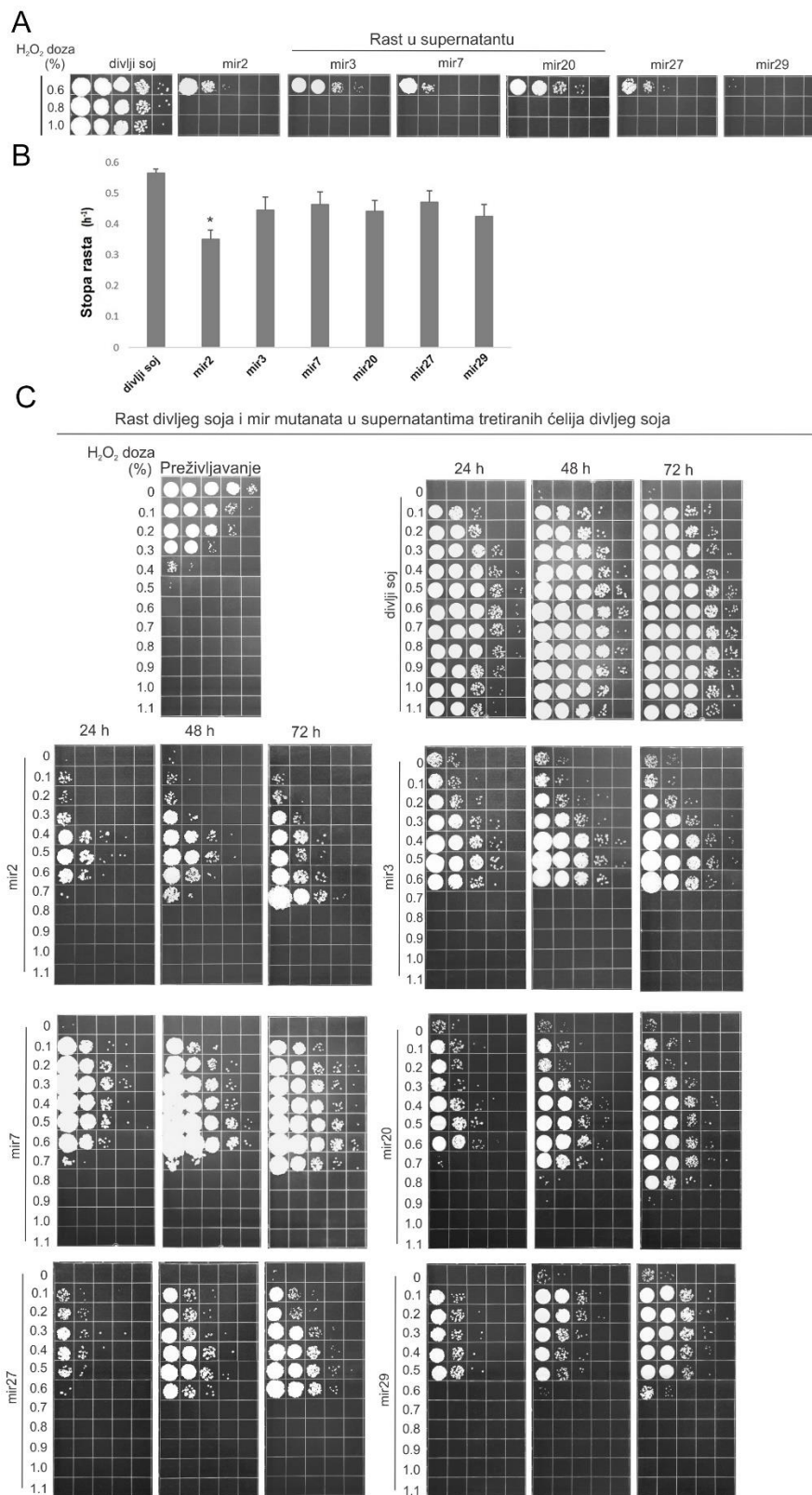
Drugi način za identifikovanje ćelijskih faktora uključenih u recikliranje oštećenih molekula bio je putem izolovanja mutanata koji gube vijabilnost u toksičnom supernatantu H_2O_2 -tretiranih ćelija. Mutanti su izolovani tako što su ćelije divljev soja UIMG10 izložene UV-mutagenezi, a potom su

pojedinačne kolonije testirane na gubitak sposobnosti rasta u supernatantu dobijenom od ćelijske suspenzije tretirane sa 1% H₂O₂. Od 3500 testiranih kandidata, 33 mutanta su pokazala fenotip od interesa, od kojih je 6 odabrano za dalju analizu (mir2, mir3, mir7, mir20, mir27 i mir29). U odnosu na divlji soj, svih 6 mutanata su pokazali manje ili veće zaostajanje u rastu kada su inkubirani 48 sati u supernatantima ćelija tretiranih 0,6% peroksidom. U supernatantu ćelija tretiranih 0,8% i 1% peroksidom, svi mutanti su pokazali potpuni gubitak vijabilnosti (**Slika 14A**).

Mutanti su detaljnije okarakterisani na isti način opisan za prvu grupu mutanata. Stopa rasta mutanata i divljeg soja UIMG10 u hranljivom YEPS medijumu je prikazana na **Slici 14B**. Kao što se vidi na slici, statistički značajnu nižu stopu rasta pokazuje samo mutant mir2.

Detaljnija slika efikasnosti selektovanih mutanata u recikliranju oksidativno-oštećenih biomolekula je dobijena ispitivanjem rasta mutanata u supernatantu dobijenom iz ćelijskih suspenzija (gustine 2x10⁷/mL) UIMG10 tretiranih rastućim dozama H₂O₂ (0,1-1,1%). Po 8x10³ netretiranih ćelija mutantnog soja i kontrolnog-divljeg soja je zasejano u 1 mL supernatanta i praćen je rast tokom 24, 48 i 72 sata inkubacije. Kao što se vidi na **Slici 14C**, svaki od mutanata ima drugačiji profil rasta. U poređenju sa divljim sojem, svi mutanti imaju niži stepen rasta nakon 24 sata inkubacije u supernatantu i potpuno odsustvo rasta u visokodoznim supernatantima (doze veće od 0,7% H₂O₂), čak i posle 72 sata inkubacije. Odsustvo rasta mutanata nije iznenađujuće s obzirom na način izolovanja mutanata, tj. da su izolovani kroz inkubaciju u supernatantu poreklom od tretmana sa 1% H₂O₂ i da su selektovani oni sa najizraženijim fenotipom. Svi mutanti zadržavaju sposobnost iskorištavanja biomolekula oslobođenih po tretmanu ćelija nižim dozama peroksida, sa različitom efikasnošću. Najizraženije zaostajanje u rastu u odnosu na wt, kroz čitav panel supernatanta, pokazuje mir2. Mutant mir27 za prva 24 h pokazuje slabo umnožavanje, ali sa produženjem inkubacije značajno povećava brojnost (za oko 2 loga). mir29 pokazuje u niskodoznim supernatantima (0,1%-0,5%) ujednačen rast nakon 72 sata inkubacije, dok mir3 efikasno iskorištava supstrat za rast i kroz 24 h dostiže skoro maksimalnu brojnost (za 1 log nižu u odnosu na wt).

U poređenju sa ostalim mutantima, mir7 nakon 24 sata inkubacije pokazuje najmanju senzitivnost na supernatante iz tretmana manjim dozama peroksida (doze manje od 0,7% H₂O₂). Takođe, za razliku od ostalih mutanata, mir7 u ovim supernatantima gotovo da uspostavlja rast divljeg soja nakon 72 sata inkubacije. mir3 samo neznatno povećava nivo rasta produžavanjem vremena inkubacije. Profili rasta mutanata mir2 i mir20 pokazuju sličnu tendenciju da, produžavanjem vremena inkubacije, uspostavljaju rast u supernatantima tretiranim većim dozama peroksida, dok u supernatantima tretiranim manjim dozama održavaju gotovo jednak nivo vijabilnosti tokom 72 sata inkubacije.

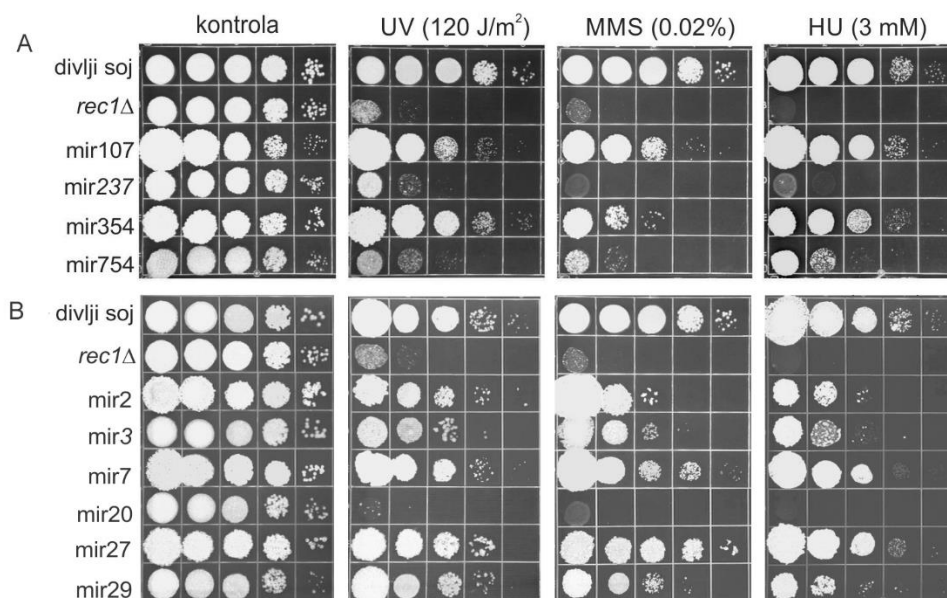


Slika 14 – (A) Supernatanti (2×10^7 /mL) ćelija divljev soja tretiranih označenim dozama peroksida su inokulisani sa 8×10^3 /mL ćelija (divlji soj i šest mutanata) i inkubirani u vodi na 30°C , uz kontinuiranu aeraciju, tokom 48 h, kada su pravljena njihova serijska razblaženja i zasejana na YEPS podlogu. (B) Stopa rasta divljev soja i mir mutanata u potpunom medijumu (YEPS). Prikazane su standardne devijacije 3 merenja. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između stope rasta svakog od mutanata i divljev soja. (C) Supernatanti (2×10^7 /mL) ćelija divljev soja tretiranih označenim dozama peroksida su inokulisani sa 8×10^3 /mL ćelija (divlji soj i šest mutanata) i inkubirani u vodi na 30°C , uz kontinuiranu aeraciju, tokom 3 dana, kada su pravljena njihova serijska razblaženja i zasejana na hranljivu podlogu. Preživljavanje tretiranih ćelija je prikazano na levom gornjem panelu.

Iako međusobno različiti, profili rasta mutanata jasno ukazuju da su mutanti izuzetno senzitivni na visokodozne supernatante, što govori o važnosti ćelijskih faktora za koje su mutanti defektni u prevazilaženju toksičnosti supstrata.

4.10 Senzitivnost mir mutanata na genotoksične agense

Kao što se vidi u prethodnim eksperimentima, supstrati poreklom od tretiranih ćelija su bili u različitoj meri citotoksični za sve mir mutante. Stoga je bilo od interesa da se ispita senzitivnost mir mutanata i na nekoliko genotoksičnih agenasa (UV, MMS i HU) u uslovima normalnog rasta. Pored toga, utvrđivanje postojanja senzitivnosti mutanata na neki od ovih agenasa bi omogućilo lakše identifikovanje mutiranog gena putem komplementacionog kloniranja. U tu svrhu, kao kontrola je korišćen mutant *rec1Δ* (mutant u genu za DNK egzonukleazu) koji pokazuje senzitivnost na sve genotoksične agense korišćene u analizi. Na **Slici 15A** prikazana je prva grupa mutanata. Dva mutanta, mir 237 i 754 su ekstremno senzitivna na agense koji oštećuju DNK (UV i MMS) i ometaju DNK replikaciju (HU), dok je mir354 senzitivna samo na MMS.



Slika 15 - Senzitivnost mir mutanata na genotoksične agense. Mutanti su zasejani na čvrst medijum i tretirani UV zracima ili su zasejani na medijum koji sadrži MMS ili HU. (A) Prva grupa mutanata. Kao kontrolni divlji soj korišćen je UCM520 (B) Druga grupa mutanata. Kao kontrolni divlji soj korišćen UIMG10. Mutant *rec1Δ* je korišćen kao negativna kontrola za obe grupe mutanata.

Što se tiče druge grupe mutanata (**Slika 15B**), mir20 ima najizraženiju senzitivnost na sva tri genotoksična agensa, koja je gotovo jednaka senzitivnosti negativne kontrole, što definitivno ukazuje da je mutirani gen važan za regulaciju DNK replikacije i odgovor ćelije na prisustvo oštećenja DNK molekula. Mutanti mir2 i mir3 su pokazali senzitivnost na MMS i HU za 2 reda veličine i blagu senzitivnost na UV. Mutant mir29 pokazuje senzitivnost na HU, dok mutanti mir7 i mir27 nisu pokazali veću senzitivnost na analizirane genotoksične agense. Rezultati ovog eksperimenta ukazuju da su neki od ćelijskih faktora za koje su izolovani mutanti defektni, uključeni ne samo u recikliranje oksidovanih molekula unutarćelijskog sadržaja, nego imaju i značajnu ulogu u odgovoru *U. maydis* na DNK oštećenja i replikacioni stres. Takođe, analize ukazuju i na mogućnost kloniranja gena selekcijom za rezistentnost na MMS-u.

4.11 Identifikacija inaktiviranih gena u mir mutantima

Identifikacija mutiranih gena je vršeno komplementacionim kloniranjem.

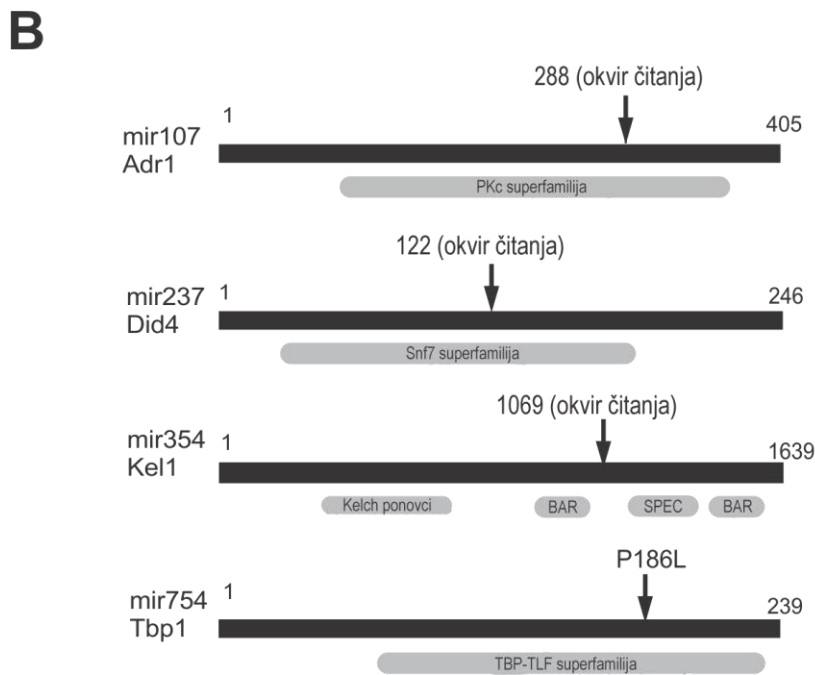
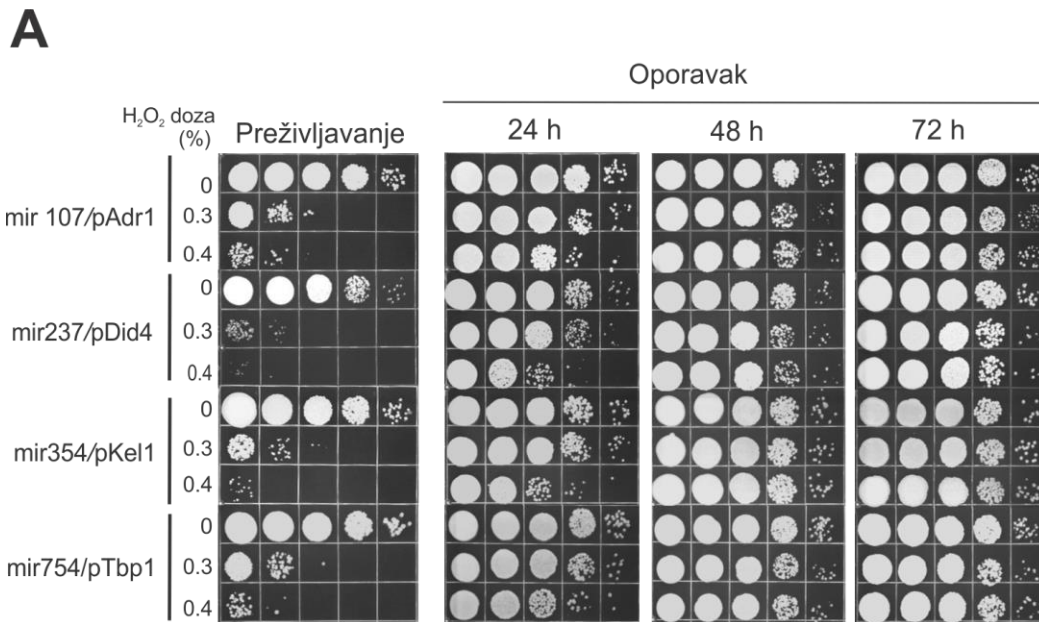
Mutanti su transformisani wt-genomskom bibliotekom pripremljenom na samoreplikujućem plazmidnom vektoru (pCM54), koji sadrži genomske fragmente nastale parcijalnom digestijom sa Sau3AI restriksionim enzimom i zasejavani na čvrstu hranljivu podlogu sa odgovarajućim antibiotikom.

