

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Stefan G. Stanovčić

Novi ćelijski faktori uključeni u zaštitu genoma i obnovu populacije ćelija *Ustilago maydis* nakon genotoksičnog i citotoksičnog stresa

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Stefan G. Stanovčić

**Novel cellular factors involved in genome
protection and population recovery of *Ustilago
maydis* following genotoxic and cytotoxic stress**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

dr Milorad Kojić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Branko Jovčić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Mira Milisavljević, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Biljana Nikolić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Marija Savić Veselinović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

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

Zahvaljujem se svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ove doktorske disertacije:

Mentoru dr Miloradu Kojiću na ukazanom povjerenju i podršci, bezrezervnom dijeljenju znanja i entuzijazma prema nauci, nepresušnom strpljenju i razumijevanju, kao i nesebičnoj pomoći i uloženom trudu.

Dr Miri Milisavljević na ukazanom povjerenju i podršci u trenucima kada je to bilo od velikog značaja, kao i na prenesenom znanju, savjetima i pomoći tokom čitave izrade ove doktorske disertacije.

Mentoru dr Branku Jovčiću na vrijednim sugestijama koje su doprinijele realizaciji ove doktorske disertacije.

Dr Biljani Nikolić i dr Mariji Savić Veselinović na temeljnom čitanju rukopisa i sugestijama koje su doprinijele kvalitetu ove doktorske disertacije.

Koleginicama Nataliji Azanjac i Maši Terzović na prijateljstvu, snažnoj podršci i pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i na tome što su uvijek bile osobe na koje sam mogao da se oslonim i u koje sam imao puno povjerenje, te što su laboratorijsku svakodnevnicu učinile još mnogo ljepšom.

Dr Jeleni Samardžić na razumijevanju, ukazanom povjerenju, podršci, kao i na prijateljskim savjetima i brizi o realizaciji ove doktorske disertacije.

Svim sadašnjim i bivšim članovima laboratorije 08 sa kojima sam dijelio svakodnevnicu, na iskrenoj spremnosti da pomognu kad god je bilo potrebno, da nesebično pruže savjet i podršku. Posebno hvala koleginicama Jeleni Petković Malešević na podršci i uvođenju u tematiku, i Ani Trifković Menković na pomoći pri izolaciji mutanta i eksperimentalnom radu.

Mladim snagama laboratorije 08, Ivani, Sofiji, Ani, Dejani i Katarini, na razgovorima, lijepom druženju i kreiranju odlične atmosfere za rad.

I na kraju, neizmjernu zahvalnost na strpljenju, bezuslovnoj podršci, razumijevanju i ljubavi dugujem svojim roditeljima Goranu i Svetlani, kao i svojoj braći Marku i Đorđu, bez kojih ništa od ovoga ne bi bilo moguće i kojima i posvećujem ovu disertaciju.

Spisak skraćenica:

AF	alelska frekvencija
ATP	adenozin tri fosfat
BAM	binarni fajl poravnanja sekvenci (engl. „ <i>binary alignment/map</i> “)
BER	popravka isecanjem baze (engl. „ <i>base excision repair</i> “)
CoA	koenzim A (engl. „ <i>coenzim A</i> “)
CS	ćelijske suspenzije (engl. „ <i>cell suspension</i> “)
DEB	diepoksi butan
DNB	DNK nanoloptyce (engl. „ <i>DNA nanoballs</i> “)
DUF	domen nepoznate funkcije (engl. „ <i>domain of unknown function</i> “)
ESCRT	endozomalni sortirajući kompleks neophodan za transport (engl. „ <i>endosomal sorting complex required for transport</i> “)
HR	homologna rekombinacija
HU	hidroksiurea
LA	Luria-Bertani agar
LB	Luria-Bertani
MMS	metilmetan sulfonate
NAT	nourseothricin
NER	popravka isecanjem nukleotida (engl. „ <i>nucleotide excision repair</i> “)
NHEJ	nehomologna popravka DNK krajeva (engl. „ <i>non-homologous end joining</i> “)
ORF	otvoreni okvir čitanja (engl. „ <i>open reading frame</i> “)
Pan	pantotenat
PCD	programirana ćelijska smrt (engl. „ <i>programmed cell death</i> “)
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. „ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PFGE	elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. „ <i>pulsedfield gel electrophoresis</i> “)
PI	propidijumjodid
PT	peroksid tretiran
Rgs	RUS genotoksin senzitivni
ROS	reaktivne kiseonične vrste (engl. „ <i>reactive oxygen species</i> “)
RUS	repopulacija nakon razaranja (engl. „ <i>repopulation upon shattering</i> “)
SGH	samogenerisana hipoksija

SN	supernatanti
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. „ <i>single nucleotide polymorphism</i> “)
TOR	meta rapamicina (engl. „ <i>target of rapamycin</i> “)
UMAG	<i>Ustilago maydis</i> identifikator gena (engl. „ <i>Ustilago maydis annotation gene</i> “)
USP	ubikvitin specifična proteaza
UV	ultraljubičasto svetlo (engl. „ <i>ultra violet light</i> “)
VCF	format za zapis varijanti (engl. „ <i>variant call format</i> “)
WGS	sekvenciranje cijelih genoma (engl. „ <i>whole genome sequencing</i> “)
WT	divlji soj (engl. „ <i>wild-type</i> “)
YEPS	kvasčev ekstrakt pepton saharoza (engl. „ <i>yeast extract peptone succrose</i> “)
YEPSA	kvasčev ekstrakt pepton saharoza agar (engl. „ <i>yeast extract peptone succrose agar</i> “)

Novi ćelijski faktori uključeni u zaštitu genoma i obnovu populacije ćelija *Ustilago maydis* nakon genotoksičnog i citotoksičnog stresa

Sažetak:

Ustilago maydis predstavlja model za proučavanje oporavka populacija mikroorganizama nakon intenzivnog stresa i masovnog gubitka vijabilnosti. Ovaj proces, označen kao RUS (engl. „repopulation upon shattering“), zasniva se na sposobnosti preživjelih ćelija da usvajaju i recikliraju materijal oslobođen iz mrtvih ćelija. U zavisnosti od tipa i intenziteta stresa, ovi supstrati mogu sadržati i inhibitorne komponente, što otežava oporavak populacije. Cilj ovog rada bio je da se ispita povezanost između RUS fenomena i očuvanja genomske stabilnosti, kao i uticaj tipa ćelijske smrti na kvalitet oslobođenih supstrata.

Pokazano je da supernatanti iz nekrotično umrlih ćelija indukuju oštećenja DNK, što ukazuje na njihov genotoksični potencijal. Analiza mutanata je pokazala da većina faktora homologne rekombinacije i ekscizione reparacije ima ograničen značaj u RUS-u, dok gubitak regulatornih komponenti (Dss1, Rec1, Atr1) značajno usporava rast. Identifikovani su i novi faktori (Ndx1, Pir1, Rdf1), čiji nedostatak dovodi do izraženog RUS defektog fenotipa i povećane osjetljivosti na genotoksične agense, kao i dodatni faktori (Leu4, Myo2, Lec1, Usp1), uključeni u vezikularni transport, ubikvitin-zavisnu regulaciju i metabolizam.

Dalje je pokazano da samogenerisana hipoksija (SGH) indukuje programiranu ćelijsku smrt (PCD), čiji produkti ne ispoljavaju inhibitorni efekat, već mogu ublažiti toksičnost nekromase nastale nekrozom i omogućiti inicijalni oporavak populacije. Ovi efekti nisu ograničeni na *U. maydis*, već se uočavaju i kod srodnih vrsta.

Ovi rezultati ukazuju da oporavak populacije zavisi od koordinisanog djelovanja mehanizama očuvanja genomske stabilnosti, stabilnosti proteina i unutarćelijskog transporta, kao i od kvaliteta supstrata određenog tipom ćelijske smrti.

Ključne reči: Repopulation upon shattering (RUS), stabilnost genoma, programirana ćelijska smrt (PCD), nekromasa, *Ustilago maydis*,

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Novel cellular factors involved in genome protection and population recovery of *Ustilago maydis* cells following genotoxic and cytotoxic stress

Abstract:

Ustilago maydis represents a model organism for studying recovery of microbial populations following severe stress and massive loss of viability. This process, termed RUS (repopulation upon shattering), is based on the ability of surviving cells to assimilate and recycle material released from dead cells. Depending on stress type and intensity, these substrates may contain inhibitory components that hinder population recovery. This study aimed to investigate the relationship between RUS and genome stability, as well as the impact of the mode of cell death on substrate quality.

Supernatants from cells killed by necrotic death induced DNA damage, indicating genotoxicity. Mutant analysis showed that most homologous recombination and excision repair factors play a limited role in RUS, whereas loss of key regulatory components (Dss1, Rec1, Atr1) significantly impaired growth. Novel factors (Ndx1, Pir1, Rdf1) were identified, whose deletion caused a pronounced RUS impaired phenotype and increased sensitivity to genotoxic agents, along with additional factors (Leu4, Myo2, Lec1, Usp1) involved in vesicular transport, ubiquitin-dependent regulation, and metabolism.

Self-generated hypoxia was shown to induce programmed cell death (PCD), whose products did not exert inhibitory effects but alleviated the toxicity of necromass generated by necrosis and enabled initial population recovery. These effects were also observed in related species.

Taken together, these results indicate that population recovery depends on coordinated action of genome stability maintenance, proteostasis, and intracellular transport, as well as on substrate quality determined by the mode of cell death.

Keywords: Repopulation upon shattering (RUS), genome stability, programmed cell death (PCD), necromass, *Ustilago maydis*

Scientific field: Biology

Narrow scientific field: Molecular biology of eukaryotes

Sadržaj:

1	Uvod.....	1
1.1	Polazne napomene	1
1.2	<i>Ustilago maydis</i>	1
1.3	Mehanizmi i strategije odgovora mikroorganizama na nepovoljne uslove sredine	3
1.4	Adaptacije, smrt i proces obnavljanja populacije nakon drastičnog mortaliteta	5
1.5	Obnavljanje populacije nakon izlaganja subletalnom stresu (RUS)	6
1.5.1	Destruktivna faza RUS procesa	8
1.5.2	Programirana ćelijska smrt – PCD.....	9
1.5.3	Preživljavanje dijela populacije	10
1.5.4	Konstruktivna faza RUS procesa	12
1.6	Samogenerisana hipoksija (SGH).....	13
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	15
3	Materijal i metode	16
3.1	Organizmi, sojevi, vektori i uslovi gajenja.....	16
3.1.1	Sojevi, vektori i hranljivi medijumi	16
3.1.2	Gajenje <i>U. maydis</i> ćelija	17
3.1.3	Gajenje i održavanje bakterijskih kultura	17
3.2	Priprema ćelija i određivanje preživljavanja	17
3.2.1	Priprema početne ćelijske suspenzije za tretmane	17
3.2.2	Semikvantitativno određivanje senzitivnosti i preživljavanja ćelija.....	17
3.3	Stres tretmani ćelija <i>U. maydis</i>	17
3.3.1	Tretman vodonik-peroksidom (oksidativni stres).....	17
3.3.2	Tretman UV zračenjem.....	18
3.3.3	Tretman metil-metansulfonatom (MMS).....	18
3.3.4	Tretman ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja.....	18
3.3.5	Tretman desikacijom.....	18
3.4	Priprema RUS/SGH supernatanata.....	18
3.4.1	Priprema RUS supernatanata porijeklom od ćelija tretiranih vodonik peroksidom 18	
3.4.2	Priprema supernatanata porijeklom od ćelija umrlih u samogenerisanoj hipoksiji	19
3.5	Priprema i transformacija ćelija.....	19
3.5.1	Protoplastiranje i transformacija ćelija <i>U. maydis</i>	19
3.5.2	Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju metodom toplotnog šoka	20
3.5.3	Priprema elektrokompetentnih ćelija <i>E. coli</i> za elektroporaciju	21

3.5.4	Transformacija ćelija <i>E. coli</i> metodom toplotnog šoka	21
3.5.5	Transformacija ćelija <i>E. coli</i> elektroporacijom	21
3.6	Analize oštećenja DNK i tipa ćelijske smrti	22
3.6.1	Alkalni Komet test	22
3.6.2	Elektroforeza u homogenom električnom polju sa promjenom smijera	22
3.6.3	Detekcija apoptotičnih i nekrotičnih ćelija (Aneksin V/PI)	23
3.7	Molekularno-genetičke metode	24
3.7.1	Izolacija genomske DNK iz <i>U. maydis</i>	24
3.7.2	Alternativna procedura izolacije genomske DNK (za uzorke pripremane za sekvenciranje)	24
3.7.3	Izolacija plazmidne DNK iz <i>E. coli</i>	24
3.7.4	Elektroforeza DNK na agaroznom gelu	25
3.7.5	Prečišćavanje DNK pomoću natrijum-acetata i apsolutnog etanola	25
3.7.6	Prečišćavanje DNK fragmenata iz agaroznog gela	25
3.7.7	Digestija DNK restrikcionim enzimima	25
3.7.8	Ligacija DNK lanaca	26
3.7.9	Reakcija lančanog umnožavanja fragmenata DNK	26
3.8	UV mutageneza divljeg soja <i>U. maydis</i> UIMG10 i izolacija Rgs mutanata	29
3.9	Identifikacija i funkcionalna karakterizacija mutiranih gena	30
3.9.1	Identifikacija gena komplementacionim kloniranjem	30
3.9.2	Transfer delecionihi alela u ćelije suprotnog pola putem mejotičke segregacije	30
3.9.3	Konstrukcija delecionihi (knock-out) sojeva <i>U. maydis</i>	31
3.10	Sekvenciranje cijelih genoma	32
3.10.1	Fragmentacija genomske DNK	33
3.10.2	Popravka krajeva, A-tailing i ligacija adaptera	33
3.10.3	Cirkularizacija biblioteke i priprema DNK nanooptika	33
3.10.4	Učitavanje DNB i sekvenciranje	33
3.10.5	Bioinformatička obrada podataka sekvenciranja cijelih genoma	33
3.10.6	Identifikacija i filtriranje mutacija	33
4	Rezultati	35
4.1	Analiza genotoksičnog potencijala poststresnih supstrata i faktora koji povezuju RUS sa odgovorom na oštećenje DNK	35
4.1.1	Biomolekuli oslobođeni iz ćelija tretiranihi vodonik peroksidom ispoljavaju genotoksične efekte	35
4.1.2	Karakterizacija efikasnosti rasta DNK-reparacionihi mutanata pri RUS uslovima	36
4.1.3	Identifikacija gena uključenih u RUS i zaštitu genoma korišćenjem podataka transkriptomskihi analize	39
4.1.4	Izolovanje MMS-senzitivnihi mutanata defektnihi u RUS-u	41
4.1.5	Identifikacija mutiranihi gena	43

4.2 Ispitivanje biološkog značaja programirane ćelijske smrti za opravak populacije nakon stresa	45
4.2.1 SGH i tretman vodonik-peroksidom ispoljavaju različit uticaj na resurse koenzima A.	45
4.2.2 Negativan uticaj na resurse koenzima A nije specifičan za tretman vodonik-peroksidom	47
4.2.3 UCM350 kao indikator kvaliteta supstrata nakon desikacije i zamrzavanja	49
4.2.4 Suicidna, SGH-indukovana smrt se odvija kroz PCD i generiše nutrijente povoljne za rast	50
4.2.5 Produkti PCD-a mogu doprinijeti prevazilaženju inhibitornih efekata nekromase nastale ne-PCD putem	52
4.2.6 Karakterizacija produkata PCD-a	54
4.2.7 Povoljni efekti SGH-supstrata porijeklom iz <i>U. maydis</i> ispoljavaju se i na srodne vrste	56
5 Diskusija	59
5.1 Genotoksični potencijal poststresnih supstrata i faktori koji povezuju RUS sa odgovorom na oštećenje DNK	59
5.2 Biološki značaj programirane ćelijske smrti za oporavak populacije nakon stresa	64
6 Zaključci	68
7 Literatura	70

1 Uvod

1.1 Polazne napomene

Širi saznavno-teorijski kontekst ovog istraživanja čine uzročno-posledični odnosi mikroorganizama i sredine koja ih okružuje. Naime, mikroorganizmi su u prirodnim staništima izloženi djelovanju različitih stresogenih faktora koji suzbijaju njihovu sposobnost rasta i razmnožavanja, tako da je jedno od fundamentalnih pitanja u mikrobiologiji kako se mikroorganizmi suprotstavljaju nepovoljnim uslovima životne sredine. U protekle tri decenije je došlo do ekspanzije novih saznanja o mehanizmima kojima različiti mikroorganizmi odgovaraju na stres, pri čemu se stalno otkrivaju i dodatno razjašnjavaju njihovi molekularno-biološki aspekti. Tako mikroorganizmi, u uslovima stresa, primjenjuju brojne fiziološke mehanizme i različite eko-evolucione strategije.

Međutim, čak ni mikroorganizmi nisu nepobjedivi pred intenzivnim i istovremeno kombinovanim stresogenim agensima. Iako su adaptacije brojne i veoma raznovrsne, nijedna vrsta ne može biti prilagođena na sve moguće različite uslove spoljašnje sredine. Naime, adaptacije se mogu javiti kao posledica promeljivih uslova sredine pred kojim su se (mikro)organizmi našli u svojim staništima. Pored toga, svi adaptivni mehanizmi funkcionišu unutar određenih fizioloških granica, tako da u uslovima kada intenzitet i trajanje nepovoljnih faktora premaše kapacitete ćelijske adaptacije, dolazi do akumulacije ćelijskih oštećenja koja prevazilaze mogućnost popravke. Osnovna homeostaza ćelijskih molekula i procesa se nepovratno gubi, mikrobne ćelije neminovno umiru, te vijabilnost u populaciji opada. Stoga je obnavljanje nakon masovnog umiranja vitalni zadatak za svaku populaciju mikroorganizama, a poznavanje mehanizama i ćelijskih faktora koji u tome učestvuju presudno je značajno za sveobuhvatno razumijevanje strategija kojima mikroorganizmi dugoročno opstaju čak i u krajnje varijabilnim sredinskim uslovima.

Predmet ove disertacije je dublje rasvjetljavanje mehanizama koji kod bazidiomicete *Ustilago maydis* doprinose obnovi populacija nakon izrazito snažnog stresa i drastičnog pada brojnosti vijabilnih ćelija ($< 0,1\%$) [1]. Ova obnova se zasniva na sposobnosti preživjelih ćelija da za svoju proliferaciju usvajaju i recikliraju biomolekule porijeklom od umrlih ćelija. Tako je ovaj fenomen izvorno definisan kao proces repopulacije u uslovima gladovanja (engl. „Repopulation Under Starvation“- RUS), čime se htjelo istaći da se rast i multiplikacija ćelija odvija u energetski zatvorenom sistemu, tj. bez spoljašnjeg dodavanja nutrijenata. Međutim, pošto sam sistem interno generiše izvor nutrijenata, repopulacija se, u najstrožijem smislu, ne odvija pod uslovima gladovanja. Iz tog razloga, RUS je redefinisano tako da označava „repopulaciju nakon razaranja“ (engl. „Repopulation Upon Shattering“). Naime, ova rekonceptualizacija akronima ne samo da tačnije definiše njegovo značenje, nego ga dodatno proširuje, tako da obuhvata odnos između devastiranja populacije i sposobnosti preživjelih ćelija da izvrše repopulaciju, čime se povezuju dva osnovna aspekta neophodna za pravilno razumijevanje celokupnog procesa. Dakle glavni smjer, ključni ciljevi i metodološki pristupi ovog istraživanja su artikulisani u kontekstu RUS-a. Pošto je za istraživanja opisana u ovom radu korišćena, kao model sistem, bazidiomiceta *U. maydis* u sljedećem poglavlju ćemo se najprije upoznati s osnovnim karakteristikama ovog mikroorganizma.

1.2 *Ustilago maydis*

Ustilago maydis je jednoćelijska, dimorfna gljiva iz porodice Ustilaginaceae i važan model-organizam za proučavanje funkcionisanja unutarćelijskih procesa na molekularno-genetičkom nivou, kao i za razumijevanje adaptacija i odgovora eukariotskih mikroorganizama na stresne uslove. Ova gljiva je fitopatogen koji inficira biljku *Zea mays* (kukuruz), pri čemu napada sve

nadzemne organe i izaziva formiranje karakterističnih tumora (gala), **Slika 1A**. Iako je njen centar porijekla u Centralnoj i Južnoj Americi, danas je široko rasprostranjena na svim kontinentima na kojima se kukuruz uzgaja.

Ova gljiva posjeduje izražen dimorfni životni ciklus, koji obuhvata dvije ključne faze:

1. haploidnu, saprofitsku formu, koja opstaje u zemljištu i izložena je različitim spoljašnjim stresorima, uključujući UV zračenje, desikaciju, temperaturne ekstreme i biotičke izazove u vidu kompeticije;

2. parazitsku, dikarionsku formu, koja se razvija u biljci domaćinu i mora da prevaziđe odbrambene mehanizme imunog sistema kukuruza [2].

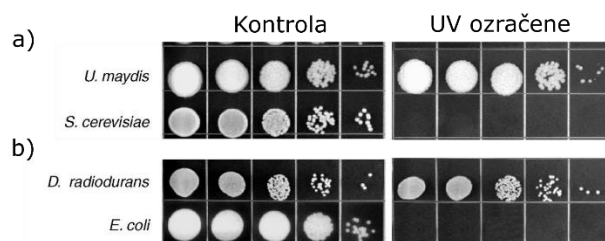
Ovakva ekološka i fiziološka dinamika zahtijeva visok nivo adaptivnosti i vjerovatno je uticala na nastanak i razvoj mehanizama otpornosti kod ove vrste [3]. Jedna od najistaknutijih osobina *U. maydis* jeste velika rezistentnost na ultraljubičasto (engl. „ultra-violet light“-UV) i gama (γ) zračenje, **Slika 1B**. Tako je za ovu gljivu utvrđena visoka tolerancija na jonizujuće zračenje, sa D_{10} vrijednostima koje dostižu približno 3,6 kGy, što je svrstava među najotpornije eukariotske mikroorganizme poznate do danas. Smatra se da ova otpornost predstavlja sekundarnu adaptaciju, proisteklu iz kombinovanog pritiska promjenljivih uslova u zemljištu i biotičkih stresova tokom parazitske faze životnog ciklusa [4].

Molekularnu osnovu dijela ove otpornosti čini efikasan sistem reparacije DNK, u okviru koga posebno značajnu ulogu ima homologna rekombinacija (HR). Mutacije u genima uključenim u ovaj proces dovode do izražene osjetljivosti na UV i γ -zračenje, što ukazuje na ključnu funkciju ovih puteva u održavanju integriteta genoma [5].