Za mutante senzitivne na MMS, transformanti su selektovani na osnovu rezistentnosti na MMS na čvrstim podlogama (mir237, mir354, mir754, mir3 i mir20).

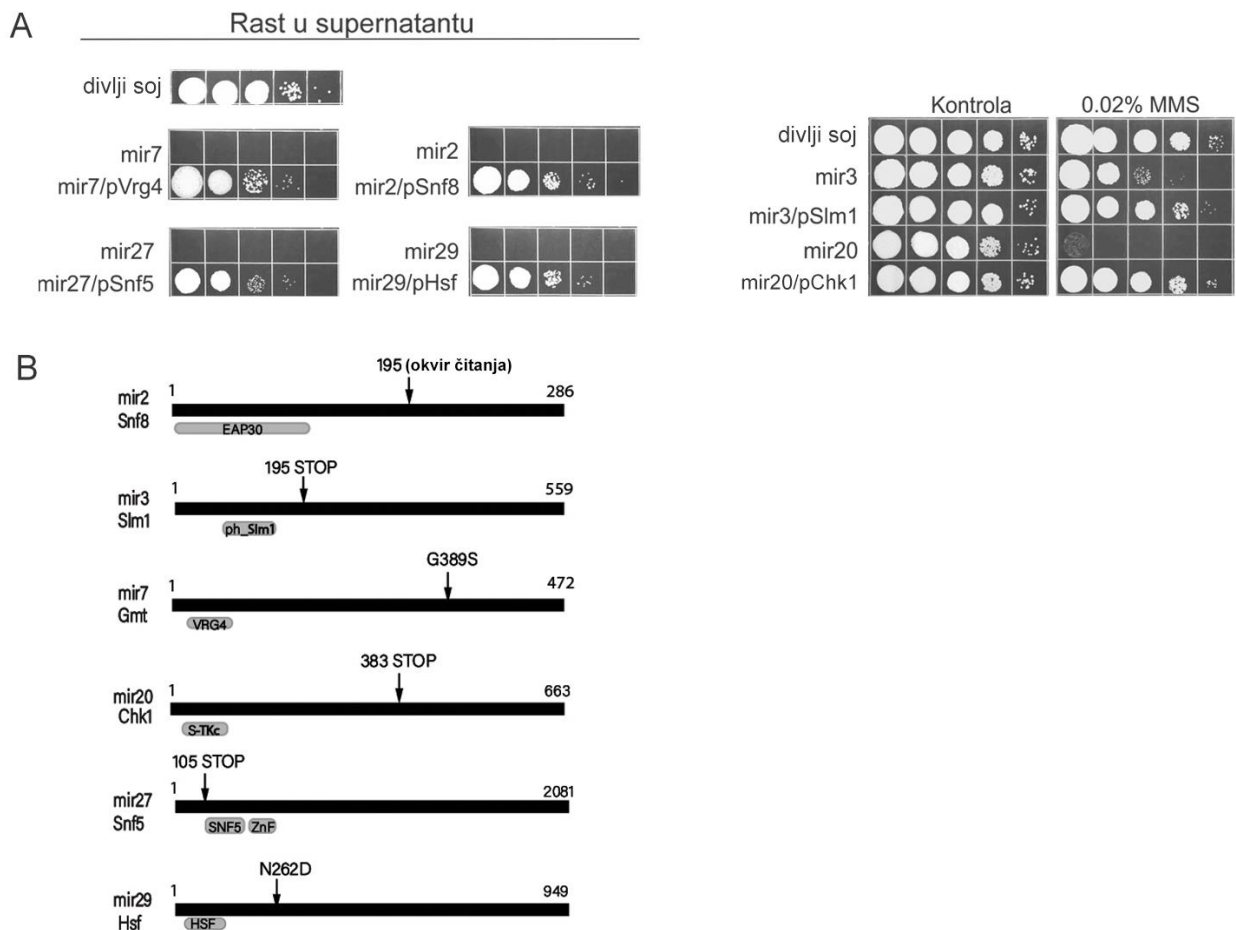
Za mutante rezistentne na MMS (mir107, mir7, mir27) ili slabije senzitivne (mir29) kao i mir2, transformanti su selektovani kroz tri ciklusa tretmana 0,3% peroksidom (mir107) ili kroz tri ciklusa rasta u supernatantu poreklom od tretmana 1% peroksidom i praćenja restitucije/ rasta populacije. Transformanti su pokupljeni sa čvrste podloge i nakon rasta u prekonocnoj kulturi su tretirani peroksidom, ili direktno zasejavani u supernatant, a potom su inkubirani 48 h i zasejavani na čvrstu podlogu u vidu 10 x serijskih razblaženja. Očekivano je da transformanti koji nose komplementirajući genomski fragment pokazuju rast nakon tretmana peroksidom/inkubacije u SN. Proces je ponovljen dva puta uz obogaćivanje populacije ćelijama koje pokazuju komplementirajući fenotip. Nakon poslednjeg ciklusa obogaćivanja, nasumično su izabrane pojedinačne kolonije transformanata, koji su potom testirani na sposobnost za RUS nakon tretmana peroksidom/tokom inkubacije u SN.

Transformanti rezistentni na MMS ili peroksid/supernatant su bili kandidati za dalju analizu koja je obuhvatila: izolovanje plazmidne DNK iz transformanata, propagacija plazmida u *E. coli*, restriksiona analiza plazmida i PCR analiza, retransformacija mutanata komplementirajućim genomskim fragmentom i kvantitativna analiza senzitivnosti retransformanata na genotoksičnom agensu. Genomski fragmenti koji su pokazali komplementaciju mutantnog fenotipa su identifikovani sekvenciranjem plazmida, a potom je subkloniranjem pojedinačnih gena komplementirajuća funkcija svedena na samo jedan od gena prisutnih na inicijalno kloniranim genomskim fragmentima (**Slika 16**). Da bi se isključila supresorska mutacija, sekvencirani su aleli mutanata i identifikovane su inaktivirajuće mutacije (**Slika 16B**).

Identifikovanim genima se pripisuje sledeće: mir107 nosi mutaciju u genu *Adr1*, koji kodira katalitičku subjedinicu protein-kinaze A (PKA), glavnog regulatora proliferacije ćelija u odgovoru na nutrijente [85, 86]. Mutacija u ovom genu dovodi do promene okvira čitanja na kodonu 288, tako da je okrnjen na C-terminusu za region koji gradi aktivno mesto proteina. Mutant mir 237 je defektan u genu koji kodira homologa Did4 proteina, neesencijalni protein od 246 aminokiselina uključen u sortiranje proteina (engl. „Vacuolar protein sorting”, Vps) [87]. Mutacija dovodi do promene okvira čitanja na kodonu 122, tako da je protein skraćen na C-terminusu. Mutant mir354 je defektan u genu koji kodira homologa Kell proteina dugog 1639 aminokiselina, koji je neesencijalni protein uključen u ćelijsku fuziju i morfologiju i izlazak iz mitoze [88]. Mutacija dovodi do promene okvira čitanja koja posledično daje varijantu proteina od 1069 aminokiselina. Mutant mir754 ima mutaciju u genu koji kodira homologa TATA-box vezujućeg proteina Tbp1 opšteg transkripcionog faktora od 239 aminokiselina, koji ima esencijalnu ulogu u formiranju pre-inicijacionog kompleksa RNK polimeraze [89]. Mutirani alel nosi „missense” mutaciju koja za posledicu ima P186L aminokiselinsku zamenu, koja potencijalno menja površinu interakcije sa TFIIB i DNK.



Slika 16 - Identifikovanje mir mutanata i komplementacija. **(A)** Čelije označenih sojeva, transformisane samoreplikujućim plazmidom koji nosi klonirane gene, su tretirane sa Fe³⁺-Na EDTA+ H₂O₂ i inkubirane tokom 72 sata. **(B)** Domenska organizacija proteina identifikovanih skriningom mutanata u RUS prikazana crnom bojom, sa označenim aminokiselinskim ostacima. Konzervirani domeni su prikazani svetlo sivom bojom. Proteini su anotirani u JGI bazi: UMAG_04456 - Adr1, UMAG_04865 - Did4; UMAG_15019 - Kel1, i UMAG_10143 - Tbp1. Strelice označavaju mesto i tip mutacije u mutiranom genu.

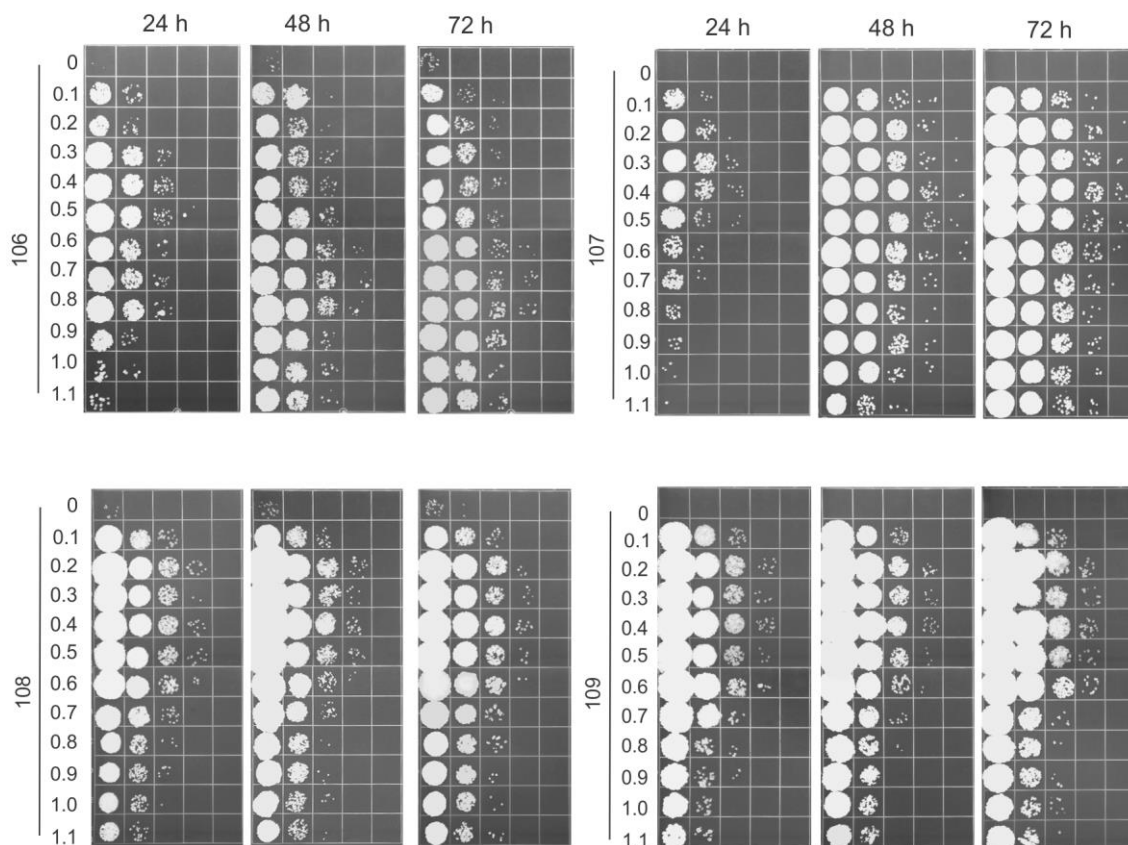


Slika 17 - Identifikovanje mir mutanata i komplementacija. **(A)** Čelije označenih sojeva, transformisane samoreplikujućim plazmidom koji nosi klonirane gene, su testirane na rast u supernatantu tretmana 1% peroksidom tokom 48 sati inkubacije (levi panel). Transformanti mutanata senzitivnih na MMS su testirani zasejavanjem na YEPS podloge sa 0,02% MMS-om i praćenjem sposobnosti formiranja kolonija (desni panel). **(B)** Domenska organizacija proteina identifikovanih skriningom mutanata u RUS prikazana crnom bojom, sa označenim aminokiselinskim ostacima. Konzervirani domeni su prikazani svetlo sivom bojom. Proteini su anotirani u JGI bazi redom: UMAG_11539 – Snf8, UMAG_03678 – Slm1, UMAG_01062 – Gmt, UMAG_11087 – Chk1, UMAG_04381 – Snf5, UMAG_10368 – Hsf. Strelice označavaju mesto i tip mutacije u mutiranom genu. STOP se odnosi na uvođenje „nonsense” mutacije.

Što se tiče druge grupe mutanata, identifikovane su mutacije u sledećim genima: **mir2** nosi mutaciju u genu koji kodira hipotetički protein Snf8, uključen u sortiranje proteina (engl. „Vacuolar protein sorting”, Vps). Mutacija u ovom alelu ima za posledicu promenu okvira čitanja počevši od 195. kodona i formiranje prevremenog STOP kodona. Snf8 je komponenta ESCRT II kompleksa (engl. the endosomal sorting complex required for transport II), koji je zadužen za formiranje multivezikularnih tela (engl. „multivesicular body”, MVB) i sortiranje endozomalnih kargo proteina u MVB [90, 91]. Mutant **mir3** nosi „nonsense” mutaciju u alelu koji kodira hipotetički protein Slm1, dugačak 559 aminokiselina. Mutacija u ovom alelu obuhvata promenu dimera TT u CC, što za posledicu ima pojavu STOP kodona na 195. poziciji i sintezu proteina dugog 194 aminokiseline. Protein Slm1 je deo TORC2 i kalcineurin-zavisnog signalnog puta i uključen je u organizaciju citoskeletnog aktina i endozomalni transport [92, 93]. Mutant **mir7** nosi „missense” mutaciju u genu *Vrg4*, koji kodira putativni transporter GDP-manoze (engl. „GDP-mannose transmembrane transporter”, Gmt), dug 472 aminokiseline. Identifikovana mutacija dovodi do G389S aminokislinske promene. Gmt protein je uključen u transport GDP-manoze iz citoplazme u lumen Goldži aparata, što je neophodno za manozilaciju glikoproteina [94].

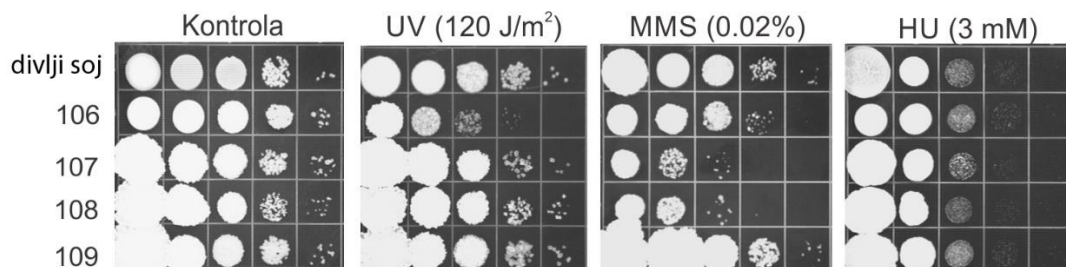
Mutant **mir20** nosi „nonsense” mutaciju u alelu koji kodira hipotetički protein Chk1 (engl. „Checkpoint 1”), dug 663 aminokiseline. Mutacija u alelu *Chk1* gena na 383. kodonu kreira STOP kodon, što dovodi do sinteze skraćenog proteina od 382 aminokiseline. Chk1 je serin/treonin – protein kinaza, zadužena za zaustavljanje ćelijskog ciklusa i aktivaciju DNK reparacije u prisustvu oštećenja na DNK molekulu [95]. Mutant **mir27** nosi mutaciju u genu koji kodira Snf5 transkripcioni regulator, dužine 2081 aminokiselina. Mutacija odgovorna za mir27 fenotip kreira STOP na poziciji 105. kodona, što rezultuje sintezom vrlo skraćenog N' - terminalnog dela proteina. Snf5 predstavlja subjedinicu SWI/SNF hromatin remodelujućeg kompleksa, putem kojeg ostvaruje ulogu u remodelovanju hromatina i regulaciji transkripcije [96, 97]. Mutant **mir29** nosi „missense” mutaciju u genu koji kodira hipotetički protein toplotnog šoka, Hsf1 (engl. „Heat shock transcription factor 1”), dužine 949 aminokiselina. Mutacija na alelu ovog gena za posledicu ima N262D aminokiselinsku promenu. Protein Hsf1 je transkripcioni faktor koji reguliše HSR put (eng. „Heat Shock Response”, HSR) i ključni je aktivator proteina toplotnog šoka u uslovima proteotoksičnog stresa [98].

Kako je ovakvim istraživačkim pristupom identifikovano nekoliko faktora uključenih u unutraćelijski transport (Did4, Snf8, Slm1), dodatno su u analizu za sposobnost recikliranja oksidativno oštećenih biomolekula uključena i 4 mutanta za faktore sa definisanom funkcijom u endocitozi i formiranju endozoma u *U. maydis* (**Slika 18**). Did2 kao regulator ESCRT kompleksa kod *U. maydis*, koordiniše pravilno sazrevanje endozoma i endozomalni transport kargo iRNK i proteinskih kompleksa na duge distance [99]. *Yup1* gen kodira t-SNARE protein uključen u fuziju endocitoznih membrana i polarni rast hifa. [100] *Rab5* kodira mali G protein i predstavlja marker ranih endozoma, koji imaju različite funkcije tokom životnog ciklusa *U. maydis*: citkokineza i signaling feromonima kod haplodinih ćelija i transport na velike distance tokom filamentoznog rasta [101]. *Hook* nosi mutaciju u genu koji kodira jednog od članova istoimene familije proteina, koji interaguje sa Rab GTP-azama uključenim u endocitozu. Ovaj protein orkestrira bidirekcionu transport tako što koordiniše vezivanje kinezina-3 i dineina za rane endozome [102]. U nedostatku izogenih wt sojeva, rezultati su poređeni sa nominalnim UCM520 i UIMG10 wt sojevima. Nakon 24 sata inkubacije, mutant *yup1* pokazuje najsporiji rast u supernatantu, ali nakon sledeća 24 sata skoro da uspostavlja gustinu karakterističnu za UCM520 i UIMG10. Mutanti *did2*, *yup1* i *rab5* pokazuju sličan profil rasta nakon prva 24 sata inkubacije. Sa produžavanjem vremena inkubacije u supernatantima, mutanti *yup1* i *rab5* neznatno povećavaju brojnost, dok mutant *did2* ima nešto veći rast u višedoznim supernatantima. Mutant *yup1* sporo raste nakon prvih 24 h inkubacije, da bi pokazao najveći porast brojnosti nakon 48 i 72 sata inkubacije.

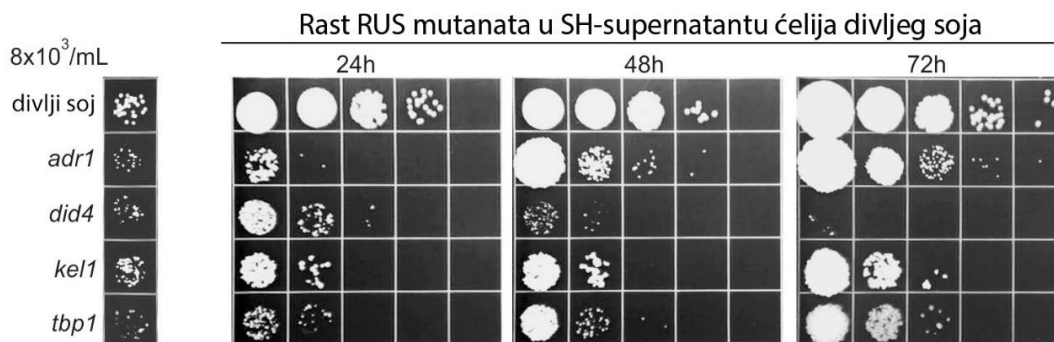


Slika 18 - Supernatanti (2×10^7 /mL) ćelija divljeg soja tretiranih označenim dozama peroksida su inokulisani sa 8×10^3 /mL ćelija (četiri mutanta) i inkubirani u vodi na 30°C , uz kontinuiranu aeraciju, tokom 3 dana, kada su pravljena njihova serijska razblaženja i zasejana na hranljivu podlogu.

Senzitivnost ovih mutanata na genotoksične agense je prikazana na **Slici 19**. Mutant *did2* pokazuje umerenu senzitivnost na MMS i UV, gde se uočava pad vijabilnosti za 10 puta u odnosu na divlji soj. Mutanti *yup1* i *rab5* imaju 100 puta manji rast na MMS-u. Senzitivnost ovih mutanata na HU nije bila značajna.



Slika 19 - Senzitivnost mir mutanata na genotoksične agense. Mutanti su zasejani na čvrst medijum i tretirani UV zracima ili su zasejani na medijum koji sadrži MMS ili HU.



Slika 20 - Sposobnost rasta divljeg soja i RUS mutanata pod aeracijom u supernatantima dobijenim iz suspenzije ćelija inkubiranih 24 h u uslovima ograničenog kiseonika (SH-supernatant). Profiltriran supernatant je inokulisan sa 8×10^3 /mL ćelija divljeg soja ili RUS mutantnih sojeva i inkubiran naredna 72 h pod aeracijom (tube od 50 mL). U intervalima od jednog dana su uzimani alikvoti za pripremu 10 x serijskih razblaženja koja su zasejana na podlogu. Svi paneli predstavljaju reprezentativne rezultate 3 nezavisna eksperimenta.

Prethodno je pokazano (poglavlje 4.4), da *U. maydis* umire usled autogenerisane hipoksije, ali i da ima sposobnost restitucije populacije umnožavanjem na račun oslobođenih biomolekula iz mrtvih ćelija, dakle istim mehanizmom kao i nakon delovanja oksidativnog stresa. Iako je uzrok umiranja ćelija u hipoksiji generisanje ROS-ova, dakle oksidativni stres, obrazac degradacije DNK može ukazivati da se radi o drugačijem tipu ćelijske smrti, što dalje može uticati na produkciju kvalitativno drugačijeg supstrata u odnosu na onaj koji nastaje u reakciji sa peroksidom. Zbog toga je testirana sposobnost ćelija divljeg soja da proliferišu u supstratu poreklom od ćelija umrlih usled hipoksije. Ujedno je odabrano i nekoliko mir mutanata kako bi bila ispitana njihova sposobnost reciklaže i ovakvog supstrata, tj. da se proverí mogućnost da su ćelijski faktori uključeni u rekonsituciju populacije nakon tretmana peroksidom takođe neophodni za ćelijsku reprodukciju na supstratima ćelija umrlih usled autogenerisane hipoksije.

Dakle, supernatant dobijen od 24 sata inkubirane ćeljske suspenzije u uslovima limitiranog kiseonika je inokulisan sa fiksnim brojem (8×10^3 ćelija) svežih ćelija divljeg soja i inkubiran na 30°C uz aeraciju. Kao što se vidi na **Slici 20**, ovaj supernatant sadrži dovoljno nutrijenata da obezbedi rast populacije i do 1000 puta, ali ne i do nivoa koji se postiže u ćelijskoj suspenziji inkubiranoj 24 sata pod aeracijom (uporediti **sliku 11B** sa **slikom 20**). Moguće objašnjenje za ovakvu razliku jeste da oslobađanje supstrata iz umrlih ćelija nije u potpunosti odrađeno/ završeno za 24 sata, te je stoga supernatant nutritivno siromašniji u odnosu na suspenziju. Drugim rečima, verovatno je da se uporedo sa umnožavanjem ćelija u suspenziji, koja se (dodatno) inkubira 24 sata pod aeracijom, dešava i dalja dekompozicija i curenje unutarćelijskih molekula iz mrtvih ćelija, koje može da obezbedi veću ekspanziju rastuće subpopulacije.

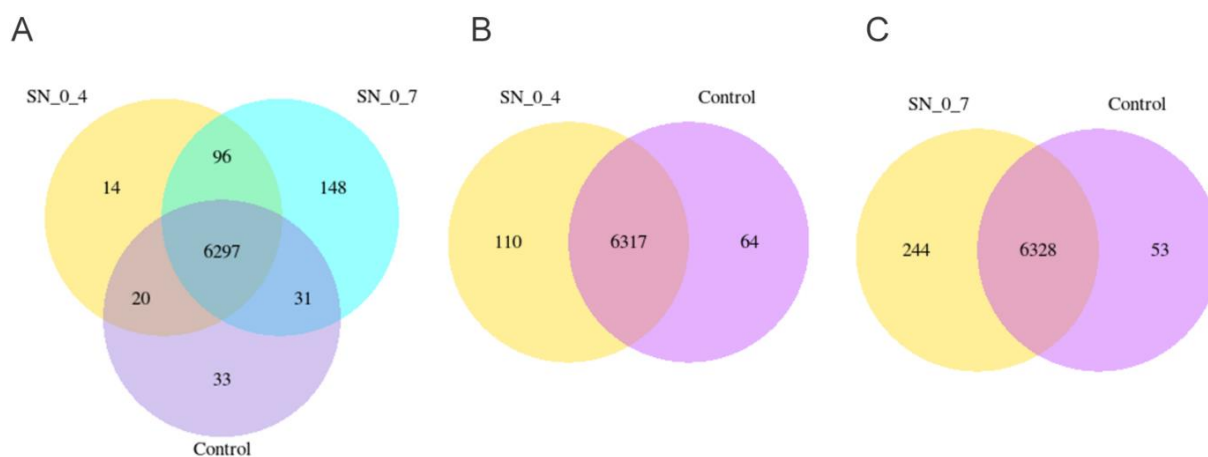
Što se tiče mir mutanata, kao što se vidi na slici, za razliku od divljeg soja, svi su pokazali značajno smanjenu sposobnost rasta u ovom medijumu, što ukazuje da su zajednički RUS faktori bitni za obnovu populacije nakon tretmana peroksidom, kao i nakon smrti izazvane autogenerisanom hipoksijom.

4.12 Analiza transkriptoma

Kao alternativni pristup za identifikovanje novih ćelijskih faktora zaduženih za recikliranje oštećenih biomolekula i obnovu populacije, uporedno su analizirani ekspresioni profili ćelija raslih u optimalnim uslovima (bogatim hranljivom medijumu) i u supernatantima poreklom od peroksidom tretiranih ćelija. Analiza transkriptoma daje podatke o ukupnoj diferencijalnoj ekspresiji gena u tretiranim i kontrolnim ćelijama, što može da ukaže na širi spektar i dinamiku ćelijskih faktora i funkcija važnih za sposobnost RUS-a.

Nakon tretmana sa dve doze H₂O₂ (0,4% i 0,7%), ćelije divljeg soja su inkubirane 4 h u vodi, kako bi se omogućilo oslobađanje biomolekula iz mrtvih ćelija. Dobijeni supernatanti su inkubirani sa po 2x10⁷ svežih ćelija, koje su potom inkubirane 30 minuta, tj. vremenski period u kome je očekivana promena ekspresija gena uključenih u RUS. Kontrolna grupa ćelija je inkubirana u razblaženom bogatom hranljivom medijumu (10% YEPS). Kako je ranije pokazana korelacija između jačine tretmana i toksičnosti supernatanta, izabrana su 2 tretmana (0,4% i 0,7% H₂O₂) koji imaju različit efekat na rast ćelija. Dok je u 0,4% SN, vidljiva proliferacija wt ćelija nakon 24 h inkubacije, u 0,7% SN, dolazi do inicijalnog pada brojnosti inokuliranih ćelija, da bi se značajan rast uočio tek nakon 72 h inkubacije (**Slika 7b**). Pretpostavka je da u ovakvim supernatantima, može doći do aktiviranja različitih gena, kao i do promene nivoa ekspresije koeksprimiranih gena. Kako je jedna od polaznih hipoteza vezana za fenomen RUS-a bila da bi *U. maydis* mogao da koristi specifične ćelijske faktore zadužene isključivo za prerađivanje/obradu toksičnih derivata oslobođenih iz umirućih ćelija, ovi faktori bi mogli biti povišeno ekspimirani u 0,7% SN (i na taj način identifikovani). Očekivano je da se veliki broj gena zaduženih za recikliranje i generalnu zaštitu od stresa indukuje i na manje toksičnom supstratu, u 0,4% SN. Takođe, očekivano je da se među indukovanim genima nađu i oni koji kodiraju hipotetičke proteine ili proteine nepoznate funkcije, a koji su do danas ostali neopisani, upravo zbog toga što nikada nisu ni testirani na sposobnost RUS-a.

Sa Venovog dijagrama koekspresije gena na **Slici 21A** vidimo da je 6297 gena ekspimirano u sve tri grupe, što govori da postoji veliki broj gena koji se ekspimiraju i u normalnim uslovima rasta i u supernatantima 0,4% i 0,7% tretmana. Takođe, što je supstrat toksičniji, to je i veći broj diferencijalno ekspimiranih gena (u 0,4% SN - 110, a u 07% SN - 244 diferencijalno ekspimirana gena u odnosu na kontrolu). Dodatno, najveći broj jedinstveno ekspimiranih gena je u 0,7% SN, 148, znatno više nego u 0,4% SN (14) i kontroli (33).

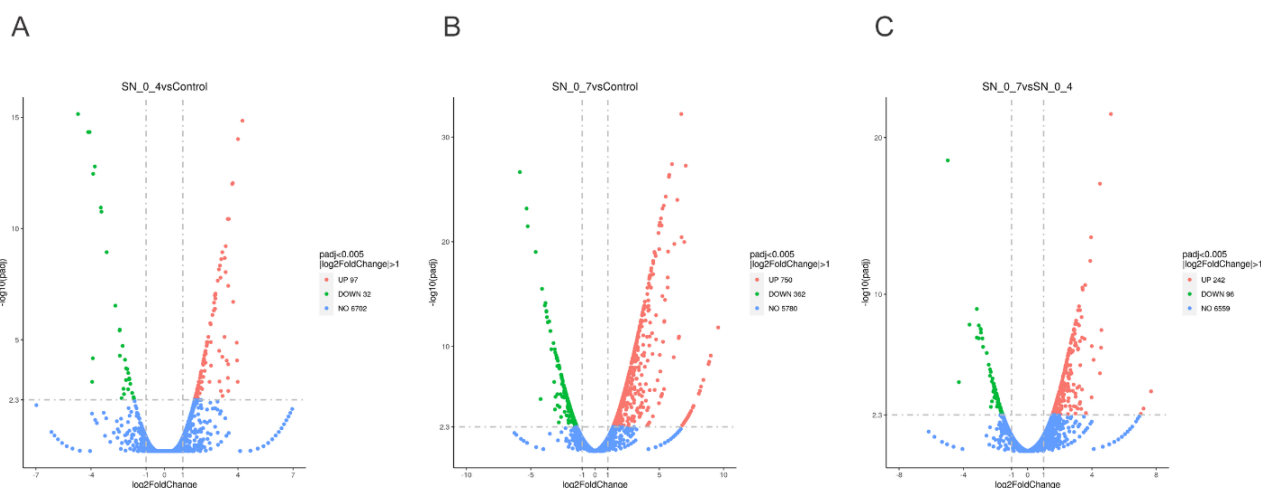


Slika 21 - Venov dijagram koekspresije prikazuje broj gena koji su unikatno ekspimirani u okviru svake grupe/uzorka, kao i broj gena koji su koeksprimirani u dve-tri grupe/uzoraka. SN_0_4 - uzorak tretmana 0,4% SN; SN_0_7 - uzorak tretmana 0,7% SN; Control - kontrola, netretirana grupa. Slike su preuzete iz dokumentacije rezultata bioinformatičke analize kompanije Novogene.

Na **Slici 22** dat je grafički prikaz (engl. „Volcano plot“) diferencijalne promene ekspresije gena u tretmanima u odnosu na kontrolu, kao i u tretmanima međusobno. Grafik pokazuje statističku značajnost detektovane promene (ordinata) i nivo promene ekspresije gena (abscisa). Što je promena ekspresije gena veća, to je tačka koja ga označava pozicionirana više desno (povećana ekspresija) ili više levo (ako je snižena ekspresija). Veća vrednost na ordinati ukazuje na statistički značajniju razliku ($-\log_{10}(\text{korigovana } p \text{ vrednost})$). Može se uočiti da se najveće promene u nivou ekspresije (bilo povećanje ili sniženje) dešavaju u ćelijama iz 0,7% SN (**Slika 22B**).