A



B



Slika 1. A Gala formirana na klipu kukuruza (*Zea mays*) usled infekcije gljivom *U. maydis*. **B** Preživljavanje laboratorijskih sojeva (**a**) eukariota *U. maydis* i *S. cerevisiae*, (**b**) prokariota *D. radiodurans* i *E. coli* nakon tretmana UV zračenjem. Sojevi uzgajani u bogatom medijumu na 30 °C do kasne logaritamske faze rasta, nakon čega je gustina ćelija podešena na 10^7 ćelija/ml. Pripremljena su serijska desetostruka razblaženja, a alikvoti su nanošeni na ploče sa čvrstim hranljivim medijumom, sa lijeva na desno sa rastućim stepenom razblaženja. Ploče su zatim ozračene UV zračenjem u dozi od 240 J/m² i inkubirane dok kolonije

nisu dostigle približno istu veličinu. Modifikovana slika preuzeta iz: Holloman W, Schirawski J, Holliday R (2007).

Iako su brojni učesnici homologne rekombinacije visoko evoluciono očuvani među eukariotima, značajne razlike postoje čak i u osnovnim elementima ovog sistema kod različitih model-organizama. Kvasci poput *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, predstavljaju model organizme na kojima je najviše urađeno u pogledu rasvjetljivanja ovih procesa. Međutim, ono što je važno naglasiti jeste da kod ova dva model sistema, centralnu ulogu u formiranju Rad51 nukleoproteinskih filamenata igra protein Rad52 [6]. Nasuprot tome, kod *U. maydis* ovaj proces je posredovan BRCA2-homolognim proteinom Brh2, koji u saradnji sa Rad51 i Dss1 koordinira ključne korake rekombinacione reparacije i održavanja genomske stabilnosti [7,8].

Ova razlika ukazuje da, iako dijele osnovni skup evoluciono očuvanih komponenti, mehanizmi homologne rekombinacije kod ovih organizama nisu funkcionalno identični, već su evoluciono prilagođeni specifičnim biološkim zahtjevima. U tom kontekstu, *U. maydis* predstavlja posebno vrijedan model, jer omogućava proučavanje BRCA2-zavisne rekombinacione mašinerije u genetički pristupačnom sistemu, što nije moguće u klasičnim modelima kvasaca.

U. maydis kao model-sistem dodatno čini privlačnim činjenica da približno 30% gena u njegovom genomu ima nepoznatu ili samo pretpostavljenu funkciju, podstičući pretpostavku da bi se među njima mogli naći i faktori koji bi objasnili adaptivni potencijal ove gljive [9].

1.3 Mehanizmi i strategije odgovora mikroorganizama na nepovoljne uslove sredine

Uzimajući u obzir raznolikost životnih ciklusa mikroorganizama i širok spektar stresogenih faktora kojima su izloženi, od suštinskog je značaja razumjeti koje mehanizme i strategije koriste za opstanak u promjenljivim uslovima sredine, kako na nivou pojedinačne ćelije, tako i na nivou čitave populacije. Razumije se da se, pri njihovom razmatranju, ovdje ne možemo posebno upuštati u detaljan opis svakog od ovih mehanizama nego ćemo istaći tipične primjere i sažeto se upoznati sa njihovim osnovnim karakteristikama. Detaljnija pažnja biće zadržana samo na onim procesima u osnovi adaptacija koji su od neposrednijeg značaja kako za sagledavanje šire perspektive, tako i za direktno profilisanje pojedinih motiva našeg istraživanja.

Mikroorganizmi se u prirodnim staništima suočavaju sa stalnim ekološkim variranjima i brojnim stresogenim faktorima tako da su prinuđeni da za svoj opstanak vode kontinuiranu borbu, razvijajući odgovarajuće fiziološke i eko-evolucione adaptacije [10,11]. Brojni abiotički faktori – desikacija, promjene pH, temperaturna variranja, izloženost jonizujućem i UV zračenju, povećan salinitet, kao i biotički stresori, poput predatorstva, kompeticije, izloženosti toksičnim jedinjenjima drugih organizama ili imunskom odgovoru domaćina (kod parazitskih vrsta), mogu pojedinačno i često zajednički, u najraznovrsnijim kombinacijama, nepovoljno uticati na normalno funkcionisanje mikrobijalnih ćelija i ekološki uspjeh njihovih populacija [12,13].

Kao odgovor na ovakve izazove, mikroorganizmi su, tokom svoje evolucije, razvili čitav spektar adaptivnih mehanizama. U najširem smislu, ovi mehanizmi se mogu razvrstati u dvije kategorije: mehanizme rezistencije (i tolerancije) na stres i mehanizme oporavka (obnove populacije) nakon stresa. Prva kategorija djeluje na nivou pojedinačne ćelije i obuhvata sve mehanizme koji omogućavaju privremeno preživljavanje nepovoljnih uslova, tj. toleranciju stresa u okviru određenog intenziteta i trajanja [14,15]. U drugu grupu spadaju eko-evolucione strategije koje omogućavaju fenotipsku i/ili genotipsku diverzifikaciju populacija, kao i obnavljanje brojnosti živih ćelija u populacijama mikroorganizama nakon masovnog gubitka vijabilnosti.

Kao primjeri koji bi pripadali prvoj kategoriji adaptacija mogu se navesti: formiranje spora, cisti i biofilmove, prajming (engl. „priming“) i unakrsna zaštita (engl. „cross protection“), rezistencija na antibiotike, unutarćelijska popravka oštećenja, dok se u drugu grupu svrstavaju strategije smanjenja

rizika (engl. “bet-hedging”) i programirana ćelijska smrt (engl. „Programmed Cell Death“, PCD) [16,17].

Formiranje spora kod mikroorganizama, prije svega kod gljiva i algi, kao i kod pojedinih bakterija, se dešava najčešće u nepovoljnim sredinskim uslovima; spore karakteriše usporen metabolizam i povećana otpornost na desikaciju, temperaturne ekstreme, UV zračenje i nedostatak nutrijenata [18,19]. Kada se sredina promijeni ka umjerenim ekološkim uslovima, iz spora klijaju vegetativne ćelije sposobne za normalan rast i diobu.

Formiranje cisti i endospora kod protista i pojedinih bakterija predstavlja regulisan odgovor na pogoršanje sredinskih uslova i uključuje reorganizaciju citoskeleta i sintezu zaštitnih ćelijskih omotača, kao i prelaz u dormantno stanje, čime se obezbjeđuje produženo preživljavanje u promjenljivim uslovima njihovih staništa [20–22].

Biofilmovi predstavljaju prostorno strukturisane zajednice mikroorganizama povezane vanćelijskim matriksom, koje karakteriše intenzivna međućelijska komunikacija i povećana otpornost na desikaciju, UV zračenje, promjene pH i djelovanje antimikrobnih agenasa [23].

Praiming, odnosno stečena otpornost na stres, omogućava mikroorganizmima da nakon izlaganja blažem stresu razviju sposobnost efikasnijeg odgovora na kasniji, jači stres istog tipa, dok unakrsna zaštita podrazumijeva povećanu otpornost i na druge vrste stresora [24,25].

“Bet-hedging” je koncept koji pokriva skup strategija kojom se unutar populacije povećavaju fenotipska varijabilnost kako bi se izborili sa ekološkom neizvjesnošću koju im nameće nestabilnost uslova spoljašnje sredine. Zapravo, ovim strategijama organizmi u suštini, povećavajući varijabilnost fenotipova, smanjuju rizik od izumiranja populacije u nepredvidivim uslovima. Na ovaj način, populacije žrtvuju kratkoročnu efikasnost (smanjen prosječan fitnes) radi dugoročne održivosti na datom staništu.

Klasičan primjer bet-hedging strategije u svijetu mikroorganizama je **generisanje perzistentnih ćelija** (perzistera). Naime, pri rastu populacije ćelija istog genotipa, umjesto da se sve ćelije ponašaju slično, neke prelaze u alternativna stanja, to jest ulaze u dormantno ili sporo-rastuće stanje, koje ih čini tolerantnima na antibiotike i druge stresore. Dakle, perzistentne ćelije su fenotipske varijante, a ne mutanti. Kada se stres ukloni, mogu ponovo započeti rast, produkujući ćelije koje su senzitivne na antibiotike ili manje otporne na dati stres. Prema tome, generisanje perzistentnih ćelija se može posmatrati kao optimalna strategija izvrđavanja (engl. “hedging”) pojedinih vrsta mikroorganizama koji „investiraju“ pri povoljnim uslovima sredine u perzistere, obezbjeđujući preživljavanje kada se uslovi pogoršaju i kada većina brzo-rastućih ćelija biva eliminisana. Smatra se da ova strategija može biti presudno važna za dugoročno preživljavanje u staništima sa izraženim fluktuiranjem ekoloških faktora [16,26].

Posebna forma bet-hedginga predstavlja SOS odgovor, karakterističan za mnoge bakterijske vrste. SOS odgovor je inducibilni regulatorni sistem koji se aktivira kao odgovor na oštećenja DNK, naročito na akumulaciju jednolančanih DNK regiona nastalih tokom replikacionog stresa ili nakon djelovanja genotoksičnih agenasa. Centralni regulator ovog sistema čine proteini RecA i LexA. U prisustvu oštećenja DNK, RecA formira nukleoproteinske filamente na jednolančanoj DNK, što dovodi do autoproteolitičke razgradnje represora LexA i derepresije velikog broja SOS gena. Aktivacija SOS odgovora rezultuje ekspresijom gena uključenih u reparaciju DNK (npr. eksciziona reparacija, rekombinacija), ali i gena koji kodiraju DNK-polimeraze sa smanjenom vjeronošću replikacije DNK (npr. Pol IV i Pol V kod *E. coli*), koje omogućavaju tzv. translezionu sintezu DNK. Ovaj proces omogućava nastavak replikacije preko oštećenih DNK matrica, ali uz povećanu stopu grešaka, što dovodi do porasta stope mutacija.

Na populacionom nivou, SOS odgovor predstavlja strategiju bet-hedginga: iako većina nastalih mutacija ima negativan ili letalan efekat, povećana genetička varijabilnost povećava vjerovatnoću da mali broj ćelija stekne adaptivne mutacije koje omogućavaju preživljavanje u stresnim uslovima.

Na taj način, populacija žrtvuje kratkoročnu stabilnost genoma i prosječan fitnes pojedinačnih ćelija kako bi obezbijedila dugoročnu adaptivnost i opstajanje u promjenljivim sredinskim uslovima [27,28].

Programirana ćelijska smrt (engl. „Programmed Cell Death“- **PCD**) kod jednoćelijskih organizama (mikroorganizama) je aktivan, genetički programiran i kontrolisan proces suicidalne smrti u kojem pojedinačne ćelije, za razliku od nekrotične smrti, same pokreću sopstvenu eliminaciju iz populacije, kao dio odgovora na različite vrste stresa. Evolucionarni nastanak ovog tipa smrti još uvijek predstavlja zagonetku, ali se postepeno akumuliraju znanja koja upućuju na to da je PCD altruistički, programiran mehanizam kojim jednoćelijski organizmi žrtvuju manji ili veći dio populacije radi opstanka populacije kao cjeline, pod stresnim uslovima. Mi ćemo se ovom problemu vratiti i kasnije sa naglaskom na objavljene rezultate koji ukazuju na to da PCD predstavlja regulisan odgovor na stres koji omogućava reciklažu resursa i adaptaciju vrste [29,30].

1.4 Adaptacije, smrt i proces obnavljanja populacije nakon drastičnog mortaliteta

Najprije treba istaći da uprkos tome što mikrobiologija ima tradiciju dugu više od jednog vijeka, pitanje smrti mikroorganizama nije dobilo ni opsežnu analizu ni svestranu teorijsku obradu [31]. Tokom mnogih godina nakon utemeljenja mikrobiologije, pitanju smrti mikroorganizama pristupalo se gotovo isključivo kroz razvoj procedura za njihovo eliminisanje. Pored toga, mikroorganizmi su smatrani besmrtnima, budući da su teoretski sposobni za neograničenu vegetativnu reprodukciju. Iako su se vremenom pojavile značajne promjene u pristupu, istraživački naglasak i dalje je dominantno usmjeren na rast mikroorganizama, na njihov metabolizam i mehanizme preživljavanja, dok se njihovom umiranju posvećuje disproporcionalno manje pažnje. Kao rezultat takvog razvoja, postoji srazmjerno manji broj radova koji se direktno i sistematski bave mikrobnom smrću, premda je dostupna znatna količina posrednih informacija. Može se iz dostupne literature lako zaključiti da se u ovoj oblasti najdalje odmaklo u istraživanjima i teoretskim razmatranjima po pitanju programirane ćelijske smrti, čiji smisao i nastanak i dalje predstavlja značajan intelektualni izazov [32].

Generalno, imajući u vidu njihovu rasprostranjenost i veliki značaj za bio-ekološke procese na našoj planeti, važno je, dakle, ne samo razumjeti mehanizme kojima se mikroorganizmi štite od nepovoljnih uslova, već i adekvatno prepoznati njihovu osjetljivost i sagledati procese koji doprinose revitalizaciji mikrobnih populacija nakon intenzivnog stresa i masovne smrti. Mehanizmi zaštite imaju svoj limit, čak ni kod vrlo eurivalentnih organizama prilagođenosti ne mogu biti univerzalne, eko-evolutivne strategije (generisanje perzistentnih ćelija, PCD) podrazumijevaju visok mortalitet, tako da je sve ove fenomene neophodno posmatrati u širem, sveobuhvatnijem, tj. u RUS okviru.

Ilustrujmo gornji imperativ primjerom generisanja perzistentnih ćelija, mehanizmom za koji se može reći da predstavlja jedan od najistaknutijih primjera eko-evolutivne strategije. Kao što je već naznačeno, u periodu kad su uslovi sredine povoljni, a resursi se nalaze na maksimumu, većina ćelija populacije mikroorganizama usvaja ekonomski optimalnu strategiju brzog rasta i razmnožavanja, dok samo mala proporcija ćelija ulazi u perzistentno stanje sporog rasta. Kada se narasla populacija izloži letalnoj dozi stresa (na primjer antibiotika), većina populacije umire eksponencijalnom stopom, dok rijetke, spororastuće („perzister“) ćelije umiru znatno sporije. Kada se regularno stanje ponovo uspostavi, neke od perzister ćelija mogu preći u uobičajeno, brzo-replikujuće stanje, čime se populacija obnavlja. Dakle, pošto pri povoljnim uslovima jedan dio populacije usvaja strategiju primjerenu situaciji visokog rizika, produkovanje perzistentnih ćelija smatra se kanoničnim primjerom bet-hedžing-a [33].

Međutim, čini se da se cijelishodnost ove strategije može sagledati jasno jedino ako se, pri razmatranju ovog fenomena, jednom širom analizom zahvati i činjenica da se perzistentne ćelije

nakon stresa nalaze u okruženju nesrazmjerno prisutne nekromase, koja preživjelim ćelijama stoji na raspolaganju upravo zahvaljujući tome što je u prethodnom ciklusu većinski dio populacije usvojio strategiju brzog rasta. Ili, drugačije rečeno, iako je očigledno da bi populacija umanjila šansu da se obnovi da nije generisala perzistentne ćelije, takođe je evidentno da je ta ista populacija (koja je i proizvela perzistentne ćelije) u isto vrijeme ogromnu većinu raspoložive energije uložila u brzo-rastuće ćelije koje će poslije odumiranja postati mrtva biomasa. Prema tome, čini se jasnim da tek kad se produkcija perzistentnih ćelija sagleda u širem okviru, kad se u opštu jednačinu uračunaju zamašni nutritivni resursi porijeklom od mrtvih ćelija i tek kad se uz to uračuna da će preživjele ćelije ovaj obimni resurs uspješno iskoristiti, tek tada (sa ovim dodatnim parametrima) sama strategija zadobija svoj puni smisao. Slična logika se može primijeniti i na razumijevanje uloge programirane ćelijske smrti u populacionom odgovoru na stres.

Nadovezujući se na ovo, treba istaći da su istraživanja pokazala da pojedini tipovi smrti (npr. nekroza) dovode do oslobađanja biomolekula koji mogu biti inhibitorni za rast preživjelih ćelija, te da se obnova devastirane populacije ne može adekvatno istraživati/razumjeti ako se implicitno podrazumijeva da u post-stresnoj situaciji preživjele ćelije za rast koriste iste mehanizme na koje se oslanjaju i pri rastu u regularnim okolnostima. Post-stresno stanje može, zbog generisanja inhibitornih molekula, i dalje biti stresogeno, namećući preživjelim ćelijama dodatni izazov da pri usvajanju i recikliranju biomolekula oslobođenih iz mrtvih ćelija izbjegnu intoksikaciju.

Zaključimo ovo razmatranje napomenom da je njegov cilj bio da se skrene pažnja na to da se pojedini fenomeni mogu jasnije sagledati tek ako se posmatraju u širem okviru koji integriše različite aspekte obnove populacija nakon masovne smrti, dakle tek u okviru koji neotklonjivo dovodi u vezu smrt, nekromasu, preživjele ćelije i njihovu sposobnost da za svoj rast i razmnožavanje koriste produkte različitih tipova smrti. Na taj način je pripremljen teren za detaljnije izlaganje o onome što se do sada zna o RUS fenomenu, čime će se još jasnije prikazati kontekst u kom se konstituiše predmet ovog istraživanja.

1.5 Obnavljanje populacije nakon izlaganja subletalnom stresu (RUS)

Koristeći *Ustilago maydis* kao model organizam, pokazano je da nakon tretmana UV zračenjem i vodonik-peroksidom, u dozama koje su letalne za najveći dio populacije, mali broj preživjelih ćelija može obnoviti populaciju gotovo do početne brojnosti, koristeći isključivo biomolekule oslobođene iz mrtvih ćelija [1]. Ovaj fenomen nazvan je RUS [17]. Generalno isti efekat je dobijen i kada je u komparativnim studijama korišćen kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, s tom razlikom da je *U. maydis* pokazao relativnu prednost u pogledu brzine i obima obnovljenog rasta [34]. Nepotrebno je isticati da je neizostavan uslov za bilo koji obim repopulacije postojanje preživjelih ćelija u populacijaa devastiranim stresom.

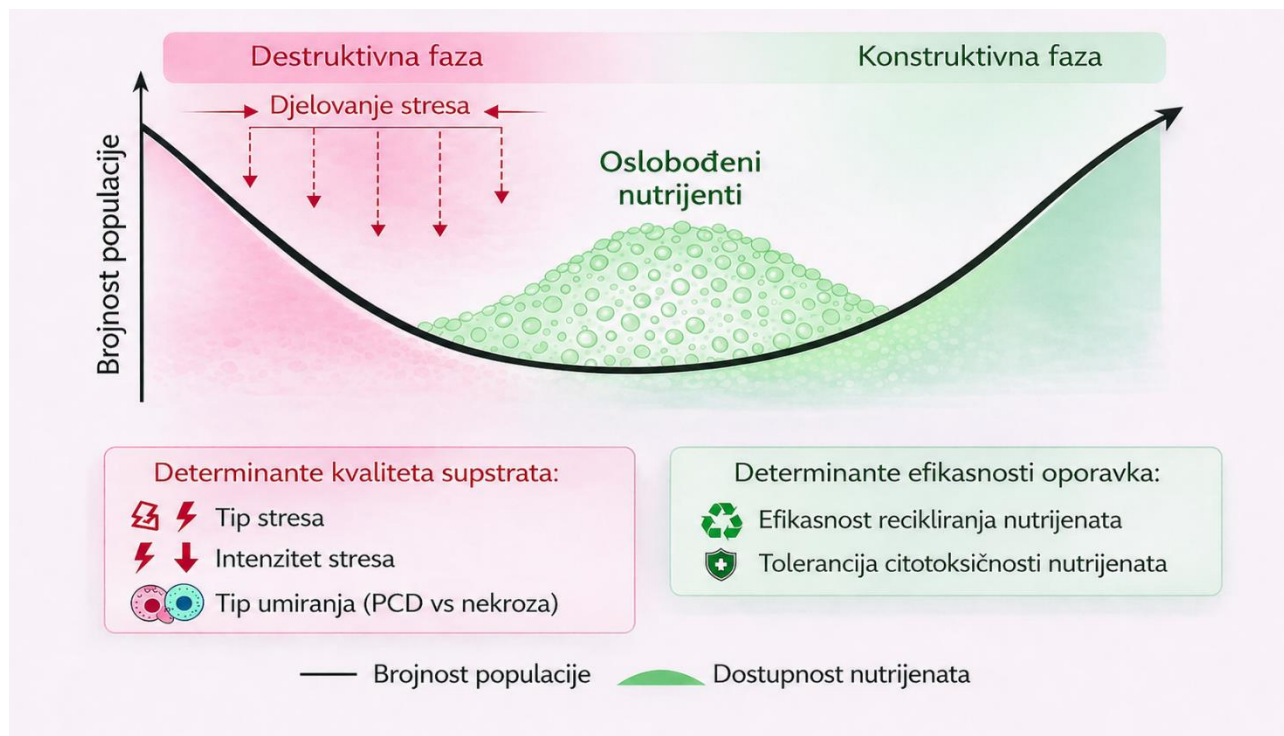
Drugo značajno zapažanje jeste da se oslobađanje i auto-degradacija unutarćelijskih komponenti odvija simultano u mrtvim ili umirućim ćelijama. Posebno je zanimljivo da se ove brzine razgradnje u *U. maydis* i *S. cerevisiae* znatno razlikuju, naročito u slučaju DNK. Nakon tretmana peroksidom ili izlaganja desikaciji, hromozomska DNK se u *U. maydis* naglo i brzo razgrađuje, dok je u umirućim ćelijama *S. cerevisiae* za isti period inkubacije tek neznatno fragmentirana [34]. Ova razlika je bitna, jer može biti posljedica specifične adaptiranosti jedne i druge vrste na posebne zahtjeve njihovih ekoloških niša. U svakom slučaju, ova razlika dovodi do bržeg oslobađanja biomolekula u okolni medijum, što može biti jedan od razloga za komparativnu premoć koju *U. maydis* pokazuje u vezi sa brzinom repopulacije.

Treći bitan uvid je da supstrati oslobođeni iz mrtvih ćelija ostvaruju dvojak efekat na preživjele ćelije – nutritivan i toksičan - pri čemu je intenzitet oba efekta u direktnoj vezi sa jačinom stresa izazvanog tretmanom vodonik-peroksidom. Nutritivna vrijednost supstrata raste sa porastom broja ubijenih ćelija do tačke gdje su sve ćelije ubijene tretmanom i gdje nutritivni kapacitet dostiže plato. Međutim primjećeno je da kako raste intenzitet stresa supstrati ispoljavaju sve izraženiji toksični efekat, ograničavajući sposobnost preživjelih ćelija da ih efikasno koriste [1].