Detaljnijom analizom statistički značajno diferencijalno eksprimiranih gena je utvrđeno da je u 0,4% SN povećana ekspresija 97 gena (**Slika 22A**) koji kodiraju hipotetičke proteine i putativne proteine. U ovom uzorku je i 32 gena sa smanjenom ekspresijom, među kojima su 23 gena koji kodiraju hipotetičke proteine. U uzorku tretmana 0,7 % SN (**Slika 22B**), broj gena koji su povećano eksprimirani je drastično uvećan, 750 gena (638 hipotetičkih i putativnih). U ovom uzorku je i broj gena koji imaju smanjenu ekspresiju daleko veći (362 gena od toga 344 kodira hipotetičke proteine i putativne proteine) nego u uzorku tretmana manje toksičnim supstratom. Na **Slici 22C** vidimo da je u uzorku 0,7% SN povećano eksprimirano 242 gena koji nisu povećano eksprimirani i u 0,4% SN (201 gen kodira hipotetičke proteine), dok je 97 gena smanjene ekspresije (78 gena kodira hipotetičke proteine) u 0,7% SN u odnosu na 0,4% SN.

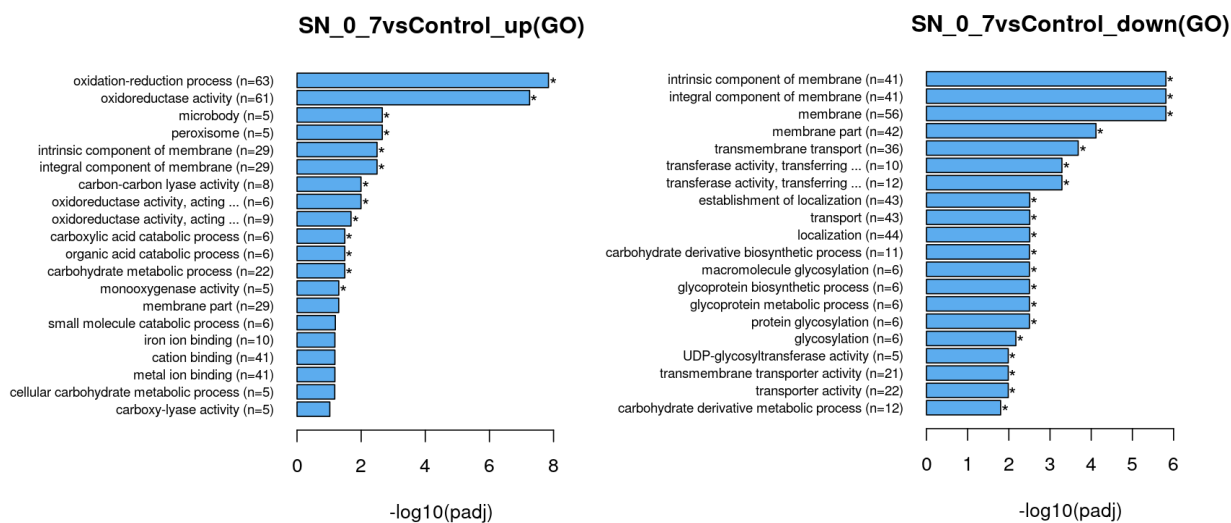
Dakle, moglo bi se zaključiti da je, saglasno očekivanjima, drastičniji tretman (0,7% SN) uslovio promene ekspresije značajno većeg broja gena nego tretman sa manje toksičnim supstratom (0,4%-SN), kao i da je doveo do ekskluzivne indukcije 242 gena (201 hipotetička gena) koji bi mogli biti zaduženi za savladavanje toksičnosti ovog supstrata.



Slika 22 - „Volcano plot“ predstavlja prikaz distribucije diferencijalno eksprimiranih gena. Horizontalna osa predstavlja nivo promene ekspresije gena, a vertikalna statističku značajnost nivoa promene genske ekspresije. Tačke označavaju gene, plava tačka označava gen bez statistički značajne razlike u ekspresiji, crvena označava povećano eksprimirani gen, zelena označava gen sa smanjenim nivoom ekspresije. SN_0_4 - uzorak tretmana 0,4% SN; SN_0_7 - uzorak tretmana 0,7% SN; Control - kontrola, netretirana grupa. UP- povećano eksprimirani geni; DOWN- geni sa smanjenom ekspresijom, NO- ukupan broj eksprimiranih gena. Slike su preuzete iz dokumentacije rezultata bioinformatičke analize kompanije Novogene.

Na **Slici 23** je prikazana funkcionalna analiza diferencijalno eksprimiranih gena. Kao što se moglo i očekivati, s obzirom na uslove velike toksičnosti supstrata, u uzorku tretmana 0,7% SN najviše se povećava ekspresija gena uključenih u oksido-redukcione procese. Takođe, veliki broj povećano eksprimiranih gena je svojom funkcijom vezan za membranu ili su komponente same membrane, a veliki broj gena kodira proteine sa metal-vezujućom funkcijom, kao i one koji su uključeni u metabolizam ugljenih hidrata. S druge strane, najveći broj gena čija je ekspresija statistički značajno

smanjena u 0,7% SN kodira proteine uključene u procese na membrani, transmembranski transport i lokalizaciju.



Slika 23 - GO (engl. Gene Ontology) analiza. Diferencijalno eksprimirani geni kategorisani na osnovu povezanosti sa određenim biološkim procesom, molekularnom funkcijom i ćelijskom lokalizacijom. SN_0_4 - uzorak tretmana 0,4% SN; SN_0_7 - uzorak tretmana 0,7% SN; Control - kontrola, netretirana grupa. UP- povećano eksprimirani geni; DOWN- geni sa smanjenom ekspresijom. Slike su preuzete iz dokumentacije rezultata bioinformatičke analize kompanije Novogene.

Među genima čija je ekspresija povećana u 0,7% SN (1,5 puta) je i *Chk1*, gen koji je identifikovan izolovanjem mutanta mir20. Povećano eksprimirani geni koji su nam od interesa za dalju detaljnu analizu njihove uloge u RUS-u su pre svega oni koji imaju DNK-vezujuće domene ili pretpostavljenu ulogu u remodelovanju hromatina, s obzirom da bi ovakvi geni mogli da pruže jasniji uvid u mehanizme koje ustilago uporedno koristi u cilju eksploatacije supstrata i simultane zaštite genoma u uslovima kada je izložen velikoj geno/toksičnosti. Takođe, od interesa su i geni za koje je pretpostavljeno da imaju ulogu vezanu za endoplazmatični retikulum i endosome, s obzirom da smo već otkrili nekoliko faktora koji su uključeni u RUS, a za koje se zna da su elementi endozomalnog transportnog sistema. Tako su za buduće analize odabrani:

UMAG_01716 (4,2 x povećana ekspresija u SN 0,7%) koji kodira hipotetički protein sa domenom nepoznate funkcije i domenom flavoproteina (FAD akceptor elektrona). Ovaj protein pokazuje visok stepen homologije sa COPII proteinom vezikula gljive reda Ustilaginales.

UMAG_04098 (6,99 x povećana ekspresija u 0,7%SN) koji kodira hipotetički protein sa visokim stepenom homologije sa histon acetiltransferazom, čija je funkcija vezana sa aktivacijom transkripcije.

UMAG_05938 (5,34 x povećana ekspresija u 0,7% SN) sadrži Pirin domen. Ovi proteini su otkriveni i kod prokariota i kod eukariota, međutim njihova funkcija nije poznata. Na humanim ćelijama je pokazano da interaguje sa Bcl3 i NFI pa se pretpostavlja da ima ulogu u regulaciji replikacije i transkripcije [103].

UMAG_04974 (nivo ekspresije dozno-zavisan, 4,27 x u 0,7% SN) kodira hipotetički protein, koji pokazuje visok stepen homologije sa proteinom endoplazmatičnog retikuluma bazidiomicete *Pseudozyma hubeiensis*.

UMAG_02336 (3,066 x povećana ekspresija u 0,7% SN) kodira hipotetički protein sa domenom sličnim konzerviranom domenu membranskog proteina *S. cerevisiae*, a koji je pronađen kod mnogih srodnih gljiva (*Sporisorium graminicola*, *Sporisorium reilianum*, *Ustilago trichiphora*, *Ustilago hordei* i dr.), bakterija i arhea.

UMAG_06503 (dozno-zavisni nivo ekspresije, 4,66 x povećana ekspresija u 0,7% SN) sa domenom nepoznate funkcije i domenom gama/tau subjedinice DNK Polimeraze III. Ovaj gen kodira protein koji ima visok stepen homologije sa proteinom koji je kod *Ustilago trichophora* okarakterisan kao srodan transpozazi.

Gore opisana opšta analiza transkriptoma predstavlja prvi korak ka identifikovanju gena od interesa, tj. gena čija je ekspresija povećana u tretmanima, i ka njihovoj daljoj karakterizaciji i utvrđivanju uloge u recikliranju oksidativno-oštećenih biomolekula.

5 DISKUSIJA

5.1 Uloga LH-a u obnavljanju populacije

Mikroorganizmi su razvili brojne fiziološke mehanizme i ekoevolucione strategije kako bi opstali u nepredvidivim i promenljivim uslovima životne sredine. U uslovima kada usled dugotrajne izloženosti jakom stresu, nagomilana oštećenja nadmaše kapacitet ćelijske popravke, većina ćelija populacije umire. Da bi se sprečila eliminacija iz staništa, ključni zadatak jeste obnova vijabilnosti i porast gustine populacije [104]. Kako bi smo ispitali molekularnu osnovu izuzetnog ekološkog uspeha *Ustilago maydis* u prirodi, krenuli smo sa istraživanjem načina na koji ovaj organizam izložen stresu održava integritet genoma u nepovoljnim stresnim uslovima. Razmatrajući ovo pitanje i mogući metodološki pristup za eksperimentalno istraživanje oporavka od snažnog oksidativnog stresa u uslovima kada nedostatak nutrijenata (gladovanje) sprečava rast, odlučili smo da upotrebimo LH test kao esej koji bi nam omogućio otkrivanje ćelijskih faktora i mehanizama koji leže u osnovi ekološkog i evolucionog fitnesa *U. maydis*. Fenomen LH je opisan u ranim istraživanjima oporavka *S. cerevisiae* i *S. pombe* nakon izlaganja zračenju. Studije na *S. cerevisiae* su pokazale da se vijabilnost ozračenih ćelija povećava ukoliko se ćelije duži period pre zasejavanja na hranljivi medijum inkubiraju u medijumu bez nutrijenata [56]. Prema studijama Patrick-a i saradnika, porast vijabilnosti nakon LH treba pripisati unutarćelijskoj popravci oštećenja indukovanih tretmanom, a ne ćelijskoj multiplikaciji, što je kasnije potvrđeno i fluktuacionim testom [55, 105]. Suprotno *S. cerevisiae*, kod *S. pombe* je pokazano smanjeno preživljavanje kao rezultat LH inkubacije nakon tretmana zračenjem [59]. Na osnovu istraživanja prikazanog u ovom radu, za *U. maydis* se mogu izvesti drugačiji zaključci o uticaju inkubacije u LH uslovima na preživljavanje ćelija koje su pretrpele velika oštećenja: za razliku od *S. pombe*, kod *U. maydis* se udeo vijabilnih ćelija značajno povećava (**Slika 4**), ali za razliku od *S. cerevisiae*, porast vijabilnosti se ne postiže unutarćelijskom reparacijom, nego multiplikacijom ćelija na račun jedinjenja oslobođenih iz mrtvih ćelija (**Slika 5**). Razmatranje ovih rezultata navodi na pretpostavku da bi gubitak vijabilnosti kod *S. pombe* mogao biti posledica kumulativnog efekta ćelijskih oštećenja i toksičnosti isecurelog unutarćelijskog sadržaja, koji je supstrat za ove ćelije. Ukoliko je ova pretpostavka tačna, *U. maydis* bi mogao biti u kompetitivnoj ekološkoj prednosti, zahvaljujući posedovanju ćelijskih mehanizama koji omogućavaju ne samo preživljavanje, nego i iskorišćavanje oštećenih biomolekula.

Oslobađanje unutarćelijskog sadržaja iz oštećenih ćelija je istraživano na različitim model sistemima i u kontekstu oštećenja izazvanih zračenjem, vodonik-peroksidom, etanolom, zamrzavanjem, elektroporacijom [106-110]. Naša studija je pokazala da ćelije *U. maydis*, koje su nakon tretmana peroksidom oštećene i nevijabilne, na dozno-zavisani način oslobađaju unutarćelijska jedinjenja u okolni medijum. Cilj ovog rada nije bio detaljna karakterizacija efekta tretmana peroksidom na nivo ćelijskog curenja, niti precizno utvrđivanje hemijske prirode oslobođenih jedinjenja, nego ispitivanje efekta isecurelog ćelijskog sadržaja na rast neoštećenih ćelija. Naša studija je pokazala da ćelijski sadržaj oslobođen iz ćelija tretiranih peroksidom može da ima oprečan efekat na biološku aktivnost ćelija: ćelijski sadržaj oslobođen pri tretmanu nižim koncentracijama peroksida je imao pozitivan efekat na rast populacije, dok je ćelijski sadržaj indukovani višim koncentracijama peroksida pokazao inhibitoran efekat na rast, koji je mogao da se prevaziđe produžavanjem vremena inkubacije ili povećanjem odnosa netretiranih i tretiranih ćelija (**Slika 7**). Ovo zapažanje, ne samo da je potvrdilo da *ustilago* može da apsorbuje oslobođeni ćelijski materijal iz svoje okoline, nego je i sugerisalo da bi *ustilago* morao da poseduje ćelijske puteve zadužene za obradu toksičnih jedinjenja preuzetih iz okoline. Toksičnost koja se uočava u supstratu

poreklom od visokodoznih tretmana može biti posledica formiranja nekog tipa toksičnih jedinjenja (npr. oksidovanih agregata), ili posledica porasta koncentracije oštećenih biomolekula, koje preživele ćelije više ne mogu da obrade i iskoriste kao nutrijente, ili im je za to potrebno više vremena, pa se tako oporavak/rast uočava tek nakon dužeg perioda inkubacije.

U razmatranju biološkog značaja, fenomen RUS-a bi se mogao posmatrati kao integralni proces koji obuhvata: (1) efiksano recikliranje oštećenih biomolekula oslobođenih iz mrtvih ćelija i (2) stresom indukovanu autodekompoziciju (razgradnju) ćelijskih komponenti oštećenih/umirućih ćelija. Prvi deo procesa je vezan za preživele (vijabilne) ćelije i obuhvata čitav niz koraka (usvajanje, obrada i upotreba mrtve biomase) koji obezbeđuju ćelijsku reprodukciju i rast populacije. Drugi deo RUSa se odvija u nevijabilnim ćelijama i dovodi do degradacije ćelija i oslobađanja ćelijskih molekula [104]. Iako destruktivan, ovaj proces obezbeđuje hranljive resurse za proliferaciju preživelih ćelija. Dakle, postojanje obe grupe ćelija (preživele i umiruće) je nužno kako bi se obnovila devastirana populacija.

Postavilo se pitanje ćelijskih faktora-funkcija-puteva za efikasno recikliranje oštećenih molekula iz mrtve biomase. Identifikovanje ćelijskih faktora uključenih u recikliranje je bilo neophodno za dublje razumevanje molekularne osnove mehanizama u osnovi RUS-a. Pretpostavka je bila da neki od faktora imaju ulogu u prenosu signala i kontroli RUS-a. Postojalo je pitanje uloge ćelijskih faktora uključenih u regularan rast. Posebno interesanta je bila pretpostavka da bi ustilago mogao da poseduje specifične, do sada neopisane, ćelijske faktore zadužene isključivo za obradu i upotrebu toksičnih derivata poreklom iz oštećenih/umrlih ćelija. Ono što ovu pretpostavku čini posebno značajnom, je činjenica da je oko 30% predikovanih gena ustilaga nepoznate funkcije [72]. Ukoliko je ova pretpostavka tačna, verovatno je da funkcije ovih gena još uvek nisu poznate i opisane upravo iz razloga što nikada nisu ni bili testirani na ulogu u RUS-u.

5.2 Uloga identifikovanih ćelijskih faktora u RUS-u

Otkriće da oštećene ćelije oslobađaju u okolinu citoplazmatična jedinjenja koja su ambivalentni izvor nutrijenata i pretpostavka da ćelije *U. maydis* poseduju mašineriju uključenu u reapsorpciju i obradu iscurelog sadržaja, usmerilo je istraživanje ka izolovanju mutanata koji su defektni u ovim ćelijskim procesima. Kao rezultat pretraživanja mutanata identifikovani su ćelijski faktori (proteini *Adr1*, *Did4*, *Kel1*, *Tbp1*) uključeni u RUS, što je predstavljalo inicijalni uvid u molekularnu osnovu ovog ćelijskog procesa kod *U. maydis* (**Slike 12 i 14**). Razmatrajući ove ćelijske faktore i njihove funkcije, uočavamo kompleksnost i diverzitet ćelijskih mehanizama u osnovi RUS-a. Naime, genetičke determinante koje smo identifikovali u našoj analizi imaju već poznate uloge u regulaciji rasta [86], prometu proteina [87], strukturi citoskeleta [88] i transkripciji [89].

Još jedan važan aspekt RUS-a je činjenica da koristi ćelijske faktore sa preklapajućim ulogama u zaštiti integriteta genoma. U našem ispitivanju, mutanti *did4* i *tbp1* su pokazali ekstremnu senzitivnost na agense koji oštećuju DNK (UV i MMS) i HU koja narušava proces replikacije, dok je *kell* pokazao samo blagu senzitivnost na MMS (**Slika 13**). Ovi rezultati su ukazali da neki od ćelijskih faktora uključenih u recikliranje unutarćelijskih jedinjenja, istovremeno funkcionišu u odgovoru ćelije na DNK oštećenja i replikacioni stres. Ovakvi rezultati su u skladu sa očekivanjem da bi jedan od ćelijskih procesa, koji doprinosi savladavanju toksičnosti ćelijskog sadržaja indukovane tretmanom, bila obrada genotoksičnih (mutagenih) komponenti, kao što su oštećeni nukleotidi.

Identifikovanje ovih ćelijskih faktora je dalo inicijalni uvid u kompleksnost mreže ćelijskih puteva uključenih u RUS, ali je i ukazalo na neophodnost identifikovanja dodatnih faktora, posebno onih koji su uključeni u mehanizam preuzimanja nutrijenata, njihove obrade i korišćenja ovih resursa. Pretraživanje mutanata koji su izgubili sposobnost za RUS se pokazalo kao dobar put za

identifikovanje ćelijskih faktora uključenih u ovaj proces. Stoga, naredna istraživanja su bila usmerena na izolovanje novih mutanata, tj. otkrivanje novih ćelijskih faktora, radi boljeg razumevanja molekularne osnove mehanizama za obradu apsorbovanog supstrata poreklom od umrlih ćelija. Kako nam je fokus bio na onim ćelijskim faktorima koji su neophodni za prevazilaženje toksičnosti supstrata i njegovo efiksano recikliranje, nova grupa mutanata je izolovana praćenjem gubitka sposobnosti rasta u visokotoksičnom supstratu. Posledično, profili rasta ovih mutanata se razlikuju od profila rasta mutanata iz prve grupe upravo po potpunom izostanku rasta u visokotoksičnom supstratu. Takođe očekivano, većina mutanata (*snf8*, *slm1*, *chk1*, *hsf1*) je pokazala manju ili veću senzitivnost na genotoksične agense, što potvrđuje značaj zaštite genoma za preživljavanje ćelija u ovakvim uslovima. Identifikovanjem nove grupe mutiranih gena potvrđen je značaj endocitoze i organizovanja citoskeleta u procesu RUS-a, ali je mreža ćelijskih puteva proširena na regulaciju ćelijskog ciklusa, remodelovanje hromatina, posttranslacione modifikacije proteina i odgovor na toplotni stres (engl. „Heat Shock Response”, HSR).

Mutant mir107, defektan u *Adr1*, ima smanjenu sposobnost obnove populacije na račun umrlih ćelija i rezistentan je na genotoksične agense. *Adr1* je katalitička subjedinica PKA (protein kinaza A), koja ima ulogu glavnog regulatora rasta i morfogeneze, kontrole gena koji učestvuju u ćelijskom odgovoru na stres i ulazak u stanje mirovanja (engl. „quiescent state”) [86, 111, 112]. Istraživanja na kvascu su pokazala da PKA detektujući nutritivni status (prisustvo glukoze i drugih šećera) aktivira ekspresiju gena zaduženih za rast [113]. Nutrijenti kod mikroorganizama istovremeno predstavljaju metabolite, ali i signalne molekule koji diktiraju metabolički, transkripcioni i razvojni program koji optimizuju preživljavanje u određenim uslovima [86]. Stoga, u kontekstu RUSa, uloga *Adr1* bi verovatno bila u prenosu signala i kontroli rasta putem regulacije transkripcionog programa u odgovoru na izmenjen nutritivni status. Na budućim istraživanjima ostaje da se ispita da li *Adr1*, kao glavni regulator rasta, svoju ulogu u kontroli RUSa ostvaruje putem uobičajenih ili faktora specifičnih za RUS.

Identifikovana su dva mutanta, mir2 i mir237, koja kodiraju proteine ESCRT kompleksa. Mutant mir2 nosi mutaciju u genu koji kodira *Snf8*, komponentu ESCRT II kompleksa [114], dok je mir237 defektan u proteinu *Did4*, jednom od faktora ESCRTIII kompleksa [87]. Poznato je da su ESCRT kompleksi uključeni u vezikularni transport i putem formiranja multivezikularnih tela posreduju u lizosomalnoj degradaciji oštećenih proteina [90, 115]. Međutim, pored narušene sposobnosti obnove populacije, ova dva mutanta su pokazala i visoku (*did4*) i intermedijernu (*snf8*) senzitivnost na izlaganje genotoksičnim agensima tokom proliferacije. S obzirom da MMS i HU svoj efekat ostvaruju tokom S faze ćelijskog ciklusa, očekivalo bi se da usled mutacije dolazi do zastoja replikacione viljuške. Kod kvasca je identifikovano nekoliko komponenti ESCRT-a (*Vps* faktori, engl. Vacuolar protein sorting) i pridruženih faktora prilikom izolovanja mutanata senzitivnih na radiomimetike, bleomicin i zeocin [116, 117]. Uloga *Vps* faktora u reparaciji DNK je bila dugo zanemarena i nije dovoljno istražena. Moglo bi se pretpostaviti da je uloga *Vps* faktora u uklanjanju oštećenih proteina verovatno neophodna kako bi se uspostavila odgovarajuća struktura hromatina i angažovanje enzima neophodnih za DNK reparaciju. Nedavne studije ukazuju da ESCRT mašinerija ima važnu ulogu u održavanju integriteta nuklearnog omotača, što je konzistentno sa ulogom ESCRT III kompleksa u popravci oštećenja plazma membrane [118, 119]. Ovo otkriće ukazuje da bi ESCRT mogao da ima ogroman značaj za održavanje stabilnosti genoma i vijabilnosti ćelija, s obzirom da su oštećenja jedarne membrane mesta prolaska TREX1 citoplazmatičnih egz nukleaza koje dovode do oštećenja na DNK molekulu [118]. Na osnovu navedenog, moglo bi se zaključiti da je pad vijabilnosti populacije kod ESCRT mutanata, verovatno posledica narušene sposobnosti obrade i sortiranja peptida preuzetih iz oštećenog ćelijskog sadržaja, ali i gubitka integriteta nuklearnog omotača i ćelijske membrane, koji za ćeliju predstavljaju prvu liniju odbrane.

Dodatna potvrda da je mehanizam preuzimanja i obrade supstrata poreklom od mrtvih ćelija zasnovan na formiranju endocitoznih vezikula i aktivnosti članova ESCRT kompleksa dobijena je

testiranjem mutanata 106, 107, 108 i 109 na sposobnost RUS-a. Ovi ćelijski faktori učestvuju u regulaciji sazrevanja ranih endozoma, fuziji endocitoznih membrana, transportu endocitoznih vezikula i kontroli bidirekcinog transporta [99-102]. Sumirano, na osnovu ćelijskih faktora identifikovanih u ovom radu i njihovih pretpostavljenih funkcija kao članova ESCRT kompleksa, može se zaključiti da je ESCRT kompleks ključan za recikliranje usvojenih proteina.

Gubitak sposobnosti obnove populacije mir354 ukazuje da je produkt mutiranog gena, protein Kell itekako važan u ćelijskom procesu recikliranja supstrata poreklom od mrtvih ćelija. Međutim, s obzirom da je Kell slabo istraživani ćelijski faktor, teško je pretpostaviti tačnu ulogu Kell u ovom procesu. Kako je poznato da Kell interaguje sa aktinskim vlaknima, mogla bi se postaviti hipoteza o funkciji Kell u reorganizaciji citoskeleta kako bi se obezbedio usmereni transport vezikula u odgovoru na uslove limitiranih nutrijenata [120]. Dodatna istraživanja su neophodna, kako bi se razumela uloga Kell u procesu RUS-a.

Hipotetički protein Slm1 (mutant mir3) ima funkciju koja objedinjuje uloge ESCRT faktora i Kell proteina. Slm1 je važan nizvodni efektor PIP2 (fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata) i TORC2 (engl. Target Of Rapamycin Complex 2) signalnog puta, koji reguliše brojne procese vezane za plazma membranu, organizaciju citoskeleta, uključujući i endocitozu [92, 121]. Stoga, identifikovanje mutanta Slm1 u RUS-u, potvrđuje značaj svih ovih procesa (endocitoze, vezikularnog transporta i citoskeletne organizacije) za rast i obnavljanje populacije putem apsorbovanja supstrata iz spoljne sredine. Osim toga, novija istraživanja su pokazala da Slm1 kroz regulaciju TORC2 utiče na sintezu i distribuciju sfingolipida plazma membrane u uslovima stresa, tako da bi se doprinos Slm1 proteina u preživljavanju ćelija nakon stresa, mogao objasniti njegovom ulogom u održavanju integriteta i funkcije ćelijske membrane [93, 122]. Pored narušene sposobnosti za RUS, mir3 je pokazao i senzitivnost na genotoksične agense (UV, HU i MMS). Kako su rezultati dve nezavisne studije na *S. cerevisiae* i *S. pombe*, pokazali da TORC2 kompleks ima važnu ulogu u održavanju genomske stabilnosti u odgovoru na oksidativni ili replikativni stres [123, 124], moglo bi se pretpostaviti da ovu svoju funkciju TORC2 ostavruje posredstvom Slm1 proteina.

Mutant mir754 je senzitivan na genotoksične agense i veoma sporo postiže obnovu populacije (RUS), što ukazuje da funkcionisanje mutiranog gena doprinosi DNK reparaciji i korišćenju metabolita iz mrtvih ćelija. Protein Tbp1 je esencijalni transkripcioni faktor koji učestvuje u asembliranju preinicijacionog kompleksa [89], stoga je moguća uloga ovog ćelijskog faktora u RUS putem promovisanja ekspresije proteina zaduženih za popravku oštećenja na DNK molekulu. Šta više, istraživanja pokazuju da bi transkripcioni faktori mogli biti direktnije uključeni u popravku dvolančanih prekida [125-128] putem nekodirajućih RNK koje regulišu popravku, izmenom strukture hromatina [129], ili putem promovisanja sinteze transkripata koji služe kao matrice tokom popravke oštećenja [130]. Međutim, iako fenotip mir754 nedvosmisleno sugerije na povezanost procesa DNK reparacije i RUS-a, potrebna su dalja istraživanja kako bi se dokazala povezanost ova dva procesa i sama uloga Tbp1 faktora.

Koliko je važna zaštita genoma u uslovima izloženosti ćelija toksičnom supstratu, ilustruje činjenica da je kao mutant u RUS-u izolovan mir20, koji ima narušenu funkciju Chk1 kinaze. Chk1 je glavni regulator odgovora na DNK oštećenja (engl. „DNA Damage Response”, DDR) i zadužena je za usporavanje progresije ćelijskog ciklusa kako bi se obezbedilo vreme neophodno za popravku DNK oštećenja i preživljavanje ćelije [95]. Chk1 fosforiliše i usmerava CDC25A, inhibirajući aktivnost CDK2/CDK1 što vodi zaustavljanju ćelijskog ciklusa u intra-S i G2/M tački provere ćelijskog ciklusa (engl. „checkpoints”) [131, 132]. Ulogu u kontroli popravke DNK, CHK1 ostvaruje putem fosforilacije i regrutovanja regulatornih proteina. Npr. poznato je da tokom homologne rekombinacije, Chk1 fosforiliše Rad51, olakšavajući njegovu interakciju sa BRCA2 [133, 134]. Kinaza Chk1 je ključna za preživljavanje ćelije i u odsustvu DNK oštećenja. Poznato je da inhibicija Chk1 aktivira p53 signaling što vodi ćelijskoj smrti posredovanoj kaspazom2 [95, 133]. S obzirom na gore navedene podatke i činjenicu da je u ovom radu mutant u Chk1, mir20, izolovan kroz visoko toksičan supstrat, a pokazao je i izuzetno visoku senzitivnost na genotoksične

agense, očigledno je da Chk1 svoju funkciju u RUS ostvaruje kroz kontrolu ćelijskog ciklusa i održavanje stabilnosti genoma.

Narušena sposobnost obnove populacije mir7, ukazuje na važnost transporetra GDP-manoze u procesu RUS. Ovaj protein obezbeđuje dostavu GDP-manoze u lumen Goldži aparata, što je ključno kako bi se izvršila neophodna manozilacija glikoproteina [94, 135]. Ovakva posttranslaciona obrada proteina je od ključnog značaja za zaštitu ćelije od spoljnih agenasa i adekvantno funkcionisanje, s obzirom da su makromolekuli koji izgrađuju ćelijski zid visoko glikozilovani glikoproteini, tačnije manoproteini [136]. Na haploidnim ćelijama kvasca je pokazano da je esencijalan za ćelijsku vijabilnost, što u našim eksperimentalnim uslovima objašnjava nesposobnost mutanta mir7 da obnovi vijabilnost nakon drastičnog pada populacije. Istraživanja na kvascu su pokazala da Gmt reguliše funkciju Goldži aparata i organizaciju unutarćelijskih membrana [135, 137]. Uzimajući u obzir ove literarne podatke, moglo bi se pretpostaviti da Gmt svoju ulogu u obnavljanju populacije (RUS-u) ostvaruje kroz regulisanje sekretornih puteva i obezbeđivanje pravilno obrađenih proteina, što je neophodno za normalnu funkciju i vijabilnost ćelije.

Mutant mir27 ima narušenu sposobnost RUSa, i ne pokazuje senzitivnost na genotoksične agense. Mutirani gen kodira Snf5 transkripcioni regulator koji je deo SWI/SNF hromatin remodelujućeg kompleksa. Zanimljivo je da su istraživanja na humanim i kvaščevim ćelijama pokazala da Snf5 ima ulogu tumor supresora, i da inhibira preživljavanje ćelija i embrionalni razvoj (humane ćelije) putem abnormalne aktivacije p53 [96, 97]. U kontekstu RUS-a, moglo bi se pretpostaviti da nedostatak ovog faktora dovodi do izmene strukture i funkcije SWI/SNF hromatin remodelujućeg kompleksa, što bi za posledicu moglo da ima narušenu regulaciju ekspresije brojnih nizvodnih faktora uključenih u RUS ili čak prekomernu aktivaciju p53 i posledično smanjeno preživljavanje ćelija. Dodatna istraživanja su neophodna kako bi se utvrdio tačan mehanizam kojim Snf5 ostvaruje ulogu u obnovi vijabilnosti populacije.

Imajući u vidu činjenicu da su mutanti u ovom radu izolovani selekcijom kroz visoko toksični supstrat i da je jedna od ključnih osobina stresirane ćelije upravo povećana ekspresija proteina toplotnog šoka [98], kao glavnih čuvara ćelije u uslovima stresa, nije iznenađujuće da je među identifikovanim faktorima i jedan od Hsf proteina, Hsf1 (mutant mir29). Hsf1 je visoko konzervirani transkripcioni faktor i predstavlja glavni molekularni pokretač transkripcije proteina toplotnog šoka u uslovima stresa i učestvuje u različitim biološkim putevima, uključujući energetske metabolizam, uvijanje i degradaciju proteina, signaling i vezikularni transport [138-142]. Kod kvasca je pokazano da je Hsf1 esencijalan za preživljavanje i u odsustvu stresa. Osim toga, studije na *C. elegans* su pokazale da Hsf predstavlja važnu determinantu dužine života, i da bi targeti Hsf mogli biti važni za identifikovanje gena direktno uključenih u starenje [98, 142, 143]. Imajući u vidu plejotropne efekte koje Hsf1 ostvaruje u ćeliji, potrebna su detaljnija istraživanja tačnog mehanizma putem kojeg Hsf1 ostvaruje ulogu u procesu RUS. Međutim, ono što se može pretpostaviti je da bi izostanak funkcije Hsf1 u uslovima gajenja u visokotoksičnom supstratu, mogao dovesti do prekomerne akumulacije proteina i njihove agregacije, što može dovesti do ćelijske smrti i pada brojnosti populacije [144].