Inhibitorni efekat nekromase takođe se povećava s vremenom inkubacije nekromase nakon stresa [1]. Treba istaći da se ovaj inhibitorni efekat može prevazići povećanjem odnosa živih u odnosu na oštećene/mrtve ćelije, praktično povećanjem inokuluma svježih ćelija u istoj količini nekrotične nekromase je primjećeno da se povećava brzina oporavka populacije, ili produžavanjem vremena inkubacije inokuluma. Još je važnije istaći da, u poređenju sa *S. cerevisiae*, *U. maydis* pokazuje superiornost u efikasnom recikliranju potencijalno štetnih, oštećenih i oslobođenih intracelularnih molekula [34]. U tom pogledu *S. cerevisiae* zapravo podsjeća na neke *U. maydis* RUS-mutante, koji su izolovani na osnovu gubitka sposobnosti da u suspenzijama ćelija tretiranim peroksidom efektno obnove populaciju.

Dalje, od posebnog je teorijsko-saznajnog i metodološkog značaja uvid da se sve razlike koje diferenciraju *U. maydis* u odnosu na *S. cerevisiae* kao organizam koji superiornije obnavlja svoje populacije nakon tretmana peroksidom (kao laboratorijskim stresorom), konzistentno ponavljaju i nakon izlaganja desikaciji, koja je jedan od nepovoljnih sredinskih faktora prisutnih na mnogim staništima [35]. Stoga rezultati ukazuju na to da su ovi uvidi pouzdani i značajni iz ekološke perspektive.

Dakle, već su početna istraživanja RUS fenomena predočila višedimenzionalni karakter procesa. Međutim, takođe je jasno da se RUS može definisati kao jedinstven bio-ekološki proces koji se sastoji od dva operativna dijela: i) “destruktivni dio”- pad vijabilnosti (masovno umiranje) i razgradnja ćelijskih konstituenata i ii) “konstruktivni dio”- obnova populacije recikliranjem oslobođenih biomolekula, **Slika 2**. Iako su ove dvije glavne operacije nesumnjivo različite, one su ujedno i najtešnje međusobno povezane i uslovljene. Ta povezanost se prvenstveno uspostavlja preko krajnjih proizvoda ćelijske razgradnje - molekula koji oslobođeni/donirani od strane umirućih ćelija predstavljaju polazni materijal za recikliranje i ponovni rast i multiplikaciju preživjelih ćelija. Upotrebljen je pojam *donirani* jer u mjeri u kojoj je proces ćelijske razgradnje aktivan (autolitički), preživjele ćelije ostvaruju nutritivnu korist uz smanjeni metabolički trošak koji bi bio neophodan za sintezu hidrolitičkih enzima koji su nužan preduslov za izvršenje tog zadatka.



Slika 2. Šematski prikaz RUS procesa

Konceptualno, ove dvije faze RUS-a su međusobno jasno razdvojene, pri čemu svaka sadrži sopstvene teorijske probleme, pokreće poseban skup istraživačkih pitanja i zahtjeva prilagođene

eksperimentalne pristupe i specifične metodološke alate. Neka pitanja su sasvim nova i tiču se ćelijskih mehanizama usvajanja i recikliranja nutrijenata oslobođenih iz umrlih ćelija.

1.5.1 Destruktivna faza RUS procesa

Prva, destruktivna faza, obuhvata period akutnog stresa tokom kojeg dolazi do masovne smrti ćelija, degradacije ćelijskih struktura i oslobađanja unutarćelijskih komponenti u okolinu. Intenzitet, priroda stresogenog faktora kao i tip ćelijske smrti u ovoj fazi presudno određuju i količinu i kvalitet nastale nekromase, koja istovremeno predstavlja potencijalni izvor nutrijenata, ali i izvor toksičnih produkata.

Ovaj destruktivni aspekt RUS-a otvara čitav niz dodatnih pitanja u vezi sa mehanizmima ćelijske dekompozicije i curenja biomolekula nakon djelovanja stresa. Još uvijek nisu sasvim jasni svi mehanizmi putem kojih dolazi do oslobađanja unutarćelijskog sadržaja i njegove dekompozicije. Takođe je nepoznato da li se ovaj proces pri nekrotičnom tipu smrti odvija regulisano ili je u pitanju stohastičan i neregulisan mehanizam koji se dominantno odvija putem oslobađanja unutarćelijskih hidrolitičkih enzima koji svojom aktivnošću dovode do razgradnje ćelijskog sadržaja.

Ono što dodatno privlači pažnju jeste i pitanje same prirode biomolekula koji se oslobađaju iz umirućih ćelija, da li pored citotoksične prirode imaju i genotoksični potencijal. I dodatno, koji su to biomolekuli koji su glavni nosioci toksičnosti u ovako oslobođenim supstratima. Ono što se zna iz dosadašnjih radova na *U. maydis* jeste, da se kod suspenzija ćelija tretiranih rastućim dozama vodonik-peroksida toksičnost ne prebacuje u potpunosti u supernatante dobijene od istih uzoraka [1].

Pored ovih pitanja, destruktivna faza RUS-a nameće i dodatan problem koji se tiče uticaja tipa i intenziteta stresa, kao i načina ćelijske smrti koji takav stres indukuje, na dinamiku dekompozicije ćelijskih makromolekula i kvalitet oslobođenih nutrijenata. Iako ova korelacija još uvijek nije sistematski ispitivana kod *U. maydis*, postoje jasni pokazatelji iz drugih mikrobioloških model sistema da stresogeni faktori mogu dovesti do različitih oblika ćelijske smrti u zavisnosti od svoje prirode i jačine [36,37]. Navedeni, i drugi radovi su pokazali da kada su ćelije izložene stresorima istog tipa, ali manjeg intenziteta, one predominantno podležu programiranoj ćelijskoj smrti, dok stresovi većeg intenziteta dovode do smrti putem nekrotičnih procesa. Ono što je poznato jeste da *U. maydis* može da prolazi kroz apoptozu sličnu ćelijsku smrt nakon izlaganja oksidativnom stresu [38,39], što može da sugeriše da i kod ove gljive tip i intenzitet stresa mogu oblikovati modalitet ćelijskog umiranja.

Kao što je već istaknuto, komparativne analize ukazuju na to da se stresom indukovani procesi ćelijske dekompozicije odvijaju na način koji je u velikoj mjeri vezan i za samu biologiju vrste. Naime, pod uporedivim eksperimentalnim uslovima - pri istom tipu stresora i sličnom nivou oštećenja - *U. maydis* i *Saccharomyces cerevisiae* ispoljavaju bitno različite obrasce razgradnje unutarćelijskih makromolekula [34]. U tom smislu, *U. maydis* karakteriše znatno brža dinamika samodegradacije ćelijskih komponenti, što je naročito vidljivo u slučaju genomske DNK.

Takva dinamika razgradnje može imati adaptivni značaj, naročito u sredinama sa ograničenom dostupnošću nutrijenata i u uslovima pojačane mikrobijalne kompeticije, jer omogućava brzu dostavu hranljivih materija preživjelim ćelijama, uz istovremeno smanjenje potrebe da same sintetišu hidrolitičke enzime neophodne za razgradnju biomase. Tako gledano, destruktivna faza RUS-a se može tumačiti kao proces u kojem umiruće ćelije, kroz aktivnu samorazgradnju, oslobađaju/doniraju resurse koji postaju dostupni preživjeloj subpopulaciji, čime se zapravo omogućava posredan prenos fitnesa ka ćelijama sposobnim za populacioni oporavak [40].

Ovakvo postuliranje fenomena, gdje se pretpostavlja da se destruktivna faza RUS-a evoluciono razvila tako da doprinese populacionom oporavku, otvara jedno od najprovokativnijih evolucionih pitanja, a to je pitanje na koji način prirodna selekcija može da favorizuje proces čiji se pozitivni

efekti na fitness ostvaruju isključivo preko doprinosa ćelija koje umiru. Ovaj problem se javlja u razumijevanju evolucije svih bioloških fenomena koji uključuju inherentnu, programiranu i aktivno regulisanu formu smrti, pri čemu on postaje naročito izražen kod jednoćelijskih organizama, kod kojih je smrt ćelije ujedno i smrt čitave jedinke.

Brojne hipoteze predložene su kako bi se objasnilo porijeklo PCD-a kod jednoćelijskih organizama [40–43], pri čemu se brza auto-dekompozicija često razmatra kao strategija povezana sa životom u fluktuirajućim sredinama, obilježenim čestim i produženim periodima intenzivnog stresa.

U tom kontekstu, postaje neophodno razmotriti koncept programirane ćelijske smrti (PCD) kod mikroorganizama kao širi teorijski okvir unutar kojeg se mogu sagledati potencijalni adaptivni aspekti destruktivne faze RUS-a.

1.5.2 Programirana ćelijska smrt – PCD

Iako se PCD najčešće vezuje za višćelijske organizme, brojna istraživanja pokazala su da i jednoćelijski mikroorganizmi posjeduju regulisane, genetički kontrolisane mehanizme ćelijskog umiranja, koji se aktiviraju u uslovima stresa, nutritivne oskudice ili naglih promjena sredine [44,45]. Ovi procesi ne predstavljaju pasivnu posljedicu oštećenja, već aktivno regulisan odgovor populacije na uslove koji prevazilaze kapacitete individualnog preživljavanja. U tom kontekstu, način ćelijske smrti dobija dodatni funkcionalni značaj, budući da se često uočava da niži intenziteti stresa favorizuju programiranu ćelijsku smrt, dok jači stresni tretmani dovode do nekrotičnih oblika umiranja.

Ovakva diferencijacija odgovora omogućava populaciji da spriječi dodatne negativne efekte nekrotičnog tipa smrti na ostatak populacije prilikom djelovanja stresa. Kod više eukariotskih mikroorganizama, uključujući alge (uključujući dinoflagelate) i gljive, PCD je praćen oslobađanjem unutarćelijskih komponenti i signalnih molekula koji direktno utiču na sudbinu preostalih živih ćelija. U *Chlamydomonas reinhardtii* pokazano je da PCD dovodi do oslobađanja faktora koji smanjuju osjetljivost preživjelih ćelija na letalne signale, čime se povećava vjerovatnoća njihovog opstanka i kasnijeg oporavka populacije [46]. Slični obrasci zabilježeni su i kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, gdje ćelije u starijim kulturama prolaze kroz apoptotsku smrt, oslobađajući unutarćelijske nutrijente koji podstiču preživljavanje drugih ćelija iste populacije [47].

Na nivou populacije, PCD može poprimiti i oblik koordinisanog odgovora na promjene sredinskih uslova. Kod dinoflagelata *Peridinium gatunense* opisano je da dio populacije, nakon detekcije nepovoljnih promjena, ulazi u programiranu smrt i oslobađa tiol-esterazu koja senzitivše ostale ćelije i dovodi do kolapsa populacije [48]. Iako funkcionalna svrha ovakvog ponašanja nije u potpunosti razjašnjena, pretpostavlja se da ovakav mehanizam omogućava da mali broj jedinki preživi nepovoljan period i kasnije formira novo sezonsko cvjetanje [41]. Analogni procesi masovne smrti sa jasnim ekološkim posljedicama zabilježeni su i kod morskih cijanobakterija, gdje stresom indukovano umiranje značajno utiče na strukturu i dinamiku populacija [49].

U kontekstu koji nas ovdje posebno zanima, istraživanja na algi *Chlamydomonas reinhardtii* [45] su pokazala da produkti programirane ćelijske smrti imaju blagotvoran efekat na rast ćelija iste vrste, dok su produkti oslobođeni ne-PCD mehanizmima, tj. izlaganjem ćelija ultrazvučnim talasima, zapravo djelovali štetno na ćelije iste vrste. Zanimljivo je da su isti autori pokazali u kasnijoj studiji da su korisni efekti PCD-supstrata kod *C. reinhardtii* bili specifični za vrstu, pri čemu su ovi supstrati čak ispoljavali supresivno dejstvo na rast drugih vrsta roda *Chlamydomonas*, što ukazuje na to da efekti PCD-produkata mogu biti usmjereni ka genetički srodnim jedinkama [30]. Slični rezultati zabilježeni su i u slučaju zelene mikroalge *Ankistrodesmus densus* [50].

Ovi nalazi otvaraju pitanje na koji način umiruće ćelije ostvaruju ovako selektivan efekat, odnosno da li se pri programiranoj smrti generišu specifične supramolekulske strukture koje djeluju kao nosioci oslobođenih biomolekula i koje su preferencijalno dostupne ili prepoznate od strane ćelija iste vrste. Drugim riječima, da li se tokom PCD umiranja pored programiranog procesovanja

biomolekula vrši i njihovo specifično (adresirano) pakovanje, tako da su oni blagotvorni ne samo po svom sadržaju (neoštećeni gradivni blokovi) nego efektivni i po svom dostavljanju. Posebno ostaje nejasno da li su isti biomolekuli odgovorni i za pozitivne efekte na srodne ćelije i za inhibitorno djelovanje na nesrodne vrste, ili se radi o različitim frakcijama unutar oslobođenog materijala, koje ostvaruju ove suprotne biološke efekte.

U kontekstu mikrobioloških zajednica, koje su često sastavljene od velikog broja filogenetski i ekološki različitih vrsta u međusobnoj kompeticiji za iste resurse, selektivno „adresiranje“ oslobođenih biomolekula ka genetički srodnim ćelijama imalo bi jasan adaptivni smisao. Ako bi se samo očuvao kvalitet, bez adresiranog pakovanja/dostave, onda bi produkti PCD-a bili opšte dobro na korist svih kompetitora. Iako postojanje i identitet ovih molekula i struktura još uvijek nije razjašnjen, u gore spomenutom radu na *A. densus* ekstracelularne mikrovezikule su predložene kao mogući nosioci PCD-materijala pomoću kojih bi mogli da se obezbede za vrstu specifični korisni efekti [50]. Ovu pretpostavku dodatno pojačava zapažanje da se efekti produkata programirane ćelijske smrti, koji se ostvaruju specifično za vrstu, zadržavaju i nakon termičkog tretmana [30], što čini malo vjerovatnim da su odgovorni molekuli slobodni proteini osjetljivi na denaturaciju, ili pak ukazuje na njihovu zaštitu unutar stabilnijih supramolekulskih struktura. U svakom slučaju, treba naglasiti da bi dvostepeni sistem (obrade i adresiranog pakovanja) zapravo dao puniji smisao suicidnom umiranju, jer bi tek u tom slučaju PCD bio krajnje svrsishodan altruizam.

U odsustvu mehanizama selektivnog usmjeravanja nutrijenata, ulaganje energije u regulisanu smrt ćelija čija je sudbina već neminovna, moglo bi paradoksalno da koristi konkurentnim vrstama, umjesto genetički srodnim jedinkama. Zajedno, ovi podaci sugerišu da programirana ćelijska smrt kod jednoćelijskih organizama vjerovatno ne predstavlja evolucionu anomaliju, već adaptivnu strategiju na populacionom nivou. Kroz programiranu eliminaciju dijela populacije i istovremeno oslobađanje nutrijenata i signalnih molekula, PCD može obezbijediti uslove za efikasan rast i razmnožavanje preživjelih ćelija, osigurati prednost u kompeticiji sa drugim vrstama za iste resurse, čime se povećava evolutivni uspjeh populacije kao cjeline.

Upravo zbog toga, u populacijama izloženim ekstremnim promjenama sredinskih uslova, koje rezultiraju umiranjem veće ili manje frakcije ćelija, ključno pitanje postaje da li i na koji način preživjele jedinke mogu iskoristiti oslobođene biomolekule i time omogućiti oporavak populacije. Pri tome, treba imati u vidu da tip ćelijske smrti odražava odgovor pojedinačnih ćelija na stres, dok se populacioni odgovor formira kao rezultat preživljavanja, umiranja i interakcija među ćelijama, pri čemu intenzitet i trajanje stresnog faktora u velikoj mjeri određuju da li će prevladati regulisani ili nekontrolisani oblici umiranja. Uzevši u obzir sve ove faktore, ono što je od najpresudnije važnosti za oporavak populacije jeste pitanje koje ćelije uspijevaju da prežive tokom djelovanja stresa i na osnovu kojih mehanizama, jer upravo ova frakcija čini nužni preduslov za kasniji populacioni oporavak.

1.5.3 Preživljavanje dijela populacije

Uprkos masovnoj smrti koja prati ekstremne ili produžene stresne uslove, u populacijama mikroorganizama često opstaje mala subpopulacija ćelija čija fiziološka ili metabolička svojstva omogućavaju preživljavanje i kasniji oporavak populacije. Razumijevanje mehanizama koji stoje u osnovi opstanka ovih ćelija ključno je za sagledavanje populacionih strategija prilagođavanja na stres i oporavka nakon istog.

Jedan od razloga opstanka dijela populacije jeste neravnomjerna distribucija stresogenih faktora u mikrokruženju, koja nastaje usljed prostorne strukture populacije i ograničenog transporta molekula, male energije zračenja (na primjer UV) itd., zbog čega se formiraju gradijenti izloženosti stresu. Kao posljedica toga, postoji velika vjerovatnoća da će makar mali dio populacije ćelija biti izložen nižem, subletalnom intenzitetu stresa te će samim tim imati i veće izgleda za preživljavanje [51].

Pored toga, unutar mikrobijalnih populacija se kao i kod drugih vrsta održava izvjesna genetička heterogenost, tako da i u nepovoljnim uslovima koji relativno uniformno djeluju na većinu populacije postoji frakcija ćelija sa otpornijim fenotipom. Ovakva postojeća genetička varijabilnost omogućava da selektivni pritisak, tokom produženog djelovanja stresa, favorizuje varijante koje bolje podnose novo okruženje, čime se obezbjeđuje opstanak populacije i njena adaptacija na novonastale uslove [52,53].

Ovaj mehanizam omogućava opstanak kako u akutnim, tako i u produženim stresnim uslovima, jer kombinacija mikrookruženjem uslovljene heterogenosti i genetičke raznolikosti predstavlja osnovu na kojoj se gradi selekcija otpornijih varijanti u promjenljivim uslovima sredine [54].

Dodatno, značajnu ulogu u opstanku populacije imaju već spomenute perzistentne ćelije, čiji je fenomen najdetaljnije opisan kod bakterija [55,56], ali je potvrđen i kod kvasaca [57,58]. U pitanju je mala frakcija genetički identičnih ćelija koje ulaze u stanje metaboličkog mirovanja i time preživljavaju i letalne stresove. Takvo stanje može nastati kao rezultat aktivacije različitih regulatornih puteva - uključujući (p)ppGpp signalizaciju, pad ATP-a i toksin–antitoksin sisteme, koji dovode do inhibicije rasta i pokretanja dormancije [59,60]. Dio ovih procesa odvija se i stohastički, kroz nasumična variranja unutar regulatornih mreža koje povremeno prebacuju pojedine ćelije u stanje metaboličke neaktivnosti [55]. Nakon prestanka stresa, perzistentne ćelije mogu da reaktiviraju rast detekcijom dostupnih nutrijenata i signalnih molekula, kao što su alanin ili glukoza, što omogućava brz prelazak u fazu diobe i obnovu populacije [61]. Za razliku od mutanata, potomstvo perzistentnih ćelija ne nasljeđuje trajno ovu osobinu, zbog čega se njihov nastanak smatra dijelom dinamičke i reverzibilne heterogenosti metaboličke aktivnosti na nivou populacije.

Posebno je interesantno razmatranje mogućnosti preživljavanja subpopulacije u kontekstu PCD-a. Kao što je gore spomenuto, Yordanova i sar. [62] su ustanovili da PCD kod *C. reinhardtii* generiše faktore koji mogu učiniti da još uvijek neindukovane ćelije postanu manje podložne stimulusima koji indukuju PCD. Stoga je razumno očekivati da ovaj mehanizam obezbjeđuje određen broj preživjelih jedinki koje mogu ponovo kolonizovati stanište. Takođe, pretpostavlja se da koordinisani kolaps kod *P. gatumense* obezbjeđuje da dio populacije preživi i omogući repopulaciju [41,63].

Svi navedeni faktori omogućavaju populaciji da dio ćelija preživi djelovanje stresa. Međutim, sudbina populacije nakon prestanka stresnog djelovanja zavisi od genetičke i metaboličke opremljenosti ovih preživjelih ćelija da prepoznaju i efikasno iskoriste dostupne nutrijente i time započnu proces obnove populacije.

Već je u prethodnom poglavlju istaknuto da programirana ćelijska smrt ne predstavlja isključivo mehanizam putem koga se prosto uklanjaju oštećene ćelije iz populacije, već proces koji neposredno utiče na sudbinu preživjelog dijela populacije. U tom kontekstu, ćelije koje prežive PCD-povezano masovno umiranje ne predstavljaju slučajan ostatak populacije, već funkcionalno ključnu komponentu ovog mehanizma, bez koje programirana ćelijska smrt ne bi imala evolucioni smisao. Ishod stresnog odgovora stoga ne zavisi samo od obima ćelijske smrti, već i od sposobnosti dijela populacije da prepozna stresne i intercelularne signale i, na osnovu njih, izbjegne aktivaciju programa PCD. Jedan od mehanizama ove regulacije jeste i detekcija koncentracije oslobođenih signalnih molekula (engl. „quorum sensing“, „osećaj brojnosti“ populacije), gdje ona može odrediti da li će se kaskada programirane ćelijske smrti zaustaviti ili dalje amplifikovati, što je pokazano u populacijama morskih i jezerskih mikroorganizama tokom procesa cvjetanja i kolapsa populacija. Na taj način, programirana ćelijska smrt i mehanizmi preživljavanja ne funkcionišu kao suprotstavljeni procesi, već kao međusobno povezani i koordinisani aspekti jedinstvene populacione strategije, u kojoj se sudbina ćelija oblikuje kroz integraciju stresnih signala, njihove jačine i sposobnosti ćelija da na njih adekvatno odgovore.

1.5.4 Konstruktivna faza RUS procesa

Druga, konstruktivna faza započinje nakon prestanka ili slabljenja stresnog djelovanja i u potpunosti zavisi od malog broja preživjelih ćelija. Da bi efikasna obnova populacije bila moguća, ove ćelije moraju biti u stanju da prepoznaju dostupnost oslobođenih resursa, redukuju toksične efekte produkata razgradnje, sprovedu unutarćelijsku popravku nastalih oštećenja i potom koordinisano uđu u proces ponovnog rasta i diobe.