5.3 Analiza transkriptoma

Identifikovanje gena uključenih u mehanizam recikliranja je ključno za razumevanje RUS-a, kao jedne od adaptacija koja bi mogla da omogućiti opstanak *U. maydis* u prirodi. Postavlja se pitanje metodološkog pristupa za identifikovanje ćelijskih faktora sa ulogom u RUS-u. Klasičan molekularno-genetički pristup putem pretrage mutanata koji su izgubili sposobnost rasta u supstratu tretiranih ćelija se pokazao kao dobar način i dao je jasan uvid u mrežu ćelijskih puteva koji su aktivni tokom procesa RUS. Alternativni put za identifikovanje novih faktora uključenih u RUS je bila analiza transkriptoma, s obzirom da smo pretpostavili da bi elementi mašinerije za recikliranje mogli da se specifično indukuju u toksičnom supstratu. Cilj primene uporedne analize transkripcionih profila je bio da se otkriju ćelijski faktori koji su pre svega zaduženi za obradu visokotoksičnog supstrata, s obzirom da bi baš oni istovremeno mogli imati preklapajuću ulogu u zaštiti genoma. Kao rezultat transkripcione analize, identifikovan je veliki broj gena koji kodiraju hipotetičke proteine, a čija je ekspresija drastično uvećana u našim eksperimentalnim uslovima, što ukazuje da su verovatno specifični za RUS. Analiza je pokazala da su tokom RUS-a povećano ekspimirani geni koji su pre svega zaduženi za oksido-redukcijske procese, što je očekivano s obzirom da sam supstrat koji je korišćen u tretmanu ćelija, vodi poreklo od ćelija koje su pretrpele veliki oksidativni stres. Takođe, detektovana je velika promena u nivou ekspresije gena koji su svojom funkcijom vezani za membrane, komponente su membrana ili funkcionišu u membranskom transportu. Ova grupa gena je detektovana kako među povećano ekspimiranim genima, tako među onima sa smanjenim nivoom ekspresije, što ukazuje da se u vremenskom okviru trajanja tretmana visokotoksičnim supstratom (30 min) aktiviraju procesi koji pojačavaju prvu liniju odbrane ćelije od akutnog stresa, a to su zaštita ćelijskih makromolekula i remodelovanje membrane. Među indukovanim genima, izuzev *Chk1*, nisu nađeni geni identifikovani putem izolovanja mutanata klasičnim molekularno-genetičkim pristupom. Moguće objašnjenje jeste činjenica da su prilikom izolovanja mutanata defektnih u RUS-u, ovi mutanati selektovani kroz inkubaciju u supstratu umrlih ćelija nakon 24 h/48 h. Imajući u vidu da se u odgovoru na stres neki geni aktiviraju vrlo rano (engl. „early responsive genes”), dok se drugi aktiviraju kasnije [145], nije moguće uporednom analizom transkriptoma u vremenskom okviru od 30 minuta detektovati sve gene koji su važni za RUS. S druge strane, otkriveni su geni koji imaju DNK-vezujuće domene ili pretpostavljene uloge u remodelovanju hromatina, što ukazuje da bi ovi geni mogli biti novi, tj. do sada neidentifikovani faktori zaduženi za očuvanje genoma tokom RUS-a i potvrđuje značaj zaštite genoma za preživljavanje ćelija nakon stresa. Kako bismo potvrdili validnost dobijenih rezultata, geni koji su detektovani kao visoko indukovani u ovim eksperimentalnim uslovima, biće deletirani, a mutanti testirani na sposobnost RUS-a.

5.4 Autodegradacija i ćelijsko umiranje

Razmatranjem autodegradacije ćelija, kao integralnog dela RUS-a, nameće se pitanje načina ćelijskog umiranja u RUS-u. Poznato je da stresogeni faktori uzrokuju različite tipove ćelijske smrti u zavisnosti od prirode i intenziteta samog stresa, pri čemu su apoptoza i nekroza samo dva ekstrema između čitavog niza prelaznih formi ćelijske smrti [146, 147]. S obzirom da je pokazano da ustilago podleže apoptotskoj smrti po izlaganju slabom oksidativnom stresu [148], istraživanje korelacije između tipa i intenziteta stresa i načina ćelijskog umiranja bi moglo biti posebno interesantno. Sa ekološkog aspekta, očigledna je dobrobit za populaciju od razgradnje nevijabilne biomase. Naime, preživele ćelije imaju nutritivnu korist od oštećenih, nevijabilnih ćelija, s obzirom da dobijaju gotove produkte njihove degradacije, bez utroška sopstvenih resursa na proizvodnju hidrolitičkih enzima koji bi inače vršili razgradnju umrlih ćelija. Sa evolucionog aspekta, brza autodekompozicija i oslobađanje ćelijskog sadržaja bi mogli da obezbede adaptivnu prednost

populaciji, naročito u okruženju siromašnom nutrijentima i u prisustvu kompetitornih mikroorganizama [104]. U prilog ovome su istraživanja na zelenoj algi *C. reinhardtii* i kvascu *S. cerevisiae* koja su pokazala da umiranje ćelija može da dovede do oslobađanja supstanci koje poboljšavaju preživljavanje ostalih ćelija u kulturi [26, 27]. Međutim, ukoliko pretpostavimo da je brza autodekompozicija adaptacija koja obezbeđuje brzu reprodukciju preživelih ćelija u populaciji, ovaj fenomen bi podrazumevao aktivnu, regulisanu smrt jednog dela ćelija u populaciji. S obzirom da je kod jednoćelijskih organizama "smrt jedne ćelije=smrt organizma" isključuje se mogućnost delovanja prirodne selekcije na tu i bilo koju drugu osobinu [104]. Ova konstatacija nameće pitanje načina na koji funkcioniše proces selekcije kada je u pitanju PCD? Ovo pitanje već dugo predstavlja enigmu za evolucioniste, a istraživanja ukazuju da bi populacije mikroorganizama trebalo zapravo posmatrati kao organizam [29].

Pitanje tipa ćelijske smrti u RUS-u je posebno interesantno, s obzirom da je pokazano da od oblika ćelijske smrti zavisi kvalitet oslobođenog ćelijskog sadržaja, što dalje utiče na smanjenje ili povećanje fitnesa drugih ćelija u populaciji [26]. Studije na *C. reinhardtii* su pokazale da je pozitivan efekat produkata oslobođenih putem PCD na fitnes okolnih ćelija specifičan za vrstu, s obzirom da produkti PCD ove vrste inhibiraju rast drugih vrsta roda *Chlamydomonas* [28]. U ovom radu se nismo bavili utvrđivanjem tipa ćelijskog umiranja koji dovodi po pada populacije ustilaga u uslovima inkubacije u supernatantu ćelija tretiranih peroksidom. Međutim, naši eksperimenti na ustilagu pokazuju da su jedinjenja oslobođena iz tretiranih/umirućih ćelija toksičnija pri tretmanima većim dozama stresogenog agensa, kao i pri dužoj inkubaciji nakon tretmana [149]. Osim toga, rezultati ispijanja efekta supernatanta ćelija *U. maydis* tretiranih peroksidom na rast *S. cerevisiae*, ukazuju da ovaj susprtat može da ima inhibitoran efekat na rast kvasca [78]. U ovom kontekstu, moglo bi se zaključiti da bi sposobnost mikroorganizama da prežive i obnove populaciju u nepovoljnim uslovima mogla da bude direktno zavisna od njihovog kapaciteta da obrade produkte umrlih ćelija, što bi direktno zavisilo od tipa stresa i oblika ćelijske smrti. Takođe, u ovoj komparativnoj studiji kvasca i ustilaga je pokazano da *S. cerevisiae* ima nižu stopu autodegradacije u odnosu na ustilaga, i daleko manju sposobnost obnove vijabilnosti u ovom supstratu [78], što ukazuje da bi se autodegradacija ćelija u ovim uslovima mogla dešavati na način specifičan za vrstu [104]. Moguće je pretpostaviti i da su uočene razlike između ove dve evoluciono udaljene vrste posledica njihovih adaptacija na specifične uslove staništa [78]. Prema navedenom, mogli bismo zaključiti da je efikasnost ustilaga u recikliranju oštećenih jedinjenja imala jednu od ključnih uloga za njegov opstanak u aridnim ekosistemima centralne Amerike, koji se smatraju centrom porekla *U. maydis* [67]. Za potvrdu ove hipoteze potrebne su dodatne komparativne studije na većem broju mikroorganizama. Osim toga, bilo bi zanimljivo istražiti autodekompoziciju i oslobađanja ćelijskog sadržaja na *S. pombe*, s obzirom da je kod ovog kvasca pokazan negativan efekat LH inkubacije posle tretmana zračenjem [59, 60].

Kao što je pomenuto, osnovni uslov za opstanak populacije nakon devastacije je postojanje preživelih ćelija koje bi, po uspostavljanju povoljnih uslova, obnovile populaciju. Postavlja se pitanje kako određene ćelije prežive uslove koji dovedu do smrti najvećeg dela populacije? S jedne strane, moguće je da usled neuniformne distribucije stresogenih agenasa u staništu, neke ćelije budu manje izložene dejstvu, npr. UV zračenja, desikacije, temperature itd [104]. Takođe, poznato je da lokalne populacije pokazuju visoku genetičku varijabilnost, stoga bi se moglo pretpostaviti da su neke varijante otpornije na stres. Međutim, mikroorganizmi su razvili i specifične strategije za preživljavanje u nepovoljnoj sredini, a jedna od njih je perzistentnost. Perzistentnost je otkrivena kao osobina jednog manjeg dela, inače genetički homogene, bakterijske populacije da prežive doze antibiotika koje su letalne za najveći deo populacije. Ove ćelije se u normalnim uslovima ne dele, ali po devastaciji populacije one ulaze u fazu brze ćelijske deobe, što dovodi do obnavljanja populacije [22]. Neke studije ukazuju da bi glavni faktor u osnovi perzistentnosti na antibiotik mogao biti usporen ili zaustavljen rast. [150] Ovaj fenomen je potvrđen i kod kvasaca i smatra se da je evoluirao kao mehanizam kako bi se sprečila eradikacija populacije u nepovoljnim uslovima [151-153].

5.5 Hipoksija

Tokom rada na *U. maydis* uočeno je da, ukoliko se prekonoćna kultura prebaci u vodu i inkubira u visokoj gustini i u uslovima ograničene količine kiseonika, populacija doživljava ogroman pad vijabilnosti. Ovo neočekivano otkriće je bilo posebno zanimljivo, s obzirom da inkubacija u istim uslovima nije imala uticaj na vijabilnost populacije *S. cerevisiae*. Dalje istraživanje je usmereno na ispitivanje vijabilnosti ustilaga u vodi u uslovima ograničene dostupnosti kiseonika i pokazano je da populacija *U. maydis* tokom vremena uspeva da uspostavi rast i dostiže inicijalni nivo vijabilnosti u istim uslovima koji su doveli do njenog pada (**Slika 11**). Ovo otkriće je ukazalo da postoje važne fiziološke i biohemijske razlike u ćelijskim mehanizmima koje *U. maydis* i *S. cerevisiae* koriste u uslovima inkubacije u vodi [154]. Kao i u slučaju RUS-a [78], uočene razlike bi mogle ukazati na specifične strategije preživljavanja koje su ove dve evoluciono udaljene vrste gljiva razvile u odgovoru na posebne zahteve njihovih ekoloških niša. S obzirom da je za svako dalje istraživanje ključno bolje poznavanje biologije ustilaga, studija je proširena u smeru istraživanja faktora koji promovišu ili posreduju u indukovanju masovne smrti ćelija u uslovima inkubacije u vodi. Kao rezultat, otkriveno je nekoliko zanimljivih činjenica o biologiji ustilaga u vodi. Kao prvo, pokazano je da je pad brojnosti populacije ustilaga tokom inkubacije u vodi indukovano hipoksijom. Daljom analizom je otkriveno da su ćelije ustilaga u vodi metabolički aktivne i koriste kiseonik. Kako je za *S. cerevisiae* već poznato da u odgovoru na prebacivanje u vodu dolazi do redukcije metaboličke aktivnosti i produžavanja životnog veka [48, 155], očigledno je ovo bio razlog drugačije sudbine ustilaga i kvasca u vodi. Potrebno je naglasiti da događaji koji su doveli do smrti ne bi bili otkriveni primenom konvencionalnih metodoloških pristupa za direktno ispitivanje efekta hipoksije na ćelije, s obzirom da je pad populacije *U. maydis*, koji je bio predmet ove studije, posledica autogenerisane hipoksije. Za dalju diskusiju o ovom otkriću i biološkom značenju uočenih razlika između kvasca i ustilaga, neophodno su dodatna istraživanja fiziologije *U. maydis* u vodi.

Iz ovih eksperimenata se jasno uočava da metabolička aktivnost ustilaga, u uslovima ograničenog snabdevanja kiseonikom, proizvodi hipoksiju i oksidativni stres, što dovodi do masovnog umiranja ćelija i pada brojnosti populacije. Kako su hipoksični uslovi generisani od strane samih ćelija, očigledno je da ustilago iz nekog razloga nije sposoban da zaustavi dalju respiraciju kako bi sprečio uništenje populacije [154]. Postavlja se pitanje zašto ustilago, poput kvasca, ne redukuje svoju metaboličku aktivnost i tako zaustavi umiranje ćelija? Štaviše, uočena smrt ćelija u ovim eksperimentalnim uslovima bi se mogla posmatrati kao forma suicida, pa se nameće pitanje razloga zbog kojih se ustilago opredeljuje za suicidalan odgovor? Međutim, populacija ustilaga uspeva da preživi i opstane. Stoga, može se zaključiti da ustilago primenjuje strategiju koja očigledno donosi dobrobit na nivou populacije, tako da bi suicidalno ponašanje moglo predstavljati evolucionu adaptaciju ustilaga na hipoksične uslove.

Pad brojnosti populacije u uslovima inkubacije u vodi u visokoj gustini ćelija bi se mogao sagledati i iz ugla fenomena tzv. kriptičnog rasta. Kriptični rast je opisan kod *E.coli* i *S. aureus* kao strategija za preživljavanje dugotrajnog gladovanja tokom inkubacije u vodi [42, 46], što delimično odgovara našim eksperimentalnim uslovima. Prema teoriji kriptičnog rasta, preživljavanje dugotrajnog gladovanja se kod *S. aureus* dešava samo pri visokoj gustini ćelija, pri čemu se umiranjem većine ćelija u populaciji obezbeđuju nutrijenti za opstanak male subpopulacije preživelih ćelija tokom narednih nekoliko meseci [29]. U našim eksperimentalnim uslovima, ustilago ne samo da savladava nutritivni stres (inkubacija u vodi), nego je dodatno izložen i hipoksičnim uslovima, a pri tom uspeva već trećeg dana da u istim uslovima uspostavi skoro inicijalnu brojnost populacije (10 x niža nego u normoksičnim uslovima).

Zanimljivo je i zapažanje da u ispitivanim uslovima, uvek jedan manji broj ćelija *U. maydis* preživljava i ostaje vijabilan. Po uspostavljanju aeracije, ove ćelije uspevaju da obnove populaciju do inicijalne brojnosti, što podseća na fenomen nenasledne antibiotske perzistencije. S druge strane,

moguće je da preživele ćelije predstavljaju sporo-rastuće ćelije na koje hipoksija nije uticala. Studije na *Bacillus*-u su pokazale da u odgovoru na gladovanje, jedan manji deo populacije ostaje metabolički aktivan, ali prelazi na oligotrofan, spori rast, zadobija kokoidni oblik i postaje tolerantan na antibiotike. Po uspostavljanju povoljnih nutritivnih uslova, ove sporo-rastuće ćelije *Bacillus*-a se brzo vraćaju na normalan rast [46, 49]. Slično, u našim eksperimentalnim uslovima malobrojne preživele ćelije su sposobne da u potpunosti obnove populaciju po uspostavljanju normalnih (normoksičnih) uslova. Međutim, činjenica da ove ćelije uspostavljaju rast i obnovu populacije i u hipoksičnim uslovima, ukazuje da bi ustilago mogao imati sposobnost prelaska na fermentativan način rasta. Ukoliko je to tačno, ovakav način rasta bi mogao biti važan za invaziju tkiva kukuruza tokom parazitskog stadijuma. U prilog hipotezi je nedavno otkriće spregnutosti kapaciteta patogenih gljiva da inficiraju i kolonizuju domaćina sisara i sposobnosti ovih gljiva da se adaptiraju na različit nivo hipoksije [156]. Interesantno je da je u ovim studijama otkriveno prisustvo etanola u tkivu inficiranom obligatnim aerobima [156, 157].

Kako je ispitivanjem SH supstrata pokazano da ustilago može da obnovi populaciju na račun nutrijenata poreklom od ćelija umrlih usled SH, može se zaključiti da bi RUS mogao biti univerzalni mehanizam koji ustilago koristi u uslovima stresa i neadekvante snabdevenosti nutrijentima. Međutim, ono što je posebno zanimljivo uočiti, jeste da ustilago ne dostiže brojnost 4×10^8 ćelija/mL u hipoksičnim uslovima [154]. Stoga bi se moglo pretpostaviti da ustilago na osnovu detektovanja sredinskih promena (količine raspoloživog kiseonika) i produkcijom određenih signalnih molekula odgovara na sredinske promene regulacijom brojnosti populacije. Ovakvo ponašanje podseća na međućelijsku komunikaciju u okviru dobro organizovane zajednice biofilma.

Prikazana studija preživljavanja ustilaga u hipoksičnim uslovima bi mogla da ima velik značaj u razumevanju ekološkog uspeha ustilaga u prirodi. U prirodnim uslovima se *U. maydis* uglavnom nalazi u zemljištu (saprofit), gde se periodično suočava sa gladovanjem. U periodima poplava životni uslovi postaju posebno ugrožavajući, s obzirom da je tada zemljište dodatno osiromašeno kiseonikom. Kako gasovi, naročito kiseonik, difunduju 10^4 puta sporije kroz vodu nego kroz vazduh, glavni problem u uslovima plavljenja zemljišta je neadekvatno snabdevanje aerobnih mikroorganizama kiseonikom [154, 158]. Moguće je pretpostaviti da bi u ovakvom scenariju došlo do umiranja velike većine populacije *U. maydis*, dok bi samo retke, sporo-rastuće ćelije mogle da prežive. Ove ćelije bi po uspostavljanju dotoka kiseonika mogle da se prebace na regularan rast i obnove čitavu populaciju. U ovakvom kontekstu, moglo bi se zaključiti da je "žrtvovanje" gotovo cele populacije i njena obnova putem reprodukcije malobrojnih preživelih ćelija, verovatno selektovano kao adaptacija na nepredvidive i promenljive sredinske uslove [154].

5.6 Eko-evolucioni značaj RUS-a

Rezultati ove studije imaju značajan doprinos za razumevanje ekološkog uspeha *U. maydis* i evolucione uloge procesa recikliranja mrtve organske materije. Kao slobodnoživeći mikroorganizam i patogena gljiva kukuruza, ustilago je pred velikim izazovom da se izbori sa genotoksičnim stresom kojem je izložen tokom oba životna stadijuma. S obzirom da poseduje veliki kapacitet za DNK reparaciju [63], unutarćelijska popravka DNK oštećenja sigurno u velikoj meri doprinosi uspešnom preživljavanju populacije ustilaga kada nastupe stresni uslovi. Međutim, ova studija otkriva recikliranje mrtve biomase, odnosno RUS, kao veoma važan ćelijski mehanizam koji omogućava preživljavanje i obnovu populacije posle delovanja letalnih doza stresa. Ovo je naročito značajno, s obzirom da RUS funkcioniše kao mehanizam za obnovu populacije bilo nakon tretmana peroksidom, bilo usled hipoksije [149, 154]. Dakle, za RUS se može reći da nije specifični mehanizam zaštite od određenog stresa, nego pre adaptacija koja omogućava oporavak nakon delovanja različitih tipova stresogenih faktora.

Ćelijski procesi u osnovi RUS-a bi mogli imati naročit značaj za uspešnu populacionu dinamiku *U. maydis* u sredinskim uslovima sa limitiranim nutrijentima i kompeticijom za iste od strane drugih mikroorganizama. Identifikovanje ćelijskih faktora uključenih u RUS otkriva mrežu ćelijskih puteva, koji zajedno doprinose obnovi i rastu devastirane populacije. U ovoj studiji je identifikovan veliki broj ćelijskih faktora koji osim što su uključeni u recikliranje, imaju važnu ulogu i u zaštiti genoma. Na osnovu ove činjenice, može se pretpostaviti da bi RUS mogao da obezbedi *U. maydis* snabdevanje nutrijentima i reprodukciju na račun mikroorganizama koji imaju daleko manju rezistentnost u datom ekosistemu, što bi moglo da objasni važnost izuzetne otpornosti ustilaga na agense koji oštećuju DNK molekul. Takođe, u sredini siromašnoj nutrijentima ustilago bi, zahvaljujući svojoj sposobnosti da prevaziđe stres i da se snabde nutrijentima iz mrtve biomase, mogao da ima selektivnu prednost. Sumirano, ovaj mehanizam bi mogao da predstavlja adaptaciju koja povećava fitnes *U. maydis*, s obzirom da mu omogućava da održi rast populacije, posebno u uslovima velikog sredinskog stresa koji bi inače doveo do nestanka populacije [104].

Pored RUS-a, u ovom radu je pokazana još jedna važna strategija preživljavanja *U. maydis*. Naime, tokom inkubacije u vodi, u uslovima ograničene aeracije, metabolička aktivnost ćelija populacije *U. maydis* indukuje sopstveni nagli i drastičan pad brojnosti, a onda malobrojne preživle ćelije uspevaju da obnove populaciju u istim uslovima koji su doveli do njenog pada [154]. Moguće je da održavanje fiziološke heterogenosti populacije kroz produkciju sporo-rastućih, perzistentnih ćelija, predstavlja životnu strategiju koja dugoročno povećava fitnes ustilaga. Tako bi za vreme optimalnih spoljnih uslova većinu populacije činile ćelije koje obezbeđuju njen brz rast i reprodukciju, a u slučaju da nastupe nepovoljni uslovi preživle bi samo perzistentne ćelije. Zahvaljujući posedovanju mehanizma za recikliranje nutrijenata umrlih, degradovanih ćelija, ove sporo-rastuće ćelije bi, bile u kompetitivnoj prednosti u odnosu na druge organizme i uspešno bi obnovile populaciju.

6 ZAKLJUČCI

1. Nakon izlaganja populacije ćelija *Ustilago maydis* oksidativnom stresu dolazi do izraženog porasta broja vijabilnih ćelija i do efikasne obnove populacije, ukoliko se tretirane ćelije duže vremena inkubiraju u vodi. Utvrđeno je da se ova obnova populacije zasniva na sposobnosti preživelih ćelija da za svoju **proliferaciju koriste nutritivni materijal poreklom od umrlih ćelija**.
2. Analiza efekta oslobođenog materijala na rast neoštećenih ćelija je pokazala **oprečnu biološku aktivnost**, ukazujući da bi *U. maydis* morao **posedovati ćelijske mehanizme** uključene u, ne samo reapsorpciju oslobođenih jedinjenja iz spoljašnje sredine, nego i u savladavanje njihove toksičnosti koja je indukovana tretmanom.
3. *U. maydis* je metabolički aktivan u vodi, što u uslovima ograničene dostupnosti kiseonika, generiše hipoksiju i oksidativni stres, koji za posledicu ima masovno umiranje ćelija. Produžena inkubacija u uslovima koji su uzrokovali autogenerisanu hipoksiju i posledični pad vijabilnosti populacije, dovodi do obnove populacije na račun reprodukcije malobrojnih preživelih ćelija. Prema tome, veoma je moguće da je *U. maydis* sposoban da se prebaci na fermentativni način rasta.
4. Pretraživanjem mutanata koji su izgubili sposobnost obnove vijabilnosti, identifikovano je 10 ćelijskih faktora (proteini **Adr1, Did4, Kell, Tbp1, Snf8, Slm1, Chk1, Gmt, Snf5, Hsf1**) koji doprinose procesu. Poznate su uloge identifikovanih ćelijskih faktora u različitim ćelijskim procesima: regulacija ćelijskog ciklusa, rast, vakuolarno sortiranje proteina, organizacija aktinskih filamenata, regulacija genske ekspresije, remodelovanje hromatina, odgovor na toplotni stres, održavanje integriteta ćelijske i nuklearne membrane i stabilnost genoma. Ovi su rezultati ukazali na složenu kombinaciju ćelijskih faktora i procesa čijom se operativnošću postiže efikasna rekonstitucija stresom ruiniranih populacija.
5. Mutanti u genima *Adr1, Did4, Kell, Tbp1, Snf8, Slm1, Chk1, Hsf1* su pokazali senzitivnost na različite genotoksične agense, što ukazuje da su neki od ćelijskih procesa zaduženih za recikliranje oštećenih unutarćelijskih jedinjenja takođe uključeni i u **zaštitu integriteta genoma *U. maydis***.
6. Analiza transkriptoma ćelija inkubiranih u supstratima poreklom od oksidativno-oštećenih biomolekula, je pokazala da se najveća promena ekspresije gena dešava u ćelijama izloženim visokotoksičnom supstratu, te da u ovim ćelijama dolazi do ekskluzivne ekspresije 242 gena, koji bi mogli imati ulogu u savladavanju toksičnosti supstrata. Iz ove grupe su za dalju analizu odabrani geni čija bi uloga mogla biti vezana za održanje integriteta genoma.
7. Dobijeni rezultati imaju značaj u rasvetljavanju **mehanizama obnavljanja populacije *U. maydis* nakon delovanja oksidativnog stresa**.

7 LITERATURA

1. Alder-Rangel, A., et al., *The Third International Symposium on Fungal Stress - ISFUS*. Fungal Biol, 2020. **124**(5): p. 235-252.
2. Andrade-Linares, D.R., A. Lehmann, and M.C. Rillig, *Microbial stress priming: a meta-analysis*. Environ Microbiol, 2016. **18**(4): p. 1277-88.
3. Brewster, J.L., et al., *An osmosensing signal transduction pathway in yeast*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1760-3.
4. Schimel, J., T.C. Balsler, and M. Wallenstein, *Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function*. Ecology, 2007. **88**(6): p. 1386-94.
5. Xu, K.D., et al., *Spatial physiological heterogeneity in Pseudomonas aeruginosa biofilm is determined by oxygen availability*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(10): p. 4035-9.
6. Mehmood, A., et al., *Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review*. Molecules, 2019. **24**(10).
7. Lopez, D., H. Vlamakis, and R. Kolter, *Biofilms*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(7): p. a000398.
8. Rabin, N., et al., *Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents*. Future Med Chem, 2015. **7**(4): p. 493-512.
9. Stewart, P.S. and M.J. Franklin, *Physiological heterogeneity in biofilms*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(3): p. 199-210.
10. Lin, X., et al., *Fungal morphogenesis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **5**(2): p. a019679.
11. Wang, L. and X. Lin, *Morphogenesis in fungal pathogenicity: shape, size, and surface*. PLoS Pathog, 2012. **8**(12): p. e1003027.
12. Brand, A., *Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence*. Int J Microbiol, 2012. **2012**: p. 517529.
13. Roszak, D.B. and R.R. Colwell, *Survival strategies of bacteria in the natural environment*. Microbiol Rev, 1987. **51**(3): p. 365-79.
14. Beskrovnaya, P., et al., *Structural, Metabolic and Evolutionary Comparison of Bacterial Endospore and Exospore Formation*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 630573.
15. Aguilar-Diaz, H., et al., *Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies?* Trends Parasitol, 2011. **27**(10): p. 450-8.
16. Wesener, F. and B. Tietjen, *Primed to be strong, primed to be fast: modeling benefits of microbial stress responses*. FEMS Microbiol Ecol, 2019. **95**(8).
17. Berry, D.B., et al., *Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast*. PLoS Genet, 2011. **7**(11): p. e1002353.
18. Swiecilo, A., *Cross-stress resistance in Saccharomyces cerevisiae yeast--new insight into an old phenomenon*. Cell Stress Chaperones, 2016. **21**(2): p. 187-200.
19. Keszenman, D.J., E. Carmen Candreva, and E. Nunes, *Cellular and molecular effects of bleomycin are modulated by heat shock in Saccharomyces cerevisiae*. Mutat Res, 2000. **459**(1): p. 29-41.
20. Olofsson, H., J. Ripa, and N. Jonzen, *Bet-hedging as an evolutionary game: the trade-off between egg size and number*. Proc Biol Sci, 2009. **276**(1669): p. 2963-9.
21. Grimbergen, A.J., et al., *Microbial bet-hedging: the power of being different*. Curr Opin Microbiol, 2015. **25**: p. 67-72.
22. Balaban, N.Q., et al., *Bacterial persistence as a phenotypic switch*. Science, 2004. **305**(5690): p. 1622-5.
23. Lewis, K., *Persister cells, dormancy and infectious disease*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 48-56.
24. Veening, J.W., et al., *Bet-hedging and epigenetic inheritance in bacterial cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4393-8.

25. Bidle, K.D. and S.J. Bender, *Iron starvation and culture age activate metacaspases and programmed cell death in the marine diatom Thalassiosira pseudonana*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(2): p. 223-36.
26. Durand, P.M., A. Rashidi, and R.E. Michod, *How an organism dies affects the fitness of its neighbors*. Am Nat, 2011. **177**(2): p. 224-32.
27. Herker, E., et al., *Chronological aging leads to apoptosis in yeast*. J Cell Biol, 2004. **164**(4): p. 501-7.
28. Durand, P.M., et al., *Programmed death in a unicellular organism has species-specific fitness effects*. Biol Lett, 2014. **10**(2): p. 20131088.
29. Allocati, N., et al., *Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1609.
30. Gasch, A.P., et al., *Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4241-57.
31. Imai, J., et al., *Proteasomes and molecular chaperones: cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolded proteins*. Cell Cycle, 2003. **2**(6): p. 585-90.
32. Elliott, B., R.S. Haltiwanger, and B. Futcher, *Synergy between trehalose and Hsp104 for thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1996. **144**(3): p. 923-33.
33. Mittler, R., *Abiotic stress, the field environment and stress combination*. Trends Plant Sci, 2006. **11**(1): p. 15-9.
34. Yu, H., Y. Gao, and R. Zhou, *Oxidative Stress From Exposure to the Underground Space Environment*. Front Public Health, 2020. **8**: p. 579634.
35. Farrugia, G. and R. Balzan, *Oxidative stress and programmed cell death in yeast*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 64.
36. Xie, X., et al., *The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant*. Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 9732325.
37. Guan, N., et al., *Microbial response to environmental stresses: from fundamental mechanisms to practical applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2017. **101**(10): p. 3991-4008.
38. Hentges, D.J., *Anaerobes: General Characteristics*, in *Medical Microbiology*, th and S. Baron, Editors. 1996: Galveston (TX).
39. Valko, M., et al., *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*. Mol Cell Biochem, 2004. **266**(1-2): p. 37-56.
40. Wang, Y., et al., *Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling*. J Cell Biol, 2018. **217**(6): p. 1915-1928.
41. Jenkins, D.E., J.E. Schultz, and A. Matin, *Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1988. **170**(9): p. 3910-4.
42. Watson, S.P., M.O. Clements, and S.J. Foster, *Characterization of the starvation-survival response of Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1998. **180**(7): p. 1750-8.
43. Kolter, R., D.A. Siegele, and A. Tormo, *The stationary phase of the bacterial life cycle*. Annu Rev Microbiol, 1993. **47**: p. 855-74.
44. Kjelleberg, S., et al., *How do non-differentiating bacteria adapt to starvation?* Antonie Van Leeuwenhoek, 1993. **63**(3-4): p. 333-41.
45. Ryan, F.J., *Bacterial mutation in a stationary phase and the question of cell turnover*. J Gen Microbiol, 1959. **21**: p. 530-49.
46. Gray, D.A., et al., *Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 890.
47. Reeve, C.A., A.T. Bockman, and A. Matin, *Role of protein degradation in the survival of carbon-starved Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1984. **157**(3): p. 758-63.
48. Cohen, A., et al., *Water-Transfer Slows Aging in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0148650.
49. Nicholson, W.L., et al., *Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(3): p. 548-72.
50. Longo, V.D. and M.P. Mattson, *Fasting: molecular mechanisms and clinical applications*. Cell Metab, 2014. **19**(2): p. 181-92.
51. Aris, J.P., et al., *Autophagy and leucine promote chronological longevity and respiration proficiency during calorie restriction in yeast*. Exp Gerontol, 2013. **48**(10): p. 1107-19.