Dosadašnja istraživanja RUS fenomena pokazala su da ispunjavanje ovih zahtjeva ne zavisi isključivo od dostupnosti nutrijenata oslobođenih iz mrtvih ćelija, već od genetičke opremljenosti ćelija da odgovore na složene izazove koje ovi oslobođeni nutrijenti postavljaju. Analize sprovedene na *U. maydis* ukazale su da je efikasna obnova populacije uslovljena funkcijom više gena čiji su produkti uključeni u regulaciju rasta, popravku DNK, citoskeletnu organizaciju, kontrolu razgradnje i transporta proteina i regulaciju transkripcije. Ovakva raznovrsnost uključenih procesa ukazuje da RUS predstavlja kompleksan, integrisan odgovor, u kojem uspješna obnova populacije zavisi od koordinisanog funkcionisanja više osnovnih ćelijskih mehanizama. U skladu s ovim konceptualnim okvirom, dalja istraživanja bila su usmjerena na identifikaciju konkretnih genetičkih faktora koji omogućavaju preživjelim ćelijama da realizuju ovakav koordinisan odgovor. Niz gena uključenih u RUS mehanizam identifikovan je tokom više istraživanja [1,64], pri čemu se pokazalo da ovaj proces zavisi od integriteta različitih, funkcionalno povezanih ćelijskih sistema. Među prvim genima za koje je utvrđeno da doprinose RUS-u kod *U. maydis* nalaze se *Adr1* (UMAG_04456), *Did4* (UMAG_04865), *Kel1* (UMAG_15019) i *Tbp1* (UMAG_10143), čiji su produkti uključeni u regulaciju rasta, organizaciju citoskeleta, transport proteina i kontrolu transkripcije. Posebno je značajno da mutanti u genima *Did4*, *Kel1* i *Tbp1* ispoljavaju povećanu osjetljivost na različite genotoksične agense, što predstavlja prvi nagovještaj funkcionalnog preklapanja mehanizama uključenih u RUS i očuvanje genomske stabilnosti.

Dalja istraživanja proširila su ovaj skup identifikacijom dodatnih faktora neophodnih za efikasnu obnovu populacije [64]. Među njima su *Snf8* (UMAG_11539), komponenta ESCRT-II kompleksa (engl. "Endosomal Sorting Complex Required for Transport II") uključena u endozomalni transport i razgradnju proteina; *Slm1* (UMAG_03678), protein asociran sa plazma membranom uključen u odgovor na stres i organizaciju aktinskog citoskeleta; *Vrg4* (UMAG_01062), transmembranski transporter GDP-manoza neophodan za pravilnu glikozilaciju; *Snf5* (UMAG_04381), komponenta SWI/SNF hromatin-remodelirajućeg kompleksa uključena u regulaciju transkripcije; kao i *Hsf1* (UMAG_10368), ključni regulator odgovora na toplotni i opšti ćelijski stres. Iako su ovi geni u genomskoj bazi *U. maydis* prethodno bili označeni kao hipotetički, njihova imenovanja zasnovana su na visokom stepenu homologije sa funkcionalno okarakterisanim genima u srodnim vrstama.

Zajedno, ovi nalazi ukazuju da RUS ne predstavlja pasivan proces zasnovan isključivo na dostupnosti oslobođenih nutrijenata, već zahtijeva koordinisano djelovanje sistema uključenih u gore pomenute ćelijske procese. Dodatno, činjenica da mutanti *slm1*, *snf8* i *hsf1* pokazuju povećanu senzitivnost na genotoksične agense poput UV zračenja, metilmetan sulfonat (MMS) i diepoksi butan (DEB)-a jasno potvrđuje i proširuje inicijalnu vezu između RUS-a i mehanizama očuvanja genomske stabilnosti.

Drugi važan regulator RUS-a identifikovan je analizom ekspresionih profila ćelija raslih u RUS supstratima, pri čemu se kao ključni faktor izdvojio Chk1, serin/treonin-protein kinaza sa poznatom ulogom u kontroli ćelijskog ciklusa i održavanju integriteta genoma. Pokazano je da je Chk1 neophodan za uspješan RUS-posredovani oporavak populacije. Pored toga, transkriptomski profili ćelija gajenih na supstratima dobijenim od ćelija tretiranih vodonik-peroksidom ukazali su na povišenu ekspresiju gena uključenih u oksido-redukcijske procese, endozomalni i sekretorni transport, organizaciju membranskih struktura i odgovor na toplotni stres. Ovi rezultati dodatno potvrđuju da obnova populacije nakon masovne ćelijske smrti zavisi od koordinisanog djelovanja faktora uključenih u regulaciju transkripcije, remodelovanje hromatina i efikasno iskorišćavanje i detoksikaciju nutrijenata oslobođenih tokom PCD-povezanog umiranja.

Važno je istaći da iako nijedan od identifikovanih faktora nije primarno opisan kao gen direktno uključen u popravku DNK, funkcionalne analize su pokazale da prilikom inaktivacije pojedinih od ovih gena ipak dolazi do povećanja osjetljivosti mutanata na genotoksične agense. Ovo može ukazivati da ovi identifikovani RUS geni potencijalno imaju višestruke uloge u ćeliji, ali i na to da možda neki od biomolekula oslobođenih tokom destruktivne faze potencijalno ostvaruje nekakav vid genotoksičnog efekta na preživjele ćelije.

Takođe je važno, u kontekstu ovog doktorskog rada, istaći da RUS može poslužiti kao značajan pristup za otkrivanje novih determinanti integriteta genoma koje se možda ne bi lako uočile klasičnim eksperimentalnim pristupima. Uz to, istraživanje RUS ima potencijal da otkrije funkcije gena koji su do sada bez funkcionalne anotacije. RUS je svojom širokom perspektivom već podstakao istraživanja, a i učinio podsticajnim analize dodatnih fenomena koji su iskršavali pri istraživanju njegovih ključnih aspekata. Neki od ovih novootkrivenih fenomena ne samo da imaju dodirnih tačaka sa RUS-om nego, povratno, mogu biti ključni za njegovo dalje razumijevanje. Takav je fenomen masovne smrti i oporavka koji se ispoljava kao posljedica same specifičnosti biologije *U. maydis* i njegovog metabolizma, tj. posljedica samogenerisane hipoksije u uslovima ograničene dostupnosti kiseonika [65].

1.6 Samogenerisana hipoksija (SGH)

Jedan od neočekivanih nalaza koji je doprinio razumijevanju biologije *U. maydis* jeste pojava masovne ćelijske smrti izazvane samogenerisanom hipoksijom [2]. U uslovima inkubacije u vodi, pri visokoj gustini ćelija i u ograničenoj dostupnosti kiseonika, populacija *U. maydis* održava metaboličku aktivnost, koja dovodi do kontinuirane potrošnje kiseonika i uspostavljanja hipoksičnog okruženja. Za razliku od *Saccharomyces cerevisiae*, koji u sličnim uslovima ulazi u stanje metaboličkog mirovanja i energetske štednje, uz produžen hronološki životni vijek [66], *U. maydis* ne uspijeva da zaustavi respiratornu aktivnost, što rezultira utroškom kiseonika, povećanom akumulacijom ROS-ova usled koje dolazi do katastrofalnog pada vijabilnosti gotovo čitave populacije.

Posebno je intrigantno to što hipoksija u ovom sistemu nije spolja nametnuta, već nastaje kao direktna posljedica aktivnosti samih ćelija. Ovakav ishod sugerise da *U. maydis* u datim uslovima nije u stanju da pravovremeno pređe na alternativni metabolički režim koji bi spriječio dostizanje kritične tačke, nakon koje nema povratka, te dolazi do masovne smrti. Zbog toga se ovaj oblik umiranja može posmatrati kao samodestruktivan proces, odnosno kao oblik „suicidnog“ odgovora populacije.

Ipak, uprkos masovnom padu u brojnosti vijabilnih ćelija, u populaciji uvijek preživljava mali broj ćelija koje, nakon obnavljanja dostupnosti kiseonika, uspijevaju da rekonstituišu početni nivo vijabilnosti. Ovakvo ponašanje ukazuje da samogenerisana hipoksija ne predstavlja jednostavnu fiziološku grešku ili artefakt eksperimentalnih uslova, već potencijalno odražava dublje ukorijenjenu biološku strategiju. Jasno je da jedan mali dio populacije čine ćelije koje preživljavaju čak i u uslovima smanjene dostupnosti kiseonika, što podsjeća na fenomen fenotipske tolerancije ili perzistencije opisan kod bakterija, gdje spor ili zaustavljen rast predstavlja ključni faktor preživljavanja pod stresnim uslovima [56,67]. Dakle, moguće je da ćelije koje preživljavaju u uslovima samogenerisane hipoksije predstavljaju subpopulaciju spororastućih ili metabolički prilagođenih ćelija.

Ono što dodatno privlači pažnju jeste da, nakon izvjesnog vremenskog perioda provedenog u hipoksičnim uslovima, ova frakcija preživjelih ćelija može ponovo postati metabolički aktivna, ući u proces diobe i obnoviti populaciju do određene brojnosti, čak i tokom produženog trajanja hipoksije, bez naknadnog dotoka kiseonika. Ovo zapažanje dodatno otvara pitanje metaboličke fleksibilnosti *U. maydis*, uključujući mogućnost prelaska na alternativne, vjerovatno fermentativne metaboličke puteve. Takva sposobnost mogla bi imati poseban značaj tokom parazitske faze životnog ciklusa, s obzirom na to da je adaptacija na hipoksične uslove prepoznata kao važan faktor

virulencije kod različitih patogenih gljiva [68]. U prilog ovoj pretpostavci idu i studije koje su identifikovale prisustvo etanola u tkivima zaraženim gljivama za koje se smatralo da su obligatno aerobne, što ukazuje na verovatnu aktivaciju fermentativnog metabolizma u hipoksičnom okruženju domaćina [68,69].

U širem ekološkom kontekstu, ovakav mehanizam može imati adaptivni značaj tokom saprofitske faze života *U. maydis* u zemljištu, gdje se gljiva može suočiti sa periodima produženog izgladnjivanja i hipoksije, naročito tokom poplava. U takvim uslovima, difundovanje kiseonika kroz vodom zasićeno tlo je izrazito ograničeno, budući da gasovi, uključujući kiseonik, kroz vodu difunduju približno 10^4 puta sporije nego kroz vazduh.

Takođe je važno naglasiti da je u istraživanju Petković i sar. [65] pokazano da nakon smrti usljed samogenerisane hipoksije ukupna genomska DNK, analizirana gel elektroforezom, pokazuje karakterističan lestvičasti obrazac degradacije DNK, što predstavlja jedan od često korišćenih indikatora programirane ćelijske smrti.

Ovakvo ponašanje u skladu je sa novijim teorijskim modelima evolucije PCD kod jednoćelijskih organizama, prema kojima suicidalno ponašanje neoštećenih ćelija ne može biti selektivno povoljno, već PCD može evoluirati isključivo kao odgovor oštećenih ćelija koje prepoznaju sopstvenu neizbježnu smrt [32]. U tim modelima, PCD omogućava da ćelije ubrzaju umiranje kako bi sačuvale resurse za srodne jedinke, spriječe oslobađanje toksičnih produkata nekroze ili, alternativno, da aktivno pripreme i oslobode molekule koji mogu imati nutritivnu ili kompetitivnu korist za preživjele ćelije. Time sposobnost ćelije da „predvidi“ vlastitu sudbinu predstavlja ključni biološki i ekološki preduslov za evoluciju PCD, dok konkretan oblik i funkcija PCD-a zavise od ekološkog konteksta, životne strategije i genetičke strukture populacije. Posljedično, masovno umiranje najvećeg dijela populacije, praćeno opstankom rijetkih, metabolički prilagođenih ćelija, može omogućiti brzu obnovu populacije nakon normalizacije sredinskih uslova. Na taj način, samogenerisana hipoksija može se posmatrati kao ekstremna, ali potencijalno adaptivna strategija koja povezuje stres, selekciju preživjelih i kasniji populacioni oporavak.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Predmet ove doktorske disertacije je dublje razumijevanje fenomena obnove populacije nakon djelovanja subletalnih doza stresa (RUS) na modelu *Ustilago maydis*. Definisana su dva ključna cilja.

Prvi cilj ovoga rada je pružanje jasnijeg uvida u molekularne mehanizme koji doprinose obnovi populacije nakon ekstremnog stresa, sa posebnim osvrtom na razumijevanje razloga usljed kojih je ovaj proces u *U. maydis* povezan sa zaštitom genoma. Dakle, polazna hipoteza vezana za ovaj cilj je pretpostavka da postoji set ćelijskih faktora čijom se operativnošću objedinjuju ove dvije funkcije.

Radi ostvarenja ovog cilja, formulisana su tri glavna istraživačka zadatka:

- analiza genotoksičnog efekta biomolekula oslobođenih iz mrtvih ćelija nakon snažnog oksidativnog stresa;
- ispitivanje uloge poznatih gena koji učestvuju u zaštiti genoma u prevazilaženju stresogenog efekta RUS supstrata;
- identifikacija i karakterizacija novih ćelijskih faktora zaduženih za oba procesa kroz dva pristupa:
 - putem izolovanja mutanata koji su senzitivni na genotoksične agense, a uz to pokazuju i izraženu nesposobnost proliferacije na RUS supstratima i
 - upoređivanjem ekspresionih RNK profila dobijenih iz kultura odgajenih u regularnom hranljivom medijumu i na RUS supstratima;

Drugi cilj ovog dokorskog rada je fokusiran na dublje razumijevanje uloge programirane ćelijske smrti (PCD), odnosno ćelijskog materijala oslobođenog tokom PCD-a u RUS-u. Ovaj cilj je formulisan na osnovu inicijalnih nalaza da se efekti tretmana peroksidom i autogenerisane hipoksije (SGH) na resurse koenzima A međusobno razlikuju. Dok prvi značajno utiče, ćelijska smrt indukovana autogenerisanom hipoksijom (SGH), ne mjenja dostupost koenzima A preživjelim ćelijama.

Radi ostvarenja ovog cilja, formulisani su sledeći istraživački zadaci:

utvrđivanje da li su hranljive materije oslobođene iz ćelija koje umiru suicidalnom (PCD) smrću generalno povoljnije za rast od derivata oslobođenih iz ćelija koje prolaze kroz nekrotični tip smrti;

- testiranje da li PCD-supstrati mogu neutralisati ili prevazići toksične efekte nekrotične biomase;
- testiranje hipoteze da je ispoljavanje pozitivnih efekata PCD-supstrata zavisno od formiranja supramolekulskih struktura;
- proširivanje analize na druge vrste iz familije *Ustilaginaceae*, kako bi se provjerila species-specifičnost fenomena.

3 Materijal i metode

3.1 Organizmi, sojevi, vektori i uslovi gajenja

3.1.1 Sojevi, vektori i hranljivi medijumi

Sojevi *U. maydis*:

UCM350 (*nar1-6 pan1-1 alb1*) - nominalni divlji soj (wild type, WT)

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

Hranljivi medijumi:

YEPS (engl. „Yeast Extract Peptone Succrose“) tečni medijum: 1% ekstrakt kvasca, 2% pepton i 2% saharoza (Torlak)

YEPSA čvrsta hranljiva podloga - YEPS medijum sa 2% (w/v) agara (Torlak). U hranljivi medijum je dodavan odgovarajući antibiotik: tetraciklin (15 µg/mL) (Sigma), higromicin (100 µg/mL) (Sigma), gentamicin (100 µg/mL) (Sigma), nourseothricin (NAT) (40 µg/mL) (Merck).

Za regeneraciju protoplasta korišćene su čvrste YEPSA podloge suplementovane 0,5 M sorbitolom (Centrohem) (YEPS-S) (radi održavanja izotonične sredine i sprječavanja lize protoplasta), kao i suplementovane odgovarajućim selektivnim antibiotikom za selekciju transformanata.

Sojevi *E. coli*:

DH5α: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 *recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20* φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ⁻

Mega X DH10B T1^R: 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, AmpR (Promega), Topo TA.

pCRTM2.1-TOPO® vektor korišćenjem komercijalnog TOPO TA Cloning® Kit-a (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, USA).

pBluescript KS(+) (Stratagene, USA)

pCM886 shuttle vektor HygR i NatR- izvor kasete za rezistenciju na nourseothricin

pCM935 shuttle vektor HygR i NatR- izvor kasete za rezistenciju na nourseothricin

pCM966 shuttle vektor HygR i NeoR- izvor kasete za rezistenciju na neomicin/gentamicin

pCM956 samoreplikujući vektor HygR BRH2 komplementacija

pCM1018 ekspresioni plazmid HygR DSS1 sa prirodnim promoterom

pCM1019 ekspresioni plazmid HygR DSS1 cDNA pod GAP promoterom

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 (Sigma-Aldrich Co.) u koncentraciji 100 µg/mL ili NAT u koncentraciji 20 µg/mL.

3.1.2 Gajenje *U. maydis* ćelija

Svi divlji sojevi i mutantni *U. maydis* sojevi su gajeni na temperaturi od 30 °C, na Petri šoljama sa čvrstim YEPSA hranljivim podlogama uz dodatak antibiotika tetraciklina (15 µg/mL), i potom čuvani na 4 °C. Prekonoćne kulture su gajene do rane stacionarne faze, u tečnom YEPS medijumu sa dodatkom tetraciklina, na temperaturi od 30 °C uz konstantno miješanje (180 obrt/min) na orbitalnom šejkeru (LabTherm).

Transformanti *U. maydis* su odgajani pod istim uslovima uz dodatak odgovarajućeg selektivnog antibiotika: higromicin (100 µg/mL) (Sigma), gentamicin (100 µg/mL) (Sigma), NAT (40 µg/mL) (Merck).

Za potrebe regeneracije protoplasta nakon transformacije korišćene su čvrste YEPSA podloge sa dodatkom 0,5 M sorbitola radi održavanja izotonične sredine i sprječavanja pucanja protoplasta, kao i odgovarajućeg antibiotika kao selektivnog agensa: higromicin (150 µg/mL) (Sigma), gentamicin (150 µg/mL) (Sigma), NAT (60 µg/mL). Veće doze antibiotika su korišćene s obzirom na to da sorbitol ostvaruje djelimično protektivan efekat na ćelije.

3.1.3 Gajenje i održavanje bakterijskih kultura

Za potrebe izolacije plazmida ili sprovođenja transformacije, sojevi *E. coli* su rutinski gajeni tokom noći na temperaturi od 37 °C, u tečnom LB medijumu ili na čvrstom LA medijumu suplementiranom ampicilinom ili NAT-om. Tečne kulture su inkubirane uz kontinuirano miješanje na orbitalnom šejkeru (LabTherm) pri brzini od 180 obrt/min, čime je obezbijedena adekvatna aeracija. Petri šolje sa bakterijskim kolonijama su skladištene na 4 °C i korišćene u periodu od tri do četiri nedelje, nakon čega su pripremane sveže podloge. Bakterijske kulture su dugotrajno čuvane zamrzavanjem u prisustvu 15% (v/v) glicerola, uz skladištenje na –80 °C.

3.2 Priprema ćelija i određivanje preživljavanja

3.2.1 Priprema početne ćelijske suspenzije za tretmane

Za pripremu početne ćelijske suspenzije namenjene eksperimentalnim tretmanima, prekonoćna kultura *U. maydis* je taložena centrifugiranjem pri $16000 \times g$ u mikrofugi (Eppendorf 5415D) tokom 2 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je ćelijski talog resuspendovan u 1–1,5 mL sterilne destilovane vode. U slučajevima kada su ćelije bile pripremane za tretman vodonik-peroksidom, prekonoćna kultura je dodatno prana tri puta u nekoliko mililitara destilovane vode, kako bi se uklonili ostaci hranljivog medijuma koji bi mogli da umanje efikasnost reakcije.

U većini eksperimenata, početna koncentracija ćelija u suspenziji je iznosila 4×10^7 ćelija/mL. Precizno određivanje broja ćelija vršeno je pomoću komore za brojanje krvnih ćelija (hemocitometar), pri uvećanju $10\times$ na svetlosnom mikroskopu (BA80, Motic).

3.2.2 Semikvantitativno određivanje senzitivnosti i preživljavanja ćelija

Nakon sprovedenih tretmana, preživljavanje ćelija je procijenjivano semikvantitativnim pristupom. Iz tretiranih i netretiranih (kontrolnih) ćelijskih suspenzija pripremano je pet uzastopnih desetostrukih serijskih razblaženja. Iz svakog razblaženja po 10 µL suspenzije je zasejavano na čvrstu hranljivu podlogu, sa desna na lijevo počevši od suspenzije sa najmanjom gustinom ćelija, a zatim je praćena sposobnost ćelija da formiraju kolonije. Zasejane ćelije su inkubirane na čvrstoj YEPSA podlozi tokom 2 dana na 30 °C, do pojave jasno uočljivih kolonija.

3.3 Stres tretmani ćelija *U. maydis*

3.3.1 Tretman vodonik-peroksidom (oksidativni stres)

Ćelije stacionarne faze rasta laboratorijskog divljeg soja *U. maydis* uzgajane su u bogatom medijumu i tri puta ispirane sterilnom destilovanom vodom, nakon čega je određen broj ćelija na hemocitometru i gustina suspenzije ćelija podešena na 4×10^7 /mL. Ćelije su potom izlagane

oksidativnom stresu tretmanom vodonik-peroksidom u uslovima Fentonove reakcije. U pripreмноj fazi, ćelije su inkubirane u 10 mM rastvoru Fe³⁺-natrijum EDTA (Merck) u trajanju od 10 minuta na 30 °C. Nakon toga, u suspenziju je dodavan vodonik-peroksid odgovarajuće koncentracije (0,1–1,1%), a reakcija je nastavljena još 10 minuta na 30 °C uz povremeno miješanje na svakih 3 minuta.

Po isteku tretmana, ćelije su odmah taložene centrifugiranjem pri 16 000 × g u mikrofugi (Eppendorf 5415D), zatim tri puta prane destilovanom vodom i resuspendovane u 1 mL vode, odnosno podešene na početnu koncentraciju od 4 × 10⁷ ćelija/mL. Stepен preživljavanja ćelija pri različitim nivoima oksidativnog oštećenja procijenjivan je semikvantitativno, pripremom desetostrukih serijskih razblaženja tretiranih i kontrolnih suspenzija, zasejavanjem po 10 µL svakog razblaženja na čvrstu hranljivu podlogu i praćenjem sposobnosti formiranja kolonija.

3.3.2 Tretman UV zračenjem

Za UV tretman, oprane ćelije (8 mL suspenzije) su prebačene u plastične Petri šolje dijametра 90 mm i izložene rastućim dozama UV zračenja. Kao izvor UV svetlosti korišćena je germicidna UVC lampa Osram HNS30W G13 Puritec, postavljena na udaljenosti od približno 36 cm iznad površine tečnosti. Intenzitet zračenja iznosio je (184 J/m²) i meren je UV metrom (UV Disc, UV-Technik International Ltd). Petri šolje su postavljane na platformu nagibnog šejkera (MaxQ2000, Thermo Scientific Inc.), nakon čega su izlagane UV zračenju pri čemu su suspenzije snažno miješane frekvencijom od 100 oscilacija u minuti.

3.3.3 Tretman metil-metansulfonatom (MMS)

Za indukciju alkilacionog stresa, suspenzije ćelija su tretirane metil-metan-sulfonatom (MMS) i to u koncentracijama od 0,5%, 0,75% i 1%. Inkubacija suspenzije ćelija u MMS-u je trajala 30 minuta na 30 °C uz miješanje na rotacionom šejkeru. Po završetku tretmana, ćelije su tri puta prane destilovanom vodom i serijska razblaženja vodenih suspenzija su iskapavana na čvrstu hranljivu podlogu za semikvantitativno određivanje preživljavanja.