52. Granot, D., A. Levine, and E. Dor-Hefetz, *Sugar-induced apoptosis in yeast cells*. FEMS Yeast Res, 2003. **4**(1): p. 7-13.
53. Granot, D. and M. Snyder, *Glucose induces cAMP-independent growth-related changes in stationary-phase cells of Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5724-8.
54. Granot, D. and M. Snyder, *Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism*. Yeast, 1993. **9**(5): p. 465-79.
55. Korogodin, V.I., *The study of post-irradiation recovery of yeast: the 'pre-molecular period'*. Mutat Res, 1993. **289**(1): p. 17-26.
56. Patrick, M.H. and R.H. Haynes, *Dark Recovery Phenomena in Yeast. II. Conditions That Modify the Recovery Process*. Radiat Res, 1964. **23**: p. 564-79.
57. Aragao, B.R., A.C. Araujo, and R.A. Gomes, *Simplified fluctuation test to distinguish liquid holding recovery from cell multiplication in ultraviolet-irradiated Escherichia coli*. J Bacteriol, 1980. **144**(3): p. 1176-8.
58. Schall, M. and J. Kiefer, *Delayed Plating Recovery of Diploid Yeast Exposed to Ultraviolet Light Between 254 and 313 nm Wavelength*. Photochemistry and Photobiology, 1988. **47**: p. 155-157.
59. Shahin, M.M., N.E. Gentner, and A. Nasim, *The effect of liquid holding in Schizosaccharomyces pombe strains after gamma and ultraviolet irradiation*. Radiat Res, 1973. **53**(2): p. 216-25.
60. Shahin, M.M. and A. Nasim, *The effect of radiation sensitivity and cell stage on liquid holding response in Schizosaccharomyces pombe*. Mol Gen Genet, 1973. **122**(4): p. 331-8.
61. Harm, W., *Decreased survival resulting from liquid-holding of uv-irradiated Escherichia coli C and Schizosaccharomyces pombe*. Photochem Photobiol, 1968. **8**: p. 179-192.
62. Steinberg, G. and J. Perez-Martin, *Ustilago maydis, a new fungal model system for cell biology*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(2): p. 61-7.
63. Holloman, W.K., J. Schirawski, and R. Holliday, *Towards understanding the extreme radiation resistance of Ustilago maydis*. Trends Microbiol, 2007. **15**(12): p. 525-9.
64. Kunz, B.A., et al., *Plant responses to UV radiation and links to pathogen resistance*. Int Rev Cytol, 2006. **255**: p. 1-40.
65. Kojic, M., et al., *BRCA2 homolog required for proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in Ustilago maydis*. Mol Cell, 2002. **10**(3): p. 683-91.
66. Gladyshev, E. and M. Meselson, *Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(13): p. 5139-44.
67. Stukenbrock, E.H. and B.A. McDonald, *The origins of plant pathogens in agro-ecosystems*. Annu Rev Phytopathol, 2008. **46**: p. 75-100.
68. Vollmeister, E., et al., *Fungal development of the plant pathogen Ustilago maydis*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(1): p. 59-77.
69. Spellig, T., et al., *Control of mating and development in Ustilago maydis*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994. **65**(3): p. 191-7.
70. Feldbrugge, M., et al., *Regulation of mating and pathogenic development in Ustilago maydis*. Curr Opin Microbiol, 2004. **7**(6): p. 666-72.
71. Kojic, M., et al., *The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in Ustilago maydis*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 1043-9.
72. Kamper, J., et al., *Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis*. Nature, 2006. **444**(7115): p. 97-101.
73. Munsterkotter, M. and G. Steinberg, *The fungus Ustilago maydis and humans share disease-related proteins that are not found in Saccharomyces cerevisiae*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 473.
74. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
75. Sambrook, J., E.R. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.)*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
76. Tsukuda, T., et al., *Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from Ustilago maydis*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(9): p. 3703-9.

77. Kretschmer, M., et al., *Acetate provokes mitochondrial stress and cell death in Ustilago maydis*. Mol Microbiol, 2018. **107**(4): p. 488-507.
78. Milisavljevic, M. and M. Kojic, *A comparative study of liquid holding restitution of viability after oxidative stress in Ustilago maydis and Saccharomyces cerevisiae cell populations*. Fungal Genet Biol, 2020. **134**: p. 103284.
79. Guzy, R.D., M.M. Mack, and P.T. Schumacker, *Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and gene transcription in yeast*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(9): p. 1317-28.
80. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11715-20.
81. Vardi, A., et al., *Programmed cell death of the dinoflagellate Peridinium gatunense is mediated by CO(2) limitation and oxidative stress*. Curr Biol, 1999. **9**(18): p. 1061-4.
82. Ross, C., L. Santiago-Vazquez, and V. Paul, *Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. Aquat Toxicol, 2006. **78**(1): p. 66-73.
83. Kohanski, M.A., et al., *A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics*. Cell, 2007. **130**(5): p. 797-810.
84. Davies, B.W., et al., *Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in Escherichia coli*. Mol Cell, 2009. **36**(5): p. 845-60.
85. Durrenberger, F., K. Wong, and J.W. Kronstad, *Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in Ustilago maydis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5684-9.
86. Broach, J.R., *Nutritional control of growth and development in yeast*. Genetics, 2012. **192**(1): p. 73-105.
87. Amerik, A.Y., et al., *The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(10): p. 3365-80.
88. Philips, J. and I. Herskowitz, *Identification of Kel1p, a kelch domain-containing protein involved in cell fusion and morphology in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 1998. **143**(2): p. 375-89.
89. Cormack, B.P. and K. Struhl, *The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells*. Cell, 1992. **69**(4): p. 685-96.
90. Babst, M., et al., *Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body*. Dev Cell, 2002. **3**(2): p. 283-9.
91. Teo, H., et al., *ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes*. Dev Cell, 2004. **7**(4): p. 559-69.
92. Bultynck, G., et al., *Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4729-45.
93. Niles, B.J., et al., *Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(5): p. 1536-41.
94. Dean, N., Y.B. Zhang, and J.B. Poster, *The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31908-14.
95. Neizer-Ashun, F. and R. Bhattacharya, *Reality CHEK: Understanding the biology and clinical potential of CHK1*. Cancer Lett, 2021. **497**: p. 202-211.
96. Sen, P., et al., *Loss of Snf5 Induces Formation of an Aberrant SWI/SNF Complex*. Cell Rep, 2017. **18**(9): p. 2135-2147.
97. Xu, Y., W. Yan, and X. Chen, *SNF5, a core component of the SWI/SNF complex, is necessary for p53 expression and cell survival, in part through eIF4E*. Oncogene, 2010. **29**(28): p. 4090-100.
98. Anckar, J. and L. Sistonen, *Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 1089-115.

99. Haag, C., T. Pohlmann, and M. Feldbrugge, *The ESCRT regulator Did2 maintains the balance between long-distance endosomal transport and endocytic trafficking*. PLoS Genet, 2017. **13**(4): p. e1006734.
100. Wedlich-Soldner, R., et al., *A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus Ustilago maydis*. EMBO J, 2000. **19**(9): p. 1974-86.
101. Gohre, V., et al., *Microtubule-dependent membrane dynamics in Ustilago maydis: Trafficking and function of Rab5a-positive endosomes*. Commun Integr Biol, 2012. **5**(5): p. 485-90.
102. Bielska, E., et al., *Hook is an adapter that coordinates kinesin-3 and dynein cargo attachment on early endosomes*. J Cell Biol, 2014. **204**(6): p. 989-1007.
103. Dechend, R., et al., *The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators*. Oncogene, 1999. **18**(22): p. 3316-23.
104. Kojic, M. and M. Milisavljevic, *When disaster strikes: Reconstitution of population density by expansion of survivors*. Mol Ecol, 2020. **29**(24): p. 4757-4764.
105. Patrick, M.H., R.H. Haynes, and R.B. Uretz, *Dark Recovery Phenomena in Yeast. 1. Comparative Effects with Various Inactivating Agents*. Radiat Res, 1964. **21**: p. 144-63.
106. Swenson, P.A., *Substrate-dependent ultraviolet dosage response patterns of phosphate uptake by yeast*. Arch Biochem Biophys, 1958. **74**(1): p. 139-49.
107. Brunk, U.T., et al., *Exposure of cells to nonlethal concentrations of hydrogen peroxide induces degeneration-repair mechanisms involving lysosomal destabilization*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(6): p. 813-22.
108. Salgueiro, S.P., I. Sa-Correia, and J.M. Novais, *Ethanol-Induced Leakage in Saccharomyces cerevisiae: Kinetics and Relationship to Yeast Ethanol Tolerance and Alcohol Fermentation Productivity*. Appl Environ Microbiol, 1988. **54**(4): p. 903-9.
109. Sinskey, T.J. and G.J. Silverman, *Characterization of injury incurred by Escherichia coli upon freeze-drying*. J Bacteriol, 1970. **101**(2): p. 429-37.
110. Aronsson, K., U. Ronner, and E. Borch, *Inactivation of Escherichia coli, Listeria innocua and Saccharomyces cerevisiae in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing*. Int J Food Microbiol, 2005. **99**(1): p. 19-32.
111. Gray, J.V., et al., *"Sleeping beauty": quiescence in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 187-206.
112. De Virgilio, C., *The essence of yeast quiescence*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(2): p. 306-39.
113. Kunkel, J., X. Luo, and A.P. Capaldi, *Integrated TORC1 and PKA signaling control the temporal activation of glucose-induced gene expression in yeast*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3558.
114. Carrasquillo, R., et al., *SNF8, a member of the ESCRT-II complex, interacts with TRPC6 and enhances its channel activity*. BMC Cell Biol, 2012. **13**: p. 33.
115. Umaer, K. and J.D. Bangs, *Late ESCRT machinery mediates the recycling and Rescue of Invariant Surface Glycoprotein 65 in Trypanosoma brucei*. Cell Microbiol, 2020. **22**(11): p. e13244.
116. Aouida, M., et al., *A genome-wide screen in Saccharomyces cerevisiae reveals altered transport as a mechanism of resistance to the anticancer drug bleomycin*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1102-9.
117. Krol, K., et al., *A genomic screen revealing the importance of vesicular trafficking pathways in genome maintenance and protection against genotoxic stress in diploid Saccharomyces cerevisiae cells*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120702.
118. Ventimiglia, L.N. and J. Martin-Serrano, *ESCRT machinery: Damage control at the nuclear membrane*. Cell Res, 2016. **26**(6): p. 641-2.
119. Baldys, A. and J.R. Raymond, *Critical role of ESCRT machinery in EGFR recycling*. Biochemistry, 2009. **48**(40): p. 9321-3.
120. Care, A., et al., *A synthetic lethal screen identifies a role for the cortical actin patch/endocytosis complex in the response to nutrient deprivation in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2004. **166**(2): p. 707-19.
121. Riggi, M., et al., *TORC2 controls endocytosis through plasma membrane tension*. J Cell Biol, 2019. **218**(7): p. 2265-2276.

122. Berchtold, D., et al., *Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(5): p. 542-7.
123. Schonbrun, M., et al., *TORC2 is required to maintain genome stability during S phase in fission yeast*. J Biol Chem, 2013. **288**(27): p. 19649-60.
124. Shimada, K., et al., *TORC2 signaling pathway guarantees genome stability in the face of DNA strand breaks*. Mol Cell, 2013. **51**(6): p. 829-39.
125. Lee, H.C., et al., *qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage*. Nature, 2009. **459**(7244): p. 274-7.
126. Chowdhury, D., Y.E. Choi, and M.E. Brault, *Charity begins at home: non-coding RNA functions in DNA repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(3): p. 181-9.
127. Wei, L., et al., *DNA damage during the G0/G1 phase triggers RNA-templated, Cockayne syndrome B-dependent homologous recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(27): p. E3495-504.
128. Ohle, C., et al., *Transient RNA-DNA Hybrids Are Required for Efficient Double-Strand Break Repair*. Cell, 2016. **167**(4): p. 1001-1013 e7.
129. Bonetti, D., et al., *Tbf1 and Vid22 promote resection and non-homologous end joining of DNA double-strand break ends*. EMBO J, 2013. **32**(2): p. 275-89.
130. Keskin, H., et al., *Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 436-9.
131. Wang, J.L., et al., *CHK1-regulated S-phase checkpoint response reduces camptothecin cytotoxicity*. Cell Cycle, 2002. **1**(4): p. 267-72.
132. Zhao, H., J.L. Watkins, and H. Piwnicka-Worms, *Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14795-800.
133. Bahassi, E.M., et al., *The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage*. Oncogene, 2008. **27**(28): p. 3977-85.
134. Parsels, L.A., et al., *Gemcitabine sensitization by checkpoint kinase 1 inhibition correlates with inhibition of a Rad51 DNA damage response in pancreatic cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(1): p. 45-54.
135. Jigami, Y.a.Y.-o., T., *Glycobiology of yeast*. In "Comprehensive Glycoscience, , 2007. **4**: p. 111-119.
136. Tofalo, R. and G. Suzzi, *Yeasts*, in *Encyclopedia of Food and Health*. 2016, Academic Press.
137. Poster, J.B. and N. Dean, *The yeast VRG4 gene is required for normal Golgi functions and defines a new family of related genes*. J Biol Chem, 1996. **271**(7): p. 3837-45.
138. Sorger, P.K. and H.R. Pelham, *Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation*. Cell, 1988. **54**(6): p. 855-64.
139. Gallo, G.J., H. Prentice, and R.E. Kingston, *Heat shock factor is required for growth at normal temperatures in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(2): p. 749-61.
140. Morano, K.A., et al., *A trans-activation domain in yeast heat shock transcription factor is essential for cell cycle progression during stress*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 402-11.
141. Imazu, H. and H. Sakurai, *Saccharomyces cerevisiae heat shock transcription factor regulates cell wall remodeling in response to heat shock*. Eukaryot Cell, 2005. **4**(6): p. 1050-6.
142. Hahn, J.S., et al., *Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(12): p. 5249-56.
143. Garigan, D., et al., *Genetic analysis of tissue aging in Caenorhabditis elegans: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation*. Genetics, 2002. **161**(3): p. 1101-12.
144. Maisonneuve, E., B. Ezraty, and S. Dukan, *Protein aggregates: an aging factor involved in cell death*. J Bacteriol, 2008. **190**(18): p. 6070-5.
145. Tullai, J.W., et al., *Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 23981-95.
146. Jimenez, C., et al., *Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte Dunaliella viridis exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity DEVDase*. J Exp Bot, 2009. **60**(3): p. 815-28.
147. Papucci, L., et al., *Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending on c-myc and bcl-2 expression*. Cell Tissue Res, 2004. **316**(2): p. 197-209.

148. Mukherjee, D., et al., *Induction of apoptosis-like cell death and clearance of stress-induced intracellular protein aggregates: dual roles for Ustilago maydis metacaspase Mca1*. Mol Microbiol, 2017. **106**(5): p. 815-831.
149. Milisavljevic, M., et al., *Bioavailability of Nutritional Resources From Cells Killed by Oxidation Supports Expansion of Survivors in Ustilago maydis Populations*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 990.
150. Van den Bergh, B., M. Fauvart, and J. Michiels, *Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters*. FEMS Microbiol Rev, 2017. **41**(3): p. 219-251.
151. Bojsen, R., et al., *A common mechanism involving the TORC1 pathway can lead to amphotericin B-persistence in biofilm and planktonic Saccharomyces cerevisiae populations*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21874.
152. Lewis, K., *Persister cells and the riddle of biofilm survival*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(2): p. 267-74.
153. Li, Y. and Y. Zhang, *PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(6): p. 2092-9.
154. Petkovic, J., M. Kojic, and M. Milisavljevic, *Self-Generated Hypoxia Leads to Oxidative Stress and Massive Death in Ustilago maydis Populations under Extreme Starvation and Oxygen-Limited Conditions*. J Fungi (Basel), 2021. **7**(2).
155. Fabrizio, P. and V.D. Longo, *The chronological life span of Saccharomyces cerevisiae*. Methods Mol Biol, 2007. **371**: p. 89-95.
156. Grahl, N. and R.A. Cramer, Jr., *Regulation of hypoxia adaptation: an overlooked virulence attribute of pathogenic fungi?* Med Mycol, 2010. **48**(1): p. 1-15.
157. Himmelreich, U., et al., *Cryptococcomas distinguished from gliomas with MR spectroscopy: an experimental rat and cell culture study*. Radiology, 2001. **220**(1): p. 122-8.
158. Armstrong, W., *Aeration in Higher Plants*. Eutectic Solv. Stress Plants, 1980. **7**: p. 225-332.

BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Malešević (rođena Petković) je rođena 01.06.1990. u Sremskoj Mitrovici. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2009. a diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9.0. Master akademske studije je završila 2014. godine na Biološkom fakultetu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, modul Imunobiologija, sa prosečnom ocenom 9.83. Master rad pod nazivom „Dinamika histomorfoloških promena mišića kvadricepsa pacova nakon povrede femoralnog nerva i rekonstrukcije tehnikom termino-terminalne anastomoze” je uradila na odeljenju za kliničku i eksperimentalnu imunologiju Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Iste godine je počela volonterski rad na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka. Doktorske studije je upisala 2015. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota, pod mentorstvom dr Mire Milisavljević. Od februara 2016. godine je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Učestvovala je na nacionalnom projektu „Molekularni mehanizmi odgovora biljaka na abiotički stres-uloga transkripcionih faktora i malih RNK i analiza genetičkog diverziteta biljnih kultura od interesa za poljoprivredu i biotehnologiju (173005)”. Bila je učesnik na međunarodnom projektu „Dss1’s roles in genome integrity and protein oxidative damage control, ICGEB Italy (CRP/YUG14-01)”.

Do sada je objavila dva rada u časopisima međunarodnog značaja i imala je dva kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i jedno saopštenje na nacionalnom naučnom skupu.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Малешевић (рођена Петковић)

број индекса М3007/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Идентификовање и карактеризација ћелијских фактора укључених у процес обнављања популације ћелија *Ustilago maydis* наком оксидативног стреса

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Малешевић (рођена Петковић)

Број индекса М3007/2015

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Идентификовање и карактеризација ћелијских фактора укључених у процес обнављања популације ћелија *Ustilago maydis* наком оксидативног стреса

Ментор др Мира Милисављевић и др Светлана Радовић

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Идентификовање и карактеризација ћелијских фактора укључених у процес обнављања популације ћелија *Ustilago maydis* наком оксидативног стреса

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.