3.3.4 Tretman ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja

Za stres tretman ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja, oprane ćelije su resuspendovane u sterilnoj vodi i raspodeljene u alikvote od 1 mL u mikrotube zapremine 1,5 mL. Uzorci su podvrgavani ponovljenim ciklusima zamrzavanja na –20 °C u trajanju od 16 sati, nakon čega je sledilo odmrzavanje u trajanju od 8 sati na sobnoj temperaturi. Tretmani su izvođeni u serijama od 3, 5 ili 7 uzastopnih ciklusa. Nakon završetka tretmana, ćelije su odmah korišćene za semikvantitativno određivanje preživljavanja.

3.3.5 Tretman desikacijom

Za stres tretman desikacijom, ćelije su pripremljene u tečnoj suspenziji zapremine 7 mL, sa gustinom od 4 × 10⁷ ćelija/mL, i prebačene u Petri šolje. Suspenzije su ostavljene da miruju kako bi se ćelije istaložile na dno šolje, nakon čega je višak tečnosti uklonjen kapilarnim silama pomoću sterilne papirne vate. Desikacija je zatim sprovedena u laminarnoj komori na sobnoj temperaturi, u trajanju od 3, 5 ili 7 dana. Po isteku perioda desikacije, ćelije su rehidrirane dodavanjem sterilne vode i suspenzije odmah korišćene za semikvantitativno određivanje preživljavanja.

3.4 Priprema RUS/SGH supernatanata

3.4.1 Priprema RUS supernatanata porijeklom od ćelija tretiranih vodonik peroksidom

Prekonoćne kulture *U. maydis* gajene su do stacionarne faze rasta u tečnom YEPS medijumu na 30°C uz konstantnu aeraciju. Ђelije su sakupljane centrifugiranjem u mikrofugi (Eppendorf 5415D) na 16 000 × g, 2 min/sobna temperatura, nakon čega su dva puta prane sterilnom destilovanom

vodom radi potpunog uklanjanja ostataka hranljivog medijuma koji bi mogao da utiče na efikasnost oksidativnog tretmana.

Ćelijski talog je potom resuspendovan u sterilnoj destilovanoj vodi i podešen na početnu koncentraciju od 4×10^7 ćelija/mL. Precizno određivanje broja ćelija vršeno je pomoću hemocitometra pri uvećanju $10\times$ na svetlosnom mikroskopu.

Za indukciju oksidativnog stresa, pripremljene ćelijske suspenzije podvrgavane su tretmanu vodonik-peroksidom putem Fentonove reakcije. U pripremnoj fazi, ćelije su inkubirane u prisustvu 10 mM Fe^{3+} -natrijum-EDTA rastvora tokom 10 minuta na 30 °C. Nakon toga, u suspenziju je dodat vodonik-peroksid u odgovarajućoj koncentraciji (0,6%, 0,7%, 0,8% ili 1,0%), a inkubacija je nastavljena još 10 minuta na 30 °C uz povremeno miješanje. Po završetku tretmana, ćelije su odmah taložene centrifugiranjem u mikrofugi Eppendorf 5415D ($16\,000 \times g$, 2 min), dva puta prane sterilnom destilovanom vodom radi uklanjanja viška vodonik-peroksida i resuspendovane u sterilnoj vodi do početne koncentracije od 4×10^7 ćelija/mL.

Alikvoti ovako tretiranih ćelijskih suspenzija inkubirani su na 30°C uz konstantno miješanje (200 obrt/min) u periodu od 5 časova, kako bi se omogućilo umiranje oštećenih ćelija i oslobađanje unutarćelijskog sadržaja u okolni medijum.

Nakon inkubacije, suspenzije su centrifugirane (5000 obrt/min, 5 min) radi uklanjanja ćelijskih ostataka, a dobijeni supernatanti su filtrirani kroz membranski filter poroznosti 0,45 μm (Millipore) kako bi se uklonile preostale ćelije.

Dobijeni supernatanti, porijeklom od ćelija umrlih usljed oksidativnog stresa indukovano vodonik-peroksidom, su odmah korišćeni ili čuvani na -20 °C do daljeg korišćenja u RUS eksperimentima.

3.4.2 Priprema supernatanata porijeklom od ćelija umrlih u samogenerisanoj hipoksiji

Ćelije su gajene na temperaturi od 30 °C uz konstantno miješanje na orbitalnom šejkeru pri 200 obrt/min tokom 16–20 sati, do dostizanja rane stacionarne faze rasta, kada je gustina kulture iznosila približno $2\text{--}4 \times 10^8$ ćelija/mL. Nakon inkubacije, ćelije su taložene centrifugiranjem pri $\sim 4000 \times g$ (Hermle Z366K ili Eppendorf 5702R), zatim dva puta prane sterilnom vodom i resuspendovane u vodi do konačne koncentracije od 4×10^8 ćelija.

Ukoliko nije drugačije navedeno, alikvoti zapremine 1 mL pripremljene ćelijske suspenzije inkubirani su u mikrotubama zapremine 1,5 mL na 30 °C uz miješanje pri 200 obrt/min u trajanju od 24 h. Tube su dodatno zatvarane parafilmom kako bi se dodatno spriječilo difundovanje kiseonika u tubu. Nakon perioda inkubacije od 24 h tube sa suspenzijama ćelija su otvarane i suspenzije ćelija sakupljane u tubu odgovarajuće zapremine tako da u odnosu na zapreminu suspenzije ćelija ima minimum dvije zapremine vazduha. 10 μL suspenzije je iskapano na YEPSA hranljivu podlogu radi utvrđivanja broja preživjelih ćelija. Sakupljeni alikvoti suspenzije ćelija inkubirani su dodatnih 5 h da bi ćelije oslobodile svoj unutarćelijski sadržaj. Nakon 5 h curenja, ćelije su taložene centrifugiranjem u kliničkoj centrifugi (Hermle Z366K), 5000 obrt/min u trajanju od 5 min. Supernatanti su dodatno oslobođeni od zaostalih ćelija uz pomoć filtriranja kroz filter 0,45 μm (Millipore). Supernatanti su čuvani u zamrzivaču na -20 °C do korišćenja.

Voda korišćena u svim eksperimentima bila je bidestilovana i sterilna, dobijena pomoću sistema za reverznu osmozu (C.C.K.).

3.5 Priprema i transformacija ćelija

3.5.1 Protoplastiranje i transformacija ćelija *U. maydis*

Dan ranije zasijavana je prekonoćna kultura *U. maydis* u 3–5 mL tečnog hranljivog YEPS medijuma. Narednog dana, 0,5 mL stacionarne prekonoćne kulture inokulisano je u 25 mL svježeg

medijuma i inkubacija je vršena sve dok kultura ne dostigne logaritamsku fazu rasta ($OD_{600} = 0,5-0,7$).

Kada je dostignuta log faza, ćelijske kulture su prebacivane u tube od 50 mL i ćelije su taložene centrifugiranjem ($4000 \times g/3 \text{ min}/+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant je odlivan, a talog resuspendovan i opran u 5–10 mL SCS rastvora (1M sorbitol, 20 mM natrijum-citrat, pH 5,8). Suspenzija je ponovo taložena centrifugiranjem pod istim uslovima. Nakon toga supernatant je ponovo odlivan, a talog resuspendovan u 1–2 mL SCS rastvora sa dodatkom 40 mg/mL enzima za liziranje ćelijskog zida (Lysing enzymes from *Trichoderma harzianum*, Sigma). Suspenzija je inkubirana 10–15 min na $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ uz miješanje na orbitalnom šejkeru (LabTherm). Nakon inkubacije, pod mikroskopom (uvećanje $10\times$) provjeravan je stepen protoplastiranosti. Ukoliko stepen protoplastiranosti ne bi bio adekvatan inkubacija je nastavljena uz dodavanje $\sim 20 \text{ mg/mL}$ enzima za liziranje ćelijskog zida. Nakon utvrđivanja uspješnog protoplastiranja najvećeg broja ćelija ($>80 \%$), svi naredni koraci izvođeni su na ledu.

Suspenzija protoplasta prana je sa 10 mL hladnog SCS rastvora, zatim su protoplasti taloženi centrifugiranjem ($1000 \times g/8 \text{ min}/+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Ovaj postupak pranja i centrifugiranja je ponovljen dva puta. Nakon drugog pranja, supernatant je pažljivo uklanjan, a protoplasti resuspendovani laganim miješanjem, bez vorteksovanja, kako bi se očuvao njihov integritet.

Potom je talog protoplasta pran sa 5 mL STC rastvora (1M sorbitol, 0,1M CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), nakon čega je ponovo centrifugiran pod istim uslovima. Supernatant je odlivan, a protoplasti resuspendovani u odgovarajućoj zapremini STC pufera (količina se prilagođava početnom broju protoplasta).

Ovako pripremljeni protoplasti u STC rastvoru su alikvotirani (po 100 μL) u mikrotube od 1,5 mL i čuvani na $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ili odmah korišteni za transformaciju.

Transformacija protoplasta je vršena plazmidnom ili linearnom DNK. 1 μg plazmidne DNK ili 2 μg linearne DNK (2–7 μL) je miješana sa heparinom (Sigma) u finalnoj koncentraciji 0,3% (v/v) i inkubirana na ledu 5 minuta. DNK je potom dodavana u 100 μL protoplasta i smješa je inkubirana na ledu 10 minuta. Nakon dodavanja 500 μL SPTC rastvora (1M sorbitol, 0,1M CaCl_2 , 40% PEG3500, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), smješa je inkubirana na sobnoj temperaturi 15 minuta uz povremeno blago miješanje okretanjem mikrotube. Protoplasti su zasejavani blagim razmazivanjem sprederom (bez pritiska) na YEPS-S čvrste podloge koje su sadržavale selektivni antibiotik u odgovarajućim koncentracijama opisanim u poglavlju 3.1.2. Petri šolje su inkubirane na $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do pojave vidljivih kolonija.

3.5.2 Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju metodom toplotnog šoka

Pojedinačna kolonija soja *E. coli* DH5 α korišćena je za inokulaciju 5 mL LB medijuma, nakon čega je kultura inkubirana preko noći na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ uz kontinuirano miješanje na rotacionom šejkeru (180 obrt/min). Sljedećeg dana, 100 mL svježeg LB medijuma inokulisano je sa 1 mL prekončne kulture i inkubirano na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ uz intenzivnu aeraciju (180 obrt/min) u dvolitarskom erlenmajeru do postizanja srednje logaritamske faze rasta ($OD_{600} \approx 0,4$), što je trajalo približno 3 sata.

Rast ćelija je zaustavljan naglim hlađenjem kulture na ledu, uz inkubaciju u trajanju od 15 minuta. Svi dalji koraci su rađeni na ledu. Kultura je potom raspodjeljivana u dvije prethodno ohlađene tube zapremine 50 mL i centrifugirana 5 minuta pri $2200 \times g$ na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon odlivanja supernatanta, tube su držane na ledu pod uglom od 45° kako bi se zaostala tečnost slila i potom lakše uklonila pipetiranjem.

Ćelijski talog je resuspendovan u 25 mL prethodno ohlađenog 0,1 M CaCl_2 snažnim mućkanjem, a nakon dodavanja još 25 mL istog rastvora i inkubiran na ledu 15 min. Suspenzija je zatim centrifugirana ($2200 \times g$, 5 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) i supernatant odlivan na isti način. Talog je potom resuspendovan u RF2 puferu (1/12,5 volumena početne zapremine LB medijuma) i to tako da je prvo dodavano 2 mL RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl_2 , 15% glicerol, pH

6,8) i kultura resuspendovana laganim miješanjem, nakon čega je dodavano još 2 mL RF2 pufera. Dobijena suspenzija inkubirana je na ledu 15 minuta.

Kompetentne ćelije su alikvotirane u zapremini od 200 µL u mikrotube (1,5 mL), zatim brzo zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80°C do dalje upotrebe ili korišćene neposredno nakon pripreme.

3.5.3 Priprema elektrokompetentnih ćelija *E. coli* za elektroporaciju

Pojedinačna kolonija soja *E. coli* DH5α inokulisana je u 5 mL LB medijuma i inkubirana preko noći na 37°C uz miješanje na orbitalnom šejkeru pri 180 obrt/min. Prekonoćna kultura je zatim diluirana 1:10 u 200 mL svežeg LB medijuma i inkubirana na 37°C uz aeraciju do dostizanja srednje logaritamske faze rasta ($\text{OD}_{600} = 0,3\text{--}0,4$). Kultura je potom deljena u četiri tube zapremine 50 mL, a rast ćelija je zaustavljan inkubiranjem na ledu u trajanju od 30 minuta.

Ćelije su taložene centrifugiranjem u kliničkoj centrifugi (Eppendorf 5702R) na 4°C u trajanju od 15 minuta pri ubrzanju od $1000 \times g$. Dobijeni talozi su resuspendovani na ledu u po 50 mL hladne destilovane vode, nakon čega je centrifugiranje ponavljano pod istim uslovima. Postupak ispiranja u hladnoj vodi je ponovljan, a zatim su po dva taloga spajana i dodatno prana sa po 50 mL hladne destilovane vode. Nakon toga, ćelije su resuspendovane u po 40 mL hladnog 10% (v/v) glicerola i ponovo taložene centrifugiranjem.

Finalno, ćelijski talozi su resuspendovani u 1,5 mL 10% glicerola, deljeni u alikvote od 100 µL u sterilne, ohlađene mikrotube i inkubirani na ledu tokom 10 minuta. Tako pripremljene elektrokompetentne ćelije su korišćene odmah ili brzo zamrznute u tečnom azotu i skladištene na -80°C do upotrebe.

3.5.4 Transformacija ćelija *E. coli* metodom toplotnog šoka

Transformacija bakterija *E. coli* sprovedena je metodom toplotnog šoka, pri čemu su ćelije izlagane kratkotrajnom temperaturnom stresu u prisustvu DNK (plazmidne ili ligacione smješe). Alikvoti od 50 µL kompetentnih ćelija soja DH5α, prethodno čuvanih na -80°C , odmrzavani su i zatim inkubirani na ledu sa približno 200 ng DNK u trajanju od 30 minuta do 1 sata. Nakon inkubacije, uzorci su podvrgavani toplotnom šoku prebacivanjem iz leda u vodeno kupatilo (Mettmert) zagrijano na 42°C tokom 90 sekundi, a zatim su odmah vraćani na led i inkubirani dodatnih 5 minuta.

Transformisane ćelije su potom prebacivane u 1 mL neselektivnog LB medijuma i inkubirane 1 sat na 37°C uz aeraciju. Po završetku perioda oporavka, suspenzije su razmazivane na LA hranljive podloge koje su sadržavale ampicilin i inkubirane preko noći na 37°C .

3.5.5 Transformacija ćelija *E. coli* elektroporacijom

Elektroporaciona transformacija *E. coli* vršena je korišćenjem uređaja Electroporator 2510 (Eppendorf). U eksperimentima su korišćene laboratorijski pripremljene elektrokompetentne ćelije soja DH5α ili komercijalne MegaX DH10B T1^R elektrokompetentne ćelije (Invitrogen). Alikvoti komercijalnih DH10B ćelija zapremine 10 µL su razblaživani sterilnom vodom do ukupne zapremine od 80 µL, nakon čega su inkubirani na ledu sa 5–10 µL genomske DNK *U. maydis* u trajanju od 5 minuta.

Pripremljene smješe su prebacivane u prethodno ohlađene kivete za elektroporaciju sa razmakom između elektroda od 1 mm i podvrgavane elektroporaciji pri naponu od 1250 V. Neposredno nakon impulsa, ćelije su resuspendovane u 1 mL LB medijuma i inkubirane tokom 1 sata na 37°C radi oporavka. Po završetku inkubacije, transformacione smješe su razmazivane na LA podloge koje su sadržavale 100 µg/mL ampicilina i inkubirane preko noći na 37°C .

3.6 Analize oštećenja DNK i tipa ćelijske smrti

3.6.1 Alkalni Komet test

Nivo oštećenja DNK kod ćelija *U. maydis*, inkubiranih u supernatantima porijeklom od ćelija tretiranih 0,7% vodonik-peroksidom (PT-SN) u trajanju od 2h na temperaturi od 30°C uz konstantno miješanje (180 obrt/min) na orbitalnom šejkeru (LabTherm) procjenjivan je primjenom alkalnog komet testa (engl. "Comet test") prema protokolu [70], uz prilagođavanja za rad sa sferoidima [71]. Mikroskopske pločice prethodno su premazivane agarozom normalne tačke topljenja (1%), dok su gelovi pripremani miješanjem suspenzije sferoida (koncentracija 10⁷/mL) sa 1% agaroze niske tačke topljenja (pripremljene u 1 M sorbitolu sa 25 mM KH₂PO₄). Svaki gel činilo je 80 µL smješe dobijene kombinovanjem 30 µL ćelijske suspenzije i 70 µL agaroze niske tačke topljenja. Gelovi su nanošeni u duplikatu na svaku pločicu.

Nakon očvršćavanja gela, pločice su inkubirane 20 minuta u hladnom puferu za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 0,05% laurilsarkozina, pH 10). Zatim su prebacivane u komoru za elektroforezu koja je sadržavala elektroforetski pufer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13). Nakon denaturacije od 10 minuta u istom puferu, je vršena elektroforeza pri naponu od 0,75 V/cm i jačini struje od 300 mA tokom 10 minuta.

Po završetku elektroforeze, pločice su prane u hladnom neutralizacionom puferu (0,4 M Tris, pH 7,5) 10 minuta, potom fiksirane u hladnom etanolu 10 minuta i ostavljane da se suše preko noći u mraku. Bojenje je vršeno nanošenjem 20 µL GelGreen boje za nukleinske kiseline (Biotium) u koncentraciji 2 µL/mL. Analiza je vršena fluorescentnim mikroskopom (Leica DM4 B, Austrija) pri uvećanju od 400×, uz ekscitacioni filter 450–490 nm i barijerni filter 510 nm.

Eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja. Za svaku pločicu analizirano je 50 jedara korišćenjem Comet IV softvera (Instem, SAD), a procenat DNK u repu (engl. „tail intensity %“) bilježen je kao indikator oštećenja DNK.

S obzirom na to da pretpostavke normalnosti raspodjele i homogenosti varijanse nisu bile zadovoljene u slučaju rezultata dobijenih komet testom, varijabilnost između grupa testirana je Kruskal–Wallis-ovom jednofaktorskom analizom varijanse. Za poređenje kontrolne grupe sa grupama tretmana korišćen je Mann–Whitney U test.

3.6.2 Elektroforeza u homogenom električnom polju sa promjenom smijera

Protoplasti željenog soja pripremani su standardnim enzimatskim uklanjanjem ćelijskog zida. Nakon dodatka enzima za uklanjanje ćelijskog zida, formiranje protoplasta je provjeravano mikroskopski, nakon čega su protoplasti jednom oprani u 1 mL SCS pufera.

Za lizu ćelija korišćen je EET pufer sljedećeg sastava (0,1 M EDTA, pH 8,0, 10 mM EGTA, 10 mM TRIS-HCl, pH 8,0). Neposredno prije upotrebe u pufer su dodavani SDS (finalna koncentracija 0,5%) i proteinaza K (finalna koncentracija 0,5 mg/mL). Rastvor proteinaze K u EET puferu prethodno je inkubiran na 50 °C tokom 30 minuta uz blago miješanje u hibridizacionoj peći (Heidoltermoph Promax 1020).

Za pripremu agaroznih blokčića korišćena je 2% SeaKem agaroz. Rastvor je pripreman miješanjem 0,06 g agaroze sa 2,4 mL SCS pufera, 60 µL 0,5 M EDTA i 3 µL N-lauril sarkozila u 15 mL Falcon tubi. Smješa je rastapana u mikrotalasnoj peći, a zatim inkubirana na 42 °C tokom 15–20 minuta. Kalupi za blokčiće prethodno su zatvarani lepljivom trakom sa jedne strane i preinkubirani na 42 °C.

Protoplasti i rastopljena agaroz mešani su u odnosu 1:1 (po 100 µL), nakon čega je smješa raspodjeljivana u kalupe (100 µL po bunaru, po dva bunara po uzorku). Formirani blokčići su ostavljeni da se stegnu na 4 °C tokom 30 minuta.

Nakon polimerizacije, blokčići su pažljivo vađeni i prebacivani u 2 mL prethodno pripremljenog EET pufera sa proteinazom K u 5 mL- tubama. Inkubacija je vršena preko noći na 50 °C u hibridizacionoj komori. Nakon inkubacije, blokčići su prani dva puta u 2 mL 100 mM EDTA, a zatim čuvani u 1 mL 0,45 M EDTA u hladnoj sobi do dalje upotrebe.

Za PFGE (engl. "Pulsed-Field Gel Electrophoresis") je korišćen agarozni gel rastvaranjem 1,05 g standardne agaroze u 140 mL 0,5× TBE pufera. Manja količina rastopljenog gela (2–3 mL) zadržavana je na 65 °C i kasnije korišćena za zatvaranje ležišta nakon ubacivanja uzoraka.

Gel je izlivan u kalupu sa pravilno postavljenim češljem i ostavljen da se potpuno stegne. Nakon uklanjanja češlja, iz svakog uzorka uziman je po jedan blokčić, presecan na pola i pažljivo postavljan u bunarčić gela pomoću špatule i eze. Ležišta su zatim zatvarana dodatkom rastopljenog agaroznog gela.

Elektroforeza je izvođena u 0,5× TBE puferu (2–5 L) u hladnoj sobi, uz konstantnu cirkulaciju i hlađenje pufera pri naponu od 200 V i struji od 228 ± 3 mA, primjenom sljedećeg programa:

- puls 60 s tokom 14 h
- puls 90 s tokom 10 h

3.6.3 Detekcija apoptotičnih i nekrotičnih ćelija (Aneksin V/PI)

Radi razlikovanja živih, apoptotičnih i nekrotičnih ćelija *U. maydis* u suspenzijama tretiranim SGH-om i vodonik-peroksidom, primijenjeno je dvostruko bojenje Aneksin V/PI, korišćenjem FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit-a (Thermo Fisher Scientific), uz modifikacije protokola prilagođene prisustvu ćelijskog zida gljiva.

Za indukciju SGH tretmana, ćelije su dva puta prane destilovanom vodom i njihova suspenzija podešavana na gustinu od 4×10^8 ćelija/mL, nakon čega su raspodeljivane u alikvote od po 1 mL u mikrotube zapremine 1,5 mL. Tube su zatvarane parafilmom i inkubirane na 30 °C na orbitalnom šejkeru u vertikalnom položaju. U definisanim vremenskim tačkama uzimani su pojedinačni, jednokratni alikvoti.

Tretman vodonik-peroksidom sproveden je prema prethodno opisanoj proceduri. Tri puta prane ćelije, podešene na koncentraciju od 4×10^7 ćelija/mL, inkubirane su u 10 mM rastvoru Fe^{3+} -natrijum EDTA (Merck) tokom 10 minuta na 30 °C, nakon čega je dodavan H_2O_2 u koncentraciji od 0,6% i inkubacija je produžavana još 10 minuta. Nakon tretmana, ćelije su tri puta prane destilovanom vodom radi uklanjanja viška vodonik-peroksida.

Nakon sprovedenih tretmana, ćelije su kratko tretirane litičkim enzimom (Sigma-Aldrich) radi povećanja permeabilnosti ćelijskog zida i efikasnijeg difundovanja Aneksin V-FITC konjugata i propidijum-jodida (PI). Ćelije su zatim ispirane PBS-om (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_4 , 18 mM KH_2PO_4) radi uklanjanja ostataka enzima, a potom resuspendovane u 1× Aneksin vezujućem puferu (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) do konačne koncentracije od približno 1×10^6 ćelija/mL.

U suspenziju je dodavano 5 µL Aneksin V-FITC konjugata i 2 µL propidijum-jodida (PI), pri čemu je finalna koncentracija PI iznosila 100 µg/mL. Uzorci su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku.

Nakon inkubacije, ćelije su nanošene na mikroskopska predmetna stakla, prekrivane pokrovnim staklom i analizirane pomoću konfokalnog mikroskopa Leica SP8, uz korišćenje LAS AF softvera (Leica Microsystems), u sekvencijalnom režimu snimanja. Analiza je obuhvatala dva nezavisna eksperimenta, pri čemu je za svaki uzorak brojano ukupno 300 ćelija. Statistička obrada podataka sprovedena je primjenom Tukey-vog t-testa u SPSS softveru, a vrijednosti $p < 0,05$ su smatrane statistički značajnim.

3.7 Molekularno-genetičke metode

3.7.1 Izolacija genomske DNK iz *U. maydis*

Izolacija genomske DNK rađena je modifikovanom hlороform-izoamil alkohol metodom. Pet mililitara prekonoćne kulture uzgajane do stacionarne faze centrifugirano je 1 minut na maksimalnoj brzini ($11\,000 \times g$). Nakon centrifugiranja, supernatant je odlivan, a talog ćelija resuspendovan u 2 mL komercijalnog pufera za liziranje ćelija (DNeasy mericon Food Kit, Qiagen), uz dodatak proteinaze K (50 ng/mL). U resuspendovanu kulturu dodavano je 1/10 zapremine staklenih kuglica (425–600 μm , Sigma), a smješa zatim vorteksovana 1 minut radi efikasnijeg razbijanja ćelijskog zida. Smješa je zatim inkubirana 10 minuta na 65 °C, nakon čega je dodavana jednaka zapremina SEVAG rastvora (hlороform: izoamil alkohol, 24:1). Nakon miješanja obrtanjem tube, uzorak je centrifugiran 10 minuta na maksimalnoj brzini kako bi se razdvojile faze. Gornja faza, koja sadrži nukleinske kiseline, pažljivo je prebacivana u 2 mL ependorf tubu, pazeći da se ne naruši međufaza sa ćelijskim ostacima. Zatim je dodavana ista zapremina SEVAG-a, smješa blago miješana okretanjem ependorf tube i ponovo centrifugirana 10 minuta na $11\,000 \times g$. Gornja faza je zatim prebacivana u novu tubu, a za precipitaciju DNK dodavane su 2/3 zapremine izopropanola. Nakon kratkog miješanja, uzorak je centrifugiran 5–10 minuta na $11\,000 \times g$. Supernatant je pažljivo odlivan, vodeći računa da se precipitat ne odvoji od dna tube. Potom je dodavano 600 μL 70% etanola radi prečišćavanja od soli, tuba je nekoliko puta blago invertovana, a zatim centrifugirana 1 minut. Etanol je pažljivo odlivan, a talog sušen 30 minuta na 37 °C radi potpunog isparavanja rezidualnog etanola. Talog je na kraju resuspendovan u 60 μL vode koja sadrži RNazu A (50 $\mu\text{g/mL}$).

3.7.2 Alternativna procedura izolacije genomske DNK (za uzorke pripremane za sekvenciranje)

Ukoliko su uzorci DNK namijenjeni za sekvenciranje, nakon taloženja izopropanolom, precipitat je resuspendovan u 300 μL destilovane vode, a zatim je dodavan ekvivalentan volumen komercijalnog PB pufera (Qiagen). Dalje prečišćavanje DNK vršeno je upotrebom DNeasy Mericon Food Kit (Qiagen) po uputstvu proizvođača. Dobijena smješa je nanošena na QIAquick kolonicu i centrifugirana 2 minuta na $16\,000 \times g$. Nakon što je filtrat odlivan, na kolonicu je dodato 600 μL AW2 pufera za pranje, pa je centrifugirana 1 minut na $16\,000 \times g$. Filtrat je ponovo odlivan, a kolonica dodatno centrifugirana 1 minut na istoj brzini radi sušenja. Na kolonice prebačene u nove, čiste mikrotube, je nanošeno 50–80 μL komercijalnog pufera za eluciju, i centrifugirane 1 minut na $12\,000 \times g$. Eluat je sakupljan i čuvan na –20 °C do daljeg korišćenja.

3.7.3 Izolacija plazmidne DNK iz *E. coli*

Za potrebe najvećeg broja analiza plazmidne DNK za izolaciju je korišćena Mini prep metoda. Prekonoćna kultura uzgajana je do logaritamske faze rasta ($A_{600} = 0,6\text{--}0,8$), nakon čega su ćelije taložene centrifugiranjem 2 minuta na $16\,000 \times g$. Dobijeni talog resuspendovan je u 300 μL TENS pufera (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 200 mM NaOH, 1% SDS) laganim vertikalnim okretanjem ependorf tube dok smješa ne postane prozirna.

U sljedećem koraku, dodatkom 150 μL rastvora (3 M natrijum-acetat, pH 5,0) postignuta je neutralizacija reakcije. Smješa je zatim centrifugirana 10 minuta na $16\,000 \times g$, a supernatant pažljivo prenošen u nove mikrotube. Za precipitaciju DNK dodavane su 2 zapremine hladnog apsolutnog etanola, a nakon kratkog miješanja uzorci su centrifugirani 5 minuta na $16\,000 \times g$. Supernatant je odlivan, a talog DNK pran sa 500 μL hladnog 70% etanola radi uklanjanja viška soli. Uzorak je centrifugiran 2 minuta na $16\,000 \times g$, a nakon sušenja (na 65 °C ili sobnoj temperaturi) talog je rastvaran u 30–50 μL vode sa RNAazom A (50 $\mu\text{g/mL}$) i inkubiran 30 min na 37°C. Plazmidi su čuvani na –20 °C do daljeg korišćenja. Za izolaciju plazmidne DNK većeg stepena čistoće za potrebe sekvenciranja korišćen je GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) u skladu sa uputstvom proizvođača.

3.7.4 Elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Fragmenti DNK razdvajani su elektroforezom u agaroznom gelu (Serva) koncentracije 1% (odnosno 2% za razdvajanje kraćih fragmenata), pripremljenom u TAE puferu (0,04 M Tris-acetat, 1 mM EDTA). U gelove je dodavan etidijum bromid (Sigma-Aldrich Co.) u konačnoj koncentraciji od 0,5 µg/mL radi vizualizacije DNK.

Elektroforeza je izvođena pri naponu od 5–10 V/cm dužine gela. Nakon razdvajanja, DNK fragmenti su vizualizovani pomoću UV transiluminatora (BioDocAnalyze, Bio-Rad) na talasnoj dužini od 260 nm. Kao standardi za određivanje veličine fragmenata korišćeni su DNK markeri „GeneRuler 1 kb DNA Ladder” i „GeneRuler DNA Ladder Mix” (Thermo Scientific).

Uzorci su prije nanošenja na gel miješani sa bojom za nanošenje koja je sadržavala 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% bromfenol plavo, 0,03% ksilen-cijanolo FF, 60% glicerol i 60 mM EDTA.

3.7.5 Prečišćavanje DNK pomoću natrijum-acetata i apsolutnog etanola

DNK je prečišćavana precipitacijom u prisustvu natrijum-acetata i apsolutnog etanola. U preparate DNK dodavana je 1/10 zapremine 3 M natrijum-acetata (pH 5,2), nakon čega su uzorci pažljivo miješani i inkubirani 5 minuta na ledu. Zatim su dodavane 2 do 2,5 zapremine hladnog apsolutnog etanola, pa su uzorci ponovo blago miješani invertovanjem.

Tako pripremljeni uzorci inkubirani su najmanje 30 minuta na -20 °C radi precipitacije DNK. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 12 000–14 000 × g pri 4 °C. Supernatant je pažljivo uklanjan, vodeći računa da se ne poremeti talog DNK.

Dobijeni talog je zatim pran dodatkom 500 µL 70% etanola, nakon čega su uzorci kratko centrifugirani (5 minuta) na 12 000 × g. Supernatant je odlivan, a talog sušen.

Na kraju, DNK je resuspendovana u odgovarajućoj zapremini sterilne dejonizovane vode ili TE pufera i čuvana na -20 °C do dalje upotrebe.

3.7.6 Prečišćavanje DNK fragmenata iz agaroznog gela

DNK fragmenti izdvojeni iz agaroznog gela nakon restrikcione digestije prečišćavani su korišćenjem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), prema uputstvu proizvođača. Isečeni blokčići gela koji sadrže DNK od interesa inkubirani su u PB puferu (odnos zapremine PB pufera i mase gela 1:1) na 50 °C, do potpunog rastvaranja agaroze.

Dobijena smješa je nanosena na QIAquick spin kolonu i centrifugirana 1 minut pri maksimalnoj brzini. Kolona sa vezanom DNK je potom prana sa 500 µL AW pufera, nakon čega je vršeno dodatno centrifugiranje radi uklanjanja ostataka pufera. DNK je eluirana sa 25 µL EB pufera, uz inkubaciju od 2 minute na sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedilo centrifugiranje u trajanju od 2 minute.

Eluat je dodatno prečišćavan gel-filtracijom na koloni sa sefakrilom S-300 (Cytiva). Kolone su pripremane nanošenjem 400 µL sefakrila na Microspin G-25 kolone (Cytiva), nakon čega su centrifugirane (1 minut, 750 × g), prane destilovanom vodom i ponovo centrifugirane pod istim uslovima. Dobijeni eluati su naslojavani na pripremljene kolone koje su zatim centrifugirane (1 minut, 750 × g).

3.7.7 Digestija DNK restrikcionim enzimima

Digestija DNK izvođena je korišćenjem komercijalnih restrikcionih enzima (Thermo Fisher Scientific) i odgovarajućih pufera, u skladu sa preporukama proizvođača. Reakciona smješa sadržavala je 5 U restrikcionog enzima, 500 ng do 1 µg plazmidne DNK i 1× odgovarajućeg pufera.

Reakcije su inkubirane na optimalnoj temperaturi za aktivnost datog enzima, koja je u većini slučajeva iznosila 37 °C. Nakon završetka digestije, enzimi su inaktivirani inkubacijom na 65 °C u trajanju od 10–20 minuta.

3.7.8 Ligacija DNK lanaca

Ligacija DNK sprovedena je korišćenjem T4 DNK ligaze u cilju recirkularizacije vektora ili insercije odgovarajućeg fragmenta. Za religaciju, vektor (≈ 500 ng), prethodno linearizovan restrikcijom digestijom i oslobođen odgovarajućeg fragmenta, inkubiran je u prisustvu 3 U T4 DNK ligaze u $1\times$ restrikcijom puferu (Thermo Scientific). U slučajevima ligacije sa insertom, fragment dobijen restrikcijom digestijom iz drugog plazmidnog konstrukta dodat je u reakcionu smjesu pod istim uslovima.

Reakcije smješe inkubirane su preko noći na $16\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega je ligaza inaktivirana inkubacijom na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 5 minuta. Dobijene ligacione smješe korišćene su direktno za transformaciju kompetentnih ćelija soja *Escherichia coli* DH5a.

3.7.9 Reakcija lančanog umnožavanja fragmenata DNK

Amplifikacija segmenata DNK sekvence (engl. "Polymerase Chain Reaction - PCR") rađena u mikrotubama zapremine 0,5 mL u kojima je dodata smjesa u finalnoj zapremini 25 μl , koja sadrži odgovarajući pufer, amonijum jonski (75 mM Tris-HCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % Tween-20) ili kalijum jonski (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), 1,5-2,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP, 0,2-0,5 mM svakog prajmera, 1-1,25 U Taq polimeraze i 20-50 ng DNK matrice. Nakon dodavanja svih komponenti smjesa je blago mešana te oborena uz kratko centrifugiranje vodeći računa da nema zaostalih mjehurića. Profil reakcije je zavisio od konkretne primjene. Generalno, program je obuhvatao sljedeće korake: inicijalna denaturacija, odgovarajući broj ciklusa denaturacije, vezivanja prajmera, ekstenzija, i finalna produžena ekstenzija. Uslovi reakcija lančanog umnožavanja koji su korišćeni prikazani su u **Tabelama 1 i 2**, pri čemu je PCR protokol prikazan u **Tabeli 1** primenjivan u većini eksperimenata za rutinsku amplifikaciju DNK fragmenata, dok je dvostepeni PCR protokol prikazan u **Tabeli 2** korišćen u okviru SfiI strategije konstrukcije delecionihi fragmenata, uz primjenu prajmera dizajniranihi sa SfiI restrikcijonim mjestima radi omogućavanja usmjerenog spajanja fragmenata.

Tabela 1. Uslovi korišćeni za lančano umnožavanje

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija dvolančane DNK	95°C	5 min	
Denaturacija DNK	95°C	45 s	26 ciklusa
Hibridizacija prajmera (<i>engl. annealing</i>)	56-60°C	30 s	
Elongacija	72°C	1 min	
Finalna elongacija	72°C	5 min	

Tabeli 2. Uslovi dvostepenog lančanog umnožavanja

Faza reakcije	Temperatura	Vreme	
Inicijalna denaturacija dvolančane DNK	95°C	5 min	7 ciklusa
Denaturacija DNK	95°C	35 s	
Hibridizacija prajmera (<i>engl. annealing</i>)	32-35°C	30 s	
Elongacija	72°C	1 min	
Denaturacija DNK	95°C	35 s	26 ciklusa
Elongacija	72°C	1 min	
Finalna elongacija	72°C	5 min	

Nazivi prajmera koji su korišćeni za identifikovanje mutacije, njihove sekvence, target geni i matrice su prikazani u **Tabeli 3.**

Tabela 3. Spisak prajmera korišćenih u PCR reakcijama

Lokus	Prajmer	Sekvenca (5'–3')	Matrica
/	54Hyg	ACACGACTCACATCTGC	pCM54 plazmid (genomska biblioteka)
/	54R2	CACACAGGAAACAGCTATGACC	

UMAG_06503	U1AF	GTGATTGTCCCCGCGTGAGG	Genomska DNK u regionu lokusa UMAG_06503
	U1AR	ACATAGGCCTGAGTGGCCTTATTATACACTGTTTCAG	
	U1BF	ATACAGGCCATCTAGGCCGAAAAACGTATGAA	
	U1BR	TACGGGCAGTGAGCAGCGAGTGG	
	U1ΔR	CTTTTCAGCCTTTTTCGCTTCCTGTTGC	
UMAG_01716	U2AF	GGCGAAACGTCGGCCACTACCTTG	Genomska DNK u regionu lokusa UMAG_01716
	U2AR	ACATAGGCCTGAGTGGCCTGTGCTATGGAA	
	U2BF	ATACAGGCCATCTAGGCCATTCTTGCTTACAAC	
	U2BR	TACGGGCGGCAATTTCTTCCATGC	
	U2ΔR	ACCTCCAAGATGCGCTTCAGCAAACC	
UMAG_05938	U4AF	GGGGCAATGTGCTGTACGGTTAAATCC	Genomska DNK u regionu lokusa UMAG_05938
	U4AR	ACATAGGCCTGAGTGGCCTGAATGGTTCAAT	
	U4BF	ATACAGGCCATCTAGGCCAGATCAAGGTGGT	
	U4BR	AAACTCGTTCTGATTGCGACTTGTCACCTTGG	
	U4ΔR	CGCGATGCGGACGGTAACAACTACC	
UMAG_04974	U5AF	AAAGCCGTCAGCGACAACCGCAAT	Genomska DNK u regionu lokusa UMAG_04974
	U5AR	ACATAGGCCTGAGTGGCCTTATGATGTCCAAA	
	U5BF	ATACAGGCCATCTAGGCCACGTCGAGTCTT	
	U5BR	TACTCATCCAGGCGTTGGCGATGC	
	U5ΔR	CGACTTGTAAGTTGGGCGAAGAGCGG	
UMAG_02336	U6AF	GCTTGTGGTTCTCGCCCTACTGGTTCG	Genomska DNK u regionu lokusa UMAG_02336
	U6AR	ACATAGGCCTGAGTGGCCTGGAAGAGAAGC	
	U6BF	ATACAGGCCATCTAGGCCAGTCAAGAAGGAG	
	U6BR	GAGATGAGATGTTGGTTGCGGCTGGT	
	U6ΔR	GCTTGCCCCGAAACGAAGCGC	
UMAG_01332	NDX1AF	TCGTCAGTGCTAGGTGCTTG	Genomska DNK u regionu lokusa UMAG_01332
	NDX1AR	CGTGCTGACTCGACCCTATC	
	NDX1BF	CTCACCGATCTCAGACTGGC	
	NDX1BR	TGCATCACACGGATGACAT	
	NDX1ΔR	GCTGTATCTCCACCATGCGA	
UMAG_05408	USP7F1	ATCTGCATCTTCTGCCCTGT	Genomska DNK u regionu lokusa UMAG_05408
	USP7R1	ACGGCTTTGCGAAAATAATG	
	USP7F2	CTCGTCCCATCATCGAGAAC	
	USP7R2	TAAGCTGCAGGTGGAGGACT	
	USP7F3	GTCAAGGGCATGAACAACCT	

	USP7R3	CGCGACTTGAAGTTGAGGTA	
	USP7F3	ACCTCACCGTCAAGCTCATT	
	USP7R3	TTGGCTGCCATCATATCGTA	
	USP7F4	GCAGAATCAGATCAAGGTGCT	
	USP7R4	TCCTCCAAGTAGGTGGGTTG	
	USP7F5	TTCCGCTTTGTAGTGAAACG	
	USP7R5	GCGTCAGCTTTTGTAGGTC	
UMAG_04157	rgs2F1	ACCGTTGCCTTTGACCTCAG	Genomska DNK u regionu lokusa UMAG_04157
	rgs2R1	CTGCAGGATGACAGCTCAGA	
	rgs2F2	AAGGTCGACCGCAAACCTCTC	
	rgs2R2	TGATCAGCAGTTCTTGGCCC	
	rgs2F3	CCTCAGGCAGACGCAGAATG	
	rgs2R3	GAGCGAGCTTGATTACGCCT	
UMAG_01196	RACK1F1	GCAACTTGCAACACAGCAGA	Genomska DNK u regionu lokusa UMAG_01196
	RACK1R2	GAGGTGGCAATGGCGGTAAT	
	RACK1F2	TTCAAGGCGACGTACCCATC	
	RACK1R2	CCTTGGCAGCCTTGAGTCTT	
	RACK1R3	TTCAGCCCTAACCCCCAGAA	
	RACK1F3	AGTAACGGTTGGGCGAGAAG	
	RACK1F4	CATCAACACGGTCACTGTCTC	
	RACK1R4	ACTGTAGCGCCGAAAGGAG	

3.8 UV mutageneza divljeg soja *U. maydis* UIMG10 i izolacija Rgs mutanata

Alikvoti od približno 10^6 ćelija prekonoćne kulture divljeg soja *U. maydis* UIMG10 zasejavani su na Petri šolje, nakon čega su ćelije izlagane UV zračenju u dozi od 250 J/m^2 . U navedenim uslovima UV mutageneze, prosječna stopa preživljavanja iznosila je oko 0,05%, što je odgovaralo približno 500 preživjelih ćelija po Petri šolji. Dobijene kolonije su dalje korišćene za pretraživanje mutanata sa povećanom senzitivnošću na MMS i smanjenom sposobnošću rasta u RUS supernatantima.

Djelovi pojedinačnih kolonija su uzimani sterilnom čačalicom i paralelno prenošeni na Petri šolje sa YEPSA hranljivom podlogom koja je sadržavala MMS u koncentraciji od 0,02%, kao i na kontrolne YEPSA podloge bez dodatka MMS-a, kako bi se grubo procijenila senzitivnost kandidata na MMS. Inokulisane ploče su inkubirane na 30°C tokom dva dana.

Za kandidate koji su pokazali uočljiv stepen senzitivnosti, zasejavane su prekonoćne kulture u tečnom YEPS medijumu, a gustina ćelija je kod svih kandidata podešavana na 4×10^7 ćelija/mL.

Ovi mutanti su zatim testirani za senzitivnost na različite genotoksične agense, uključujući MMS (0,015%), DEB (0,01%), UV zračenje (120 J/m²) i hidroksiureu (HU; 3 mM). Za dalji rad su odabirani isključivo oni kandidati koji su pokazivali senzitivnost na najmanje jedan od primijenjenih genotoksičnih agenasa, sa preživljavanjem manjim od 1%.

Odabrani kandidati su dodatno testirani za sposobnost rasta u supernatantima dobijenim nakon tretmana ćelija vodonik-peroksidom u koncentracijama od 0,6%, 0,8% i 1%. Rast je praćen na 24 h u periodu od 3 dana i mjeren semikvantitativno uz pomoć spot eseja. Mutanti koji su ispoljavali smanjenu sposobnost rasta u ovim uslovima sačuvani su za dalja ispitivanja i označeni kao Rgs- (RUS-genotoksin senzitivni).

3.9 Identifikacija i funkcionalna karakterizacija mutiranih gena

3.9.1 Identifikacija gena komplementacionim kloniranjem

Geni koji komplementiraju mutirane alele identifikovani su primjenom komplementacionog kloniranja, transformacijom protoplasta mutanata genomskom bibliotekom porijeklom iz divljeg soja. Biblioteka je bila konstruisana u samoreplikujućem plazmidnom vektoru pCM54. Transformacije smješe odgovarajućih mutantata su zasejavane na YEPSA podloge sa dodatkom 0,5 M sorbitola radi održavanja izotonične sredine i selektivnog agensa-higromicina u koncentraciji od 150 µg/mL (Sigma). Nakon dva dana rasta transformanata na 30°C, transformanti sa komplementiranim fenotipom su selektovani na MMS (0,025%) selektivnim podlogama primjenom metode otiskivanja (engl. „replica plating“).

Transformanti koji su pokazivali otpornost na primijenjeni genotoksični agens, odnosno fenotip sličan divljem soju, identifikovani su kao potencijalni nosioci komplementirajućih genomskih fragmenata i dalje su podvrgavani semikvantitativnoj analizi. U tu svrhu, iz prekonoćnih kultura odabranih transformanata pripremane su ćelijske suspenzije koncentracije 4×10^7 ćelija/mL, nakon čega su izvođena desetostruka serijska razblaženja i zasejavanje na YEPS hranljivu podlogu (kontrola), kao i na YEPSA podloge koje su sadržavale genotoksične agense.

Dodatna validacija komplementacije sprovedena je testiranjem vijabilnosti transformanata nakon tretmana vodonik-peroksidom u koncentracijama od 0,3% i 0,4%, kao i praćenjem oporavka ćelija nakon 1, 2 i 3 dana inkubacije. Za ove analize, nasumično je birana po jedna pojedinačna kolonija svakog transformanta.

Iz odabranih kandidata izolovana je totalna DNK, koja je potom korišćena za elektrotransformaciju *E. coli* DH5α soja, u cilju umnožavanja plazmida. Granice komplementirajućih genomskih fragmenata identifikovane su sekvenciranjem (Macrogen Europe) i naknadnom bioinformatičkom analizom dobijenih DNK sekvenci. Nakon toga, pojedinačni geni su subklonirani i testirani za sposobnost komplementacije mutantnog fenotipa. Kada je utvrđeno koji kandidat-gen uspješno komplementira fenotip mutanta, odgovarajući alel dotičnog gena iz mutanta je amplifikovan PCR reakcijom i sekvenciran da bi se ustanovio tip i pozicija mutacije.

3.9.2 Transfer delecionih alela u ćelije suprotnog pola putem mejotičke segregacije

Za prenos alela između sojeva suprotnih polova korišćen je seksualni ciklus gljive *Ustilago maydis*, koji omogućava mejotičku rekombinaciju i segregaciju genetičkog materijala. Prekonoćne kulture kompatibilnih haploidnih sojeva podešene su na gustinu od 2×10^8 ćelija/mL i miješane u jednakim zapreminama radi omogućavanja ukrštanja.

Dobijena suspenzija korišćena je za infekciju biljaka kukuruza ubrizgavanjem u stabljiku u blizini pazuha listova. Nakon infekcije, dolazi do formiranja dikariotske filamentozne forme, razvoja tumora i diferencijacije diploidnih teliospora.

Nakon razvoja braon pigmentacije gala (indikator maturacije spora) gale su prikupljane i čuvane u zatvorenim posudama na sobnoj temperaturi radi dodatnog sazrevanja. Zrele teliospore su

izolovane iz gala, resuspendovane u tečnom YEPS medijumu i zasejavane na čvrstu podlogu radi klijanja. Tokom klijanja teliospora dolazi do završetka mejoze i formiranja haploidnih bazidiospora, koje predstavljaju segregante nastale nakon mejotičke rekombinacije. Dobijene kolonije su dalje analizirane i selektovane u cilju identifikacije željenih kombinacija alela i njihove distribucije u ćelije odgovarajućeg pola.

Kompatibilnost polova ispitivana je ukrštanjem haploidnih sojeva na čvrstoj podlozi sa dodatkom 0,9% kukuruznog brašna i 1% aktivnog uglja. Tečna suspenzija ćelija je zahvatana sterilnom ezom i prenošena u vidu linije na hranljivu podlogu. Drugi soj je ezom prebacivan u vidu kratkih upravnih linija koje se ukrštaju sa prvim sojem. Nakon inkubacije na 25–30 °C tokom 24–48 h analiziran je tip rasta. Formiranje belih, filamentnih kolonija na mestu ukrštanja dva soja ukazivalo je na uspešnu dikarionizaciju i kompatibilnost polova, dok je odsustvo filamentacije ukazivalo na nekompatibilnost.

3.9.3 Konstrukcija delecionih (knock-out) sojeva *U. maydis*

3.9.3.1 Konstrukcija „knock-out“ sojeva metodom restrikcije i ligacije

Za inaktivaciju ciljanih gena putem homologne rekombinacije generisani su „knock-out“ konstrukti, tako što su korišćene uzvodne (A ruka) i nizvodne (B ruka) homologne sekvence dužine približno 500–1000 bp, u zavisnosti od gena. Homologne sekvence su amplifikovane PCR-om iz genomske DNK divljeg soja *U. maydis*. U svim slučajevima, konstrukti su dizajnirani tako da zamene veći dio N-terminalnog regiona ciljanog gena, uključujući start kodon, čime je obezbeđivana efikasna genska disrupcija. Za potrebe selekcije korišćen je gen za nurseotricin acetiltransferazu, koji obezbeđuje rezistenciju na NAT antibiotik, pod kontrolom *gap* promotora. U većini slučajeva orijentacija ovog gena je bila ista kao i gena kandidata za disrupciju.

PCR-umnožene uzvodne i nizvodne homologne sekvence su najprije insertovane u vektor TOPO PCR 2.1 (Invitrogen), nakon čega su rekombinantni plazmidi analizirani restrikcionom digestijom radi identifikacije klonova sa odgovarajućom orijentacijom inserata. Plazmidi sa potvrđenom orijentacijom homolognih sekvenci potom su korišćeni za dalju konstrukciju.

U standardnoj strategiji, uzvodne i nizvodne homologne sekvence su pojedinačno isjecane odgovarajućim restrikcionim enzimima (*Bam*HI i *Xba*I, odnosno *Bam*HI i *Xho*I), prečišćavane iz gela i istovremeno insertovane u vektor pBluescript KS+ prethodno otvorenim enzimima *Xho*I i *Xba*I. Nakon potvrde prisustva i orijentacije obe homologne ruke u pBluescript vektoru, dobijeni plazmid je otvoren *Bam*HI restrikcionim enzimom, a selektivni marker *gap*-NAT, izolovan iz plazmida pCM935 digestijom istim enzimom, je insertovan između homolognih sekvenci.

U slučajevima kada su uzvodna i/ili nizvodna homologna sekvenca sadržavale restrikciona mesta korišćena u standardnoj strategiji (*Bam*HI, *Xba*I ili *Xho*I), primenjena je alternativna strategija kloniranja. U tom slučaju, homologne sekvence su nakon umnožavanja PCR-om insertovane u TOPO PCR 2.1 vektor i pravilna orijentacija je potvrđena analizom restrikcionim enzimima. Zatim su uzvodne i nizvodne homologne sekvence iskrajane odgovarajućim restrikcionim enzimima (*Eco*RV i *Not*I za uzvodnu, odnosno *Hind*III i *Not*I za nizvodnu sekvencu) i istovremeno ugrađene u pBluescript KS+ prethodno otvoren enzimima *Eco*RV i *Hind*III. Po potvrdi pravilne orijentacije homolognih sekvenci, dobijeni plazmidi su linearizovani enzimom *Eco*RV, a selektivni marker (NAT), izolovan iz plazmida pCM886 isečen enzimima *Eco*RV i *Pvu*II, insertovan je između homolognih sekvenci putem ligacije ravnih krajeva.

Linearizovani „knock-out“ konstrukti korišćeni su za transformaciju *U. maydis* protoplasta. Pripremljeni protoplasti su inkubirani sa odgovarajućom količinom linearne DNK, nakon čega su transformacione smješe zasejavane na selektivne hranljive podloge koje su sadržavale NAT. Kolonije koje su pokazivale rezistenciju na antibiotik su striklovane do pojedinačnih kolonija na neselektivnim podlogama i inkubirane dva dana, nakon čega su ponovo presejavane na selektivnu podlogu kako bi se potvrdila stabilnost integracije antibiotske kasete (dupli „crossing over“).

Iz potencijalnih „knock-out“ mutanata je izolovana ukupna DNK te je analizirana dijagnostičkim PCR-om kako bi se potvrdila pravilna integracija konstrukata putem homologne rekombinacije. U analizi je korišćen 5' prajmer dizajniran na početku uzvodne homologne sekvence (tj. rukeA), u kombinaciji sa 3' prajmerom koji se vezuje unutar regiona gena koji je u „knock-out“ konstrukt zamenjen *NAT* markerom, čime je proveravano odsustvo wt alela. Dodatna potvrda uspešne integracije dobijena je PCR-om korišćenjem istog 5' prajmera iz A ruke u kombinaciji sa 3' prajmerom specifičnim za *NAT* gen, čime je potvrđivana integracija selektivnog markera na ciljnoj genomskoj lokaciji. Samo transformanti kod kojih su dobijeni očekivani PCR produkti korišćeni su za dalja ispitivanja.

3.9.3.2 Konstrukcija „knock-out“ sojeva primjenom „*Sfi*I strategije“

„*Sfi*I strategija“ se zasniva na istom principu kao i gore opisan pristup, osim što se PCR fragmenti (A i B ruke) generišu upotrebom specifično dizajniranih prajmera, a za selekciju se koristi rezistencija na gentamicin.

Sklapanje „knock-out“ konstrukata vršeno je strategijom zasnovanom na upotrebi restriktionog enzima *Sfi*I (GGCCNNNN[^]NGGCC, gdje N može biti bilo koji nukleotid), koja omogućava visoko kontrolisano usmjereno spajanje fragmenata zahvaljujući mogućnosti da se između palindromskih sekvenci za ovaj enzim variraju različiti nukleotidi, čime se generišu specifični ljepljivi krajevi. Preciznije, 3' prajmer za A ruku i 5' prajmer za B ruku dizajnirani su tako da sadrže sekvencu za *Sfi*I restriktiono mjesto sa varijabilnim nukleotidnim regionima (A ruka: TGAGT; B ruka: ATCTA A), koji nakon digestije dovode do formiranja različitih ljepljivih krajeva, čineći krajeve ovih fragmenata međusobno nekompatibilnim, dok je komplementarnost sa selektivnim markerom obezbjeđena odgovarajućim dizajnom korespondirajućih *Sfi*I krajeva (gen za rezistenciju na gentamicin: 5' prajmer- ACTCA; 3' prajmer – TAGAT).

Nakon PCR umnožavanja, amplifikoni su klonirani u TOPO PCR 2.1 vektor i potvrđivani sekvenciranjem. Dobijeni konstrukti su potom isjecani enzimom *Sfi*I, čime su oslobođane homologne ruke sa unaprijed definisanim specifičnim ljepljivim krajevima, nakon čega su fragmenti prečišćavani iz agaroznog gela. Paralelno, gen za rezistenciju na gentamicin izolovan je iz plazmida pCM966 digestijom enzimom *Sfi*I i prečišćen iz agaroznog gela.

Nakon toga je vršena istovremena ligacija A ruke, B ruke i gena za rezistenciju na gentamicin, pri čemu su fragmenti mogli biti spajani u unaprijed definisanom redoslijedu: uzvodna homologna sekvenca (A ruka) – gen za rezistenciju na gentamicin (*neomicin fosfotransferaza*) nizvodna homologna sekvenca (B ruka).

Dobijeni konstrukti su korišćeni kao matrica za umnožavanje kompletnog delecionog fragmenta. Za ovu svrhu je vršena PCR reakcija u kojoj su kao prajmeri korišćeni oligonukleotidi dizajnirani na spoljnim krajevima A i B ruku, čime je amplifikovan linearni fragment koji obuhvata čitav „knock-out“ konstrukt. Na ovaj način je dobijen linearni delecioni fragment bez potrebe za njegovim prethodnim kloniranjem i propagacijom u plazmidnom vektoru. Dobijeni PCR produkt je pročišćavan iz reakcione smješe i korišćen za transformaciju *Ustilago maydis* primjenom metode transformacije protoplasta, kao što je prethodno opisano za konstrukte dobijene standardnom strategijom. Takođe su selekcija transformanata i potvrda pravilne integracije vršene identičnim, gore opisanim pristupom.

3.10 Sekvenciranje cijelih genoma

Za mutante kod kojih identitet mutiranog gena nije bilo moguće utvrditi metodom komplementacionog kloniranja, primijenjeno je sekvenciranje cijelih genoma (engl. „Whole Genome Sequencing“, WGS). Dobijene sekvence su analizirane poređenjem kako sa referentnim genomom, tako i sa polaznim (roditeljskim) sojem iz kog su mutanti nastali, u cilju identifikacije mutacija odgovornih za uočene fenotipove.

3.10.1 Fragmentacija genomske DNK

Fragmentacija genomske DNK izvršena je mehanički, korišćenjem uređaja Covaris model, sa ciljanom veličinom fragmenata od približno 300–400 bp. Kao polazni materijal za fragmentaciju korišćeno je 1000 ng genomske DNK po uzorku. Nakon fragmentacije, DNK je prečišćavana primjenom magnetnih kuglica, pri čemu su selektivno zadržavani fragmenti željenog raspona dužina. Distribucija veličine fragmenata provjeravana je i potvrđena uz pomoć Agilent TapeStation 4150 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

3.10.2 Popravka krajeva, A-tailing i ligacija adaptera

Prečišćeni fragmenti DNK su potom podvrgnuti popravci krajeva (engl. „end-repair“), nakon čega je vršeno dodavanje adeninskih nukleotida na 3' krajeve (engl. „A-tailing“). Na tako pripremljene fragmente povezani su adapteri specifični za pojedinačne uzorke, u skladu sa BGI/MGI protokolom. Nakon ligacije adaptera, biblioteke su dodatno prečišćene korišćenjem magnetnih kuglica radi uklanjanja viška adaptera i neželjenih kratkih fragmenata.

3.10.3 Cirkularizacija biblioteke i priprema DNK nanoloptica

Adapter-ligirane biblioteke su zatim denaturisane i prevođene u jednolančanu formu, nakon čega je vršena cirkularizacija DNK fragmenata. Linearni i nekompletno cirkularizovani molekuli su uklanjani enzimatskom digestijom. Iz prečišćene cirkularne biblioteke dalje su generisane DNK nanoloptice (engl. „DNA nanoballs“-DNB) primjenom kotrljajućeg kružnog umnožavanja, u skladu sa standardnim BGI/MGI postupkom. Dobijene nanoloptice korišćene su za dalje sekvenciranje.

3.10.4 Učitavanje DNB i sekvenciranje

DNB su nanošeni na sekvencioni nosač i sekvencirani na MGI DNBSEQ-G400 platformi u režimu paired-end [2×150 bp]. Parametri sekvenciranja i ciljana dubina pokrivenosti bili su $\geq 100\times$ po uzorku.

3.10.5 Bioinformatička obrada podataka sekvenciranja cijelih genoma

Sirovi podaci dobijeni nakon sekvenciranja najprije su podvrgavani kontroli kvaliteta (Fastqc v0.12.1), nakon čega je vršeno filtriranje očitavanja koje je obuhvatilo uklanjanje sekvenci adaptera, trimovanje baza niskog kvaliteta i eliminaciju kratkih ili nekvalitetnih očitavanja (fastp v0.23.4). Visokokvalitetna očitavanja su potom mapirana na (indeksirani) referentni genom *U. maydis* 521 odgovarajućim algoritmom za poravnanje sekvenci (Burrows-Wheeler algoritam bwa v0.7.18). Dobijeni fajlovi poravnanja su konvertovani u BAM format, sortirani po genomskim koordinatama i indeksirani, čime su pripremljeni za dalju analizu.

Na osnovu BAM fajlova vršeno je „pozivanje“ varijanti (freebayes v1.3.8), pri čemu su identifikovane tačkaste mutacije (engl. „Single Nucleotide Polymorphism -SNP“) i male insercije/delecije (indeli). Dobijene varijante su filtrirane prema standardnim kriterijumima kvaliteta, uključujući dubinu pokrivenosti i kvalitet „poziva“. Urađena je normalizacija VCF fajla (bcftools v1.20) i zatim indeksiranje.

Na kraju je vršena anotacija a nakon toga spajanje pojedinačnih vcf datoteka u jednu datoteku uz pomoć komande „merge“ (bcftools).

3.10.6 Identifikacija i filtriranje mutacija

Za identifikaciju mutacija specifičnih za pojedinačne mutante korišćen je objedinjeni VCF fajl koji je sadržavao sve analizirane uzorke. Filtriranje varijanti sprovedeno je primjenom alata „bcftools query“, uz selekciju pozicija na osnovu genotipa i frekvencije alela u pojedinačnim uzorcima.

Najprije su identifikovane pozadinske varijante prisutne u polaznom (roditeljskom) soju u odnosu na referentni genom, ograničene na kodirajuće regione i sa minimalnom dubinom očitavanja

većom od 20. Kao kriterijum za prisustvo varijante u polaznom soju korišćen je referentni genotip sa niskom frekvencijom alternativnog alela ($AF < 0,1$). Ove pozicije su isključene iz dalje analize.

U narednom koraku izdvajane su pozicije koje su se razlikovale između mutanata i polaznog soja. Kao kandidatne mutacije definisane su varijante kod kojih je mutantni uzorak nosio alternativni alel sa visokom frekvencijom ($AF > 0,9$), dok je isti lokus u polaznom soju i ostalim analiziranim uzorcima zadržavao referentni alel sa niskom frekvencijom alternativnog alela ($AF < 0,1$).

Identifikovane varijante su potom dodatno ručno pregledane i klasifikovane prema prirodi promjene na nivou kodirajuće sekvence, pri čemu je određivano da li se radi o mutaciji sa izmijenjenim smislom, mutaciji bez smisla, ili promjeni okvira čitanja. Ovim postupkom dobijen je konačan skup potencijalno kauzalnih mutacija korišćen za dalju funkcionalnu interpretaciju.

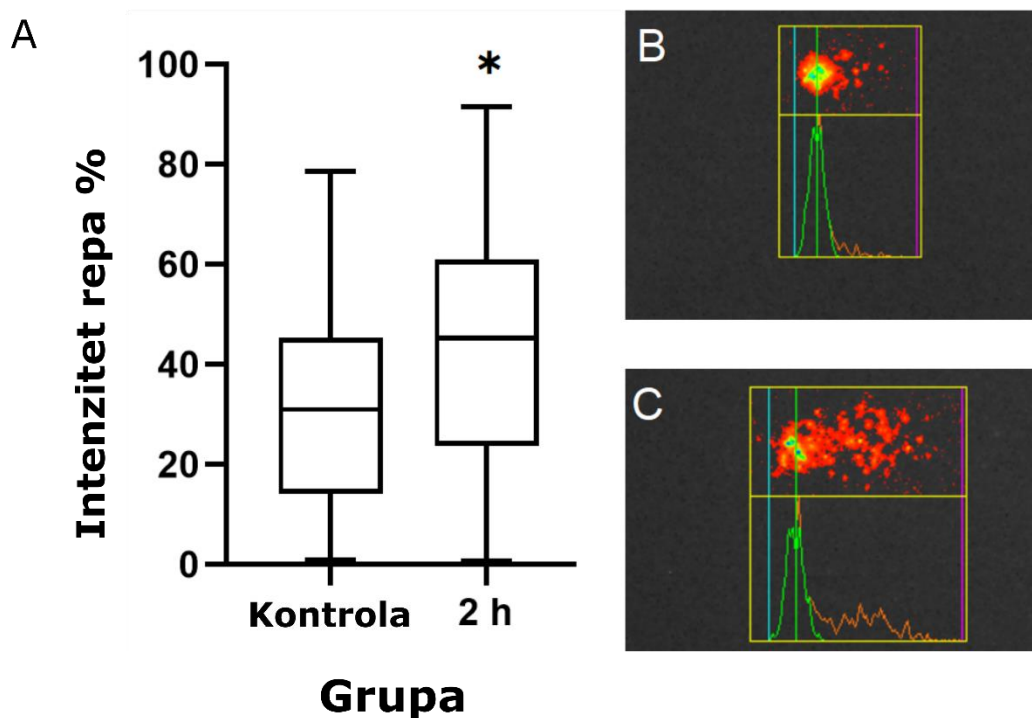
4 Rezultati

4.1 Analiza genotoksičnog potencijala poststresnih supstrata i faktora koji povezuju RUS sa odgovorom na oštećenje DNK

4.1.1 Biomolekuli oslobođeni iz ćelija tretiranih vodonik peroksidom ispoljavaju genotoksične efekte

Prethodne RUS studije su pokazale da materijal oslobođen iz mrtvih i umirućih ćelija postaje progresivno citotoksičniji s povećanjem doze stresnog agensa, kao i s produženim periodom inkubacije nakon tretmana [1]. S obzirom na to da citotoksičnost može biti posljedica genotoksičnih (DNK) oštećenja, i budući da je ranije pokazano da pojedini ćelijski faktori koji su uključeni u RUS takođe doprinose održavanju integriteta genoma [1,64], bilo je opravdano ispitati da li oslobođeni unutarćelijski molekuli mogu ispoljiti genotoksične efekte.

U tu svrhu genotoksični potencijal je analiziran pripremanjem supernatanta iz suspenzija ćelija *U. maydis* ($4 \times 10^7/\text{mL}$) tretiranih sa 0,7% peroksidom (PT-SN). Svježe inokulisane ćelije divljeg tipa UIMG10 (2×10^4 ćelija/mL) su inkubirane u pripremljenim supernatantima 2 sata na 30°C. Ćelije istog soja zasijane u 10× razblažen YEPS medijum i inkubirane pod istim uslovima služile su kao kontrola. Genotoksični efekti ispitivani su alkalnim komet testom. Kao što je prikazano na **Slici 3**, ćelije inkubirane u supernatantu dobijenom tretmanom sa 0,7% peroksida pokazale su značajno veći nivo DNK oštećenja u poređenju s kontrolnim ćelijama inkubiranim u 10× razblaženom YEPS medijumu, što jasno indicira da supstrati oslobođeni iz peroksidom tretiranih ćelija posjeduju izražen genotoksični potencijal.



Slika 3. Genotoksični efekti PT-SN supernatanta na ćelije *U. maydis* procijenjeni komet testom. Genotoksičnost je procijenjena primjenom komet testa nakon inkubacije sveže inokulisanih ćelija divljeg tipa tokom 2 h na 30 °C u supernatantima dobijenim iz ćelijskih suspenzija tretiranih sa 0,7% vodonik-peroksida (PT-SN). Ćelije inkubirane u 10× razblaženom YEPS medijumu pod identičnim uslovima korišćene su kao kontrola. Oštećenje DNK kvantifikovano je na način opisan u poglavlju Materijal i metode. **A** Statistička analiza stepena oštećenja DNK izražena kao procenat DNK u repu (engl. “tail intensity percentage”) u ćelijama uzgajanim u kontrolnom medijumu (YEPS) i PT-SN nakon 2 h inkubacije. Podaci su

prikazani kao box-plot (medijana, interkvartilni raspon i ekstremne vrijednosti); * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$; Mann–Whitney U test). **B** Reprezentativna kometa iz kontrolne grupe (YEPS), koji pokazuje nizak nivo oštećenja DNK, sa dominantnim signalom u “glavi” komete i minimalnim formiranjem repa. **C** Reprezentativna kometa iz PT-SN tretmana nakon 2 h inkubacije, sa izraženim repom i redistribucijom DNK signala, što ukazuje na značajno povećano oštećenje DNK.

Ovi rezultati su podstakli dalju analizu moguće povezanosti mehanizma koji učestvuju u RUS-u i u zaštiti genoma. Kao prvi dalji korak ispitivano je da li, i u kojoj meri, regulatorni i efektorni DNK-reparacioni faktori učestvuju u RUS procesu.

4.1.2 Karakterizacija efikasnosti rasta DNK-reparacionih mutanata pri RUS uslovima

S obzirom na to da bazna verzija komet testa detektuje i jednolančane i dvolančane prekide DNK, kao i bazno-labilna mjesta (npr. apurinska/apirimidinska mjesta) koja se pri visokim pH uslovima konvertuju u prekide DNK lanaca [72,73] i imajući u vidu da se ovakvi tipovi oštećenja DNK predominantno popravljaju homolognom rekombinacijom (HR), najprije je bilo neophodno da se utvrdi da li faktori koji konstituišu ovaj reparacioni sistem doprinose efikasnom RUS-u.

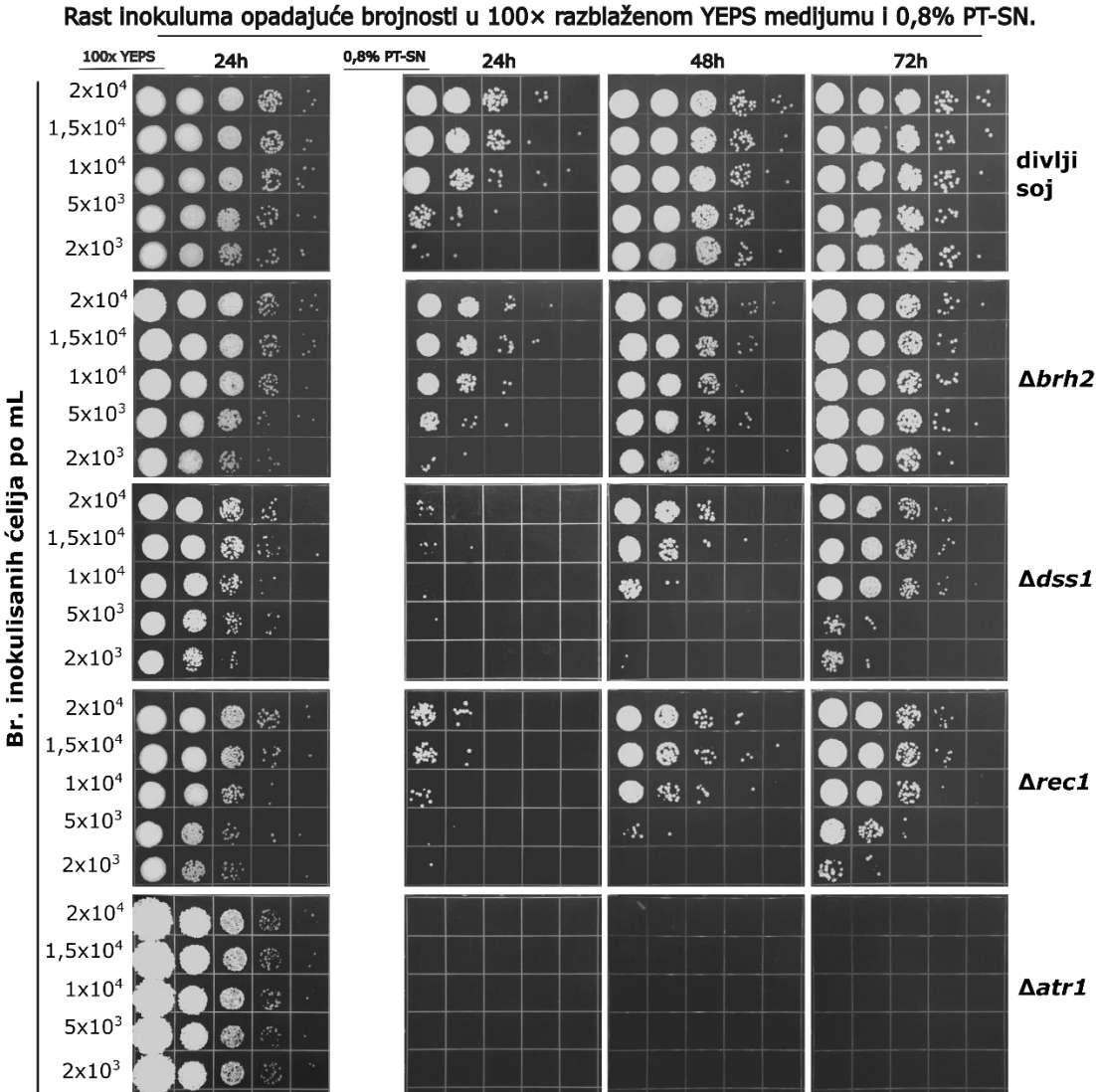
Kao što je naglašeno u Uvodu, za razliku od *Saccharomyces cerevisiae*, *U. maydis* posjeduje ortolog humanog BRCA2 proteina, Brh2 [7], te je njegova HR mašinerija organizovana oko Brh2–DSS1–Rad51 ose [74]. DSS1 predstavlja esencijalni kofaktor Brh2 [8], interaguje sa Brh2, stabilizuje njegov molekul, aktivira njegovu dormantnu formu i omogućava formiranje Rad51 filameta [75]. Važno je uz ovo naglasiti da DSS1 ima plejotropne funkcije osim njegove uloge u HR. Kao mali, prirodno neuređeni protein, DSS1 je ključan za normalno funkcionisanje proteazoma, kao i za eksport iRNK iz jedra [76,77]. Pored analize navedenih faktora ispitan je i doprinos Mre11, komponente Mre11–Rad50–Nbs1 (MRN) kompleksa, koji je neophodan za inicijalne korake prepoznavanja dvolančanih prekida DNK, obradu DNK krajeva i regrutaciju nizvodnih HR faktora, kao i uloga Rad52, kompenzatornog medijatora HR [78]. Proteini Ku70 i Ku80 čine centralne komponente mehanizma nehomolognog spajanja krajeva, (engl. “non-homologous end joining”-NHEJ) puta popravke, ali delecija gena koji ih kodiraju nije bila izvodljiva, s obzirom na to da su esencijalni u *U. maydis* zbog uloge u zaštiti telomera [79], čime je onemogućena procjena njihovog doprinosa u procesu RUS-a. Ipak, analiza je obuhvatila mutante kojima nedostaje Apn1 protein, tj. ključna apurinsko/apirimidinska endonukleaza uključena u popravku putem ekscizije baza (engl. “Base Excision Repair”- BER), ili Ercc1, centralna komponenta puta nukleotidne ekscizije popravke DNK (engl. “Nucleotide Excision Repair”-NER).

S obzirom na to da su prethodni rezultati pokazali da mutanti kojima nedostaje Chk1, protein kinaza ključna za zaustavljanje ćelijskog ciklusa kao odgovor na prisustvo DNK lezija, pokazuju izražen defekt u RUS-u [64], analiza je proširena i na druge ključne regulatorne molekule odgovorne za koordinaciju popravke DNK i progresije ćelijskog ciklusa. U tom cilju, ispitana je uloga Atr1, apikalne kinaze koja aktivira Chk1, kao i Rec1, nizvodne komponente kontrolnog puta u regulaciji ćelijskog ciklusa. Uloga Atm1 nije mogla biti ispitana jer je *Atm1* gen u *U. maydis* esencijalan [80].

Za izvođenje ove analize, delecioni mutanti svih navedenih gena su ispitani u pogledu dinamike njihovog rasta koristeći supernatante dobijene iz ćelijskih suspenzija (4×10^7 ćelija/mL) tretiranih sa 0,8% vodonik-peroksida (0,8% PT-SN). Budući da je većina mutanata konstruisana u UCM350 (*pan1-1*) soju, i s obzirom na to da tretman peroksidom negativno utiče na resurse koenzima A (CoA), ova varijabla je kontrolisana dodatkom pantotenata (10 μ M) u supernatante. Takođe, imajući u vidu da se stope rasta ovih mutanata međusobno razlikuju, što je uočljivo na osnovu prečnika njihovih kolonija, bilo je neophodno paralelno pratiti rast ispitivanih mutanata u stresnim i nestresnim (bogati medijum) uslovima. Radi adekvatnog poređenja, YEPS i 0,8% PT-SN su normalizovani na ekvivalentne nutritivne kapacitete, pri čemu su preliminarni eksperimenti pokazali da je potrebno 100 puta razblažiti YEPS medijum da bi se postigla ova normalizacija. Obzirom da su navedeni mutant generisani u soju UCM350 isti je korišćen kao kontrola. Sve

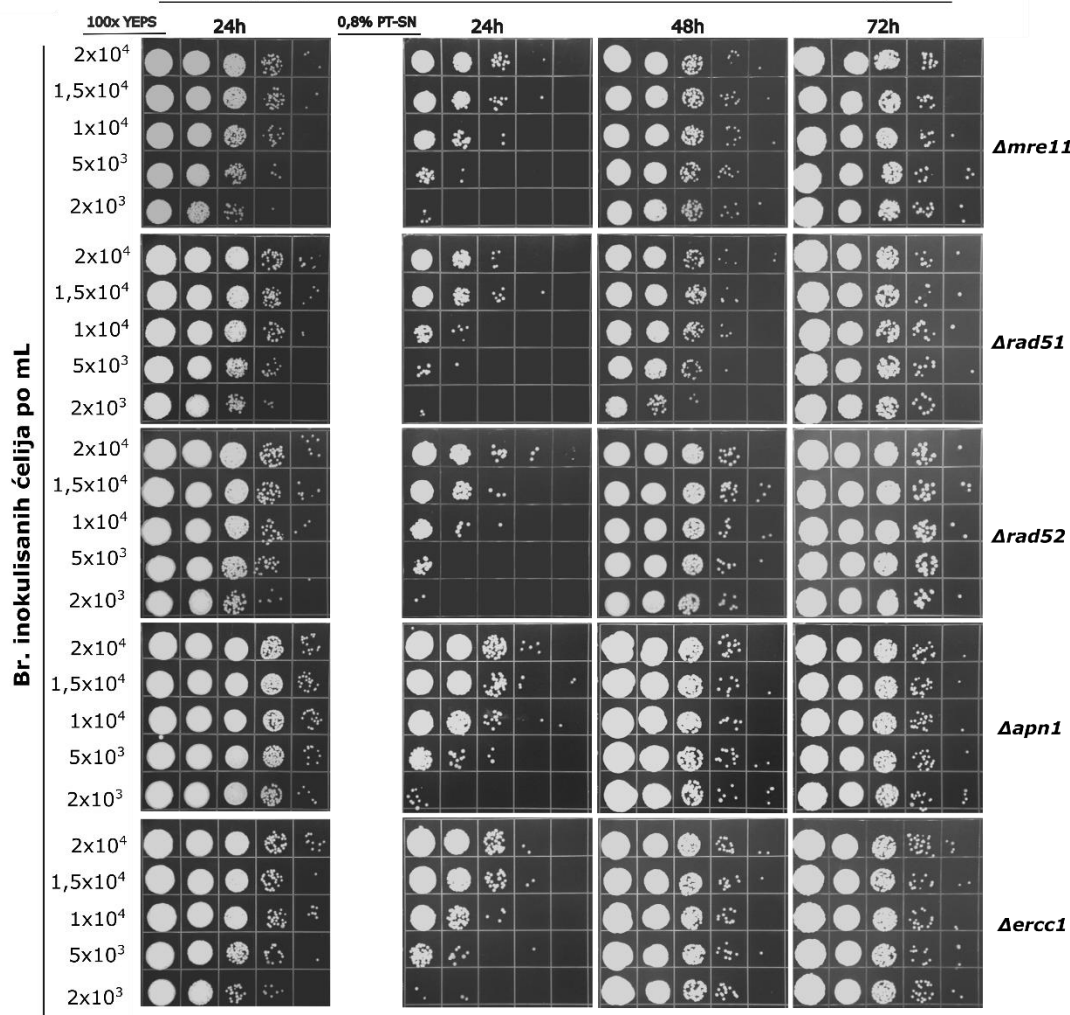
kulture su zasejane u 100× razblaženi YEPS i 0,8% PT-SN pri opadajućim gustinama inokuluma (od 2×10^4 do 2×10^3 ćelija/mL), inkubirane na 30 °C, i rast je praćen u intervalima od 24 h - tokom 1 dana u 100× YEPS-u i tokom 3 dana u 0,8% SN. Rezultati su prikazani na **Slici 4A** i **Slici 4B**.

A



B

Rast inokuluma opadajuće brojnosti u 100× razblaženom YEPS medijumu i 0,8% PT-SN.



Slika 4. Rast delecionih mutanata za gene uključene u procese popravke DNK i očuvanja genomske stabilnosti analiziran je pri opadajućim gustinama inokuluma (2×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 1×10^4 , 5×10^3 i 2×10^3 ćelija/mL – redom odozgo na dole) u supernatantima dobijenim iz ćelijskih suspenzija tretiranih sa 0,8% H₂O₂ (0,8% PT-SN). Rast je praćen zasejavanjem 10X serijskih razblaženja (s lijeva na desno) na čvrstu hranljivu podlogu nakon 24, 48 i 72 h inkubacije na 30 °C. Kao kontrola inherentne sposobnosti rasta, isti sojevi su gajeni 24 h u 100× razblaženom YEPS medijumu pod identičnim uslovima. **A** WT i delecioni mutanti koji pokazuju izraženu senzitivnost u 0,8% PT-SN uslovima u odnosu na divlji tip (WT), manifestovanu smanjenim rastom i/ili gubitkom sposobnosti oporavka pri nižim i srednjim gustinama inokuluma. **B** Delecioni mutanti koji pokazuju blažu ili umjerenu senzitivnost u odnosu na divlji soj, sa djelimično očuvanom sposobnošću rasta i oporavka, naročito pri višim gustinama inokuluma.

Kao što je bilo očekivano, izlaganje 0,8% PT-SN dovelo je do jasnog inhibitornog efekta na rast čak i kod divljeg soja. U poređenju sa divljim tipom, svi testirani HR-mutanti, osim *Δdss1*, su pokazali sličan, blag ali uočljiv pad proliferacije pri primjenjenim RUS uslovima. Još blaži RUS fenotip, ako ga je uopšte i bilo, uočen je kod *Δapn1* i *Δerccl* mutanata, **Slika 4B**.

Nasuprot tome, delecija *Dss1* je imala izražen efekat na rast ćelija, pri čemu je *Δdss1* soj kontinuirano zaostajao za divljim tipom u čitavom rasponu gustina njihovih inokuluma. Sličan obrazac inhibiranog rasta uočen je i kod *Δrec1* mutanta. Iako su oba mutanta vremenom pokazivala postepeno povećanje proliferacije, njihov rast je ostao značajno usporen čak i nakon 48 h, a pri najnižim gustinama inokuluma zaostajanje za divljim sojem je bilo izraženo i nakon 72 h kontinuirane inkubacije.

Posebno je značajno istaći da je među mutantima najizraženiji RUS fenotip pokazao *Δatr1* mutant, u čijem slučaju čak ni inokulum najviše testirane gustine (2×10^4 ćelija/mL) nije bio dovoljan da omogući adaptaciju i rast u 0,8% PT-SN. Prema tome, dobijeni rezultati pokazuju da *Dss1*, *Rec1* i *Atr1* predstavljaju ključne determinante RUS aktivnosti. Nasuprot tome, drugi HR faktori imaju znatno skromniji doprinos. Ova razlika sugerise da regulatorni faktori i komponente kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa mogu imati disproporcionalno važnu ulogu u konstituisanju RUS kapaciteta, barem u ispitivanim uslovima.

Naredni cilj bio je identifikovanje dodatnih gena koji mogu doprinositi RUS-u i održavanju genomske stabilnosti. U tom cilju, prvo su korišćeni podaci dobijeni iz prethodne transkriptomске analize [64].

4.1.3 Identifikacija gena uključenih u RUS i zaštitu genoma korišćenjem podataka transkriptomске analize

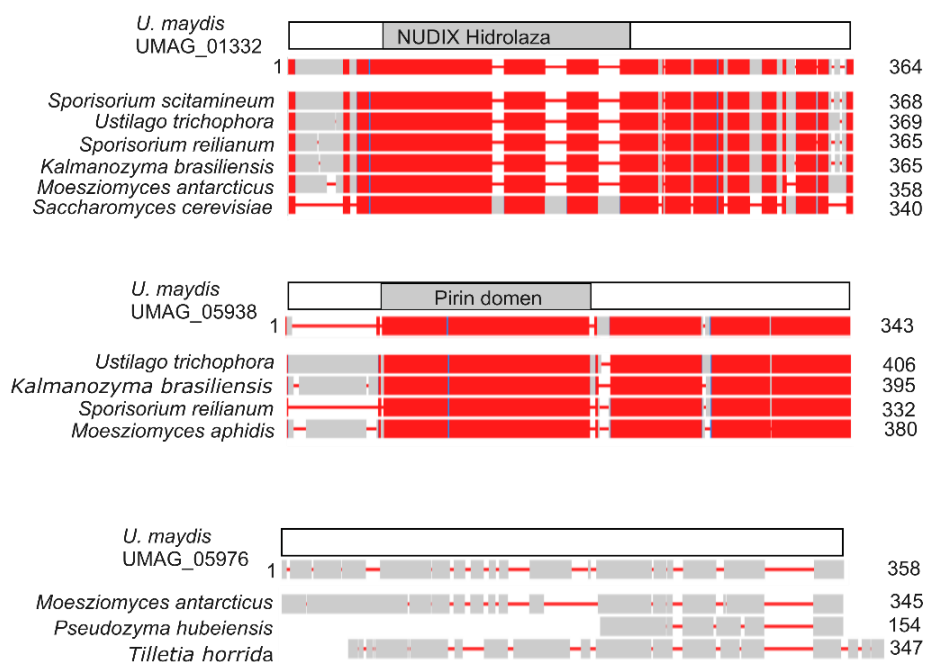
Transkripcijski profili ćelija *U. maydis* inkubiranih u supernatantima dobijenim tretmanom sa 0,4% i 0,7% vodonik-peroksida upoređeni su sa profilom ćelija gajenih u bogatom mediju. Analizom je utvrđeno da su ćelije u 0,4%-SN eksprimirale 85 gena koji nisu detektovani u kontroli, dok je u 0,7%-SN identifikovano 200 jedinstveno eksprimiranih gena [64]. Od toga je 121 gen bio jedinstveno eksprimiran u 0,7%-SN, uključujući 86 gena koji kodiraju hipotetičke proteine nepoznate funkcije.

Za dalju analizu odabran je skup od šest gena indukovanih u 0,7%-SN. Pet odabranih gena pripadalo je grupi hipotetičkih ili slabo okarakterisanih gena evoluciono očuvanih među gljivama, dok je jedan gen, pored toga što je bio neokarakterisan takođe odgovarao ORF-u bez značajne homologije sa sekvencama drugih vrsta prema BLASTP analizi. Među konzerviranim kandidatima prvo je odabran UMAG_01332, homolog Nudix (*PCDI*) genu koji je prisutan u *S. cerevisiae*, **Slika 5A**. Budući da Nudix hidrolaze učestvuju u uklanjanju oksidovanih nukleotida, ovaj gen je predstavljao prikladanog kandidata sa potencijalnom ulogom u zaštiti genoma pri RUS uslovima. Drugi kandidat, UMAG_05938, izabran je na osnovu *in silico* analize koja je pokazala da ovaj gen kodira Pirinu-sličan protein, nepoznate funkcije u *U. maydis*, **Slika 5A**. Iako funkcije Pirinu-sličnih proteina još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene, sve je više dokaza da učestvuju u ćelijskim odgovorima na stres. S obzirom na to da je ranije pokazano da vezikularni transport povezuje RUS sa zaštitom genoma, u analizu je uključen i UMAG_01716, čiji pretpostavljeni produkt pokazuje homologiju sa komponentama COPII vezikula. Konačno, u okviru ove grupe su odabrana i dva gena sa domenima nepoznate funkcije (DUF): UMAG_06503 i UMAG_02336.

Iz druge grupe odabran je, kao kandidat za inicijalnu analizu, samo UMAG_05976. Ovaj gen pokazuje slabu BLASTP homologiju sa ORF-om iz srodne gljive *Moesziomyces antarcticus*, **Slika 5A**. Zanimljivo, UMAG_05976 kodira znatno duži protein (358 ak) u poređenju sa većinom kandidata iz ove grupe (~150 ak), što je dodatno ukazivalo na mogućnost da je zaista riječ o funkcionalnom proteinu.

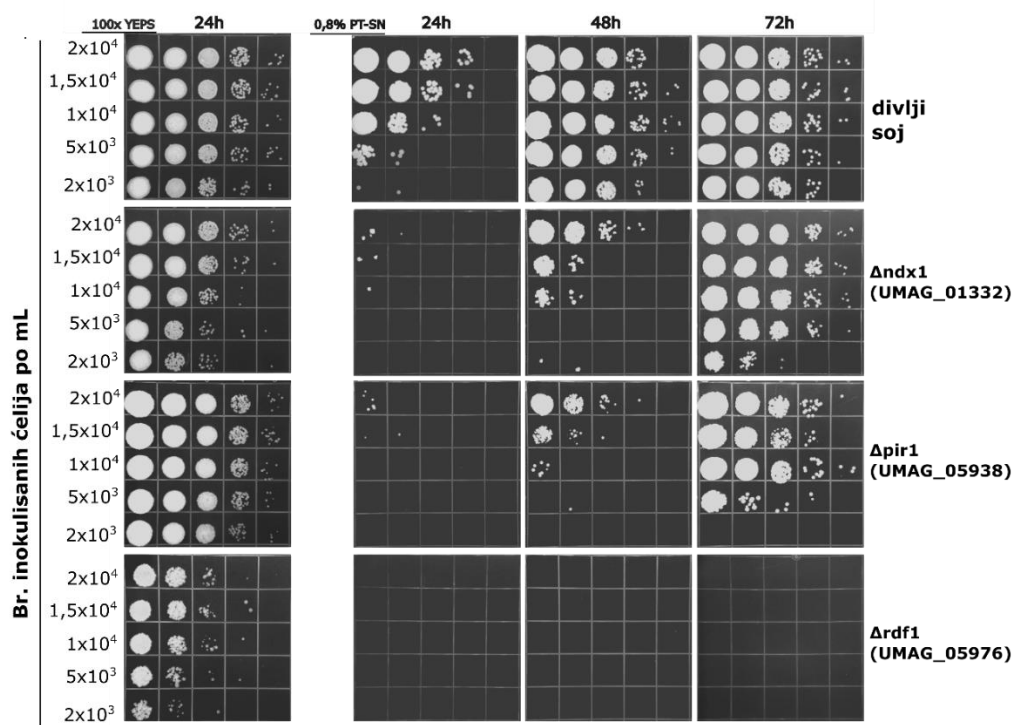
Geni su deletirani, a mutanti analizirani u pogledu njihove uloge u RUS-u (rast u 0,8% PT-SN) i zaštiti genoma, procjenom preživljavanja nakon izlaganja UV zračenju i genotoksičnim agensima MMS, DEB i HU.

A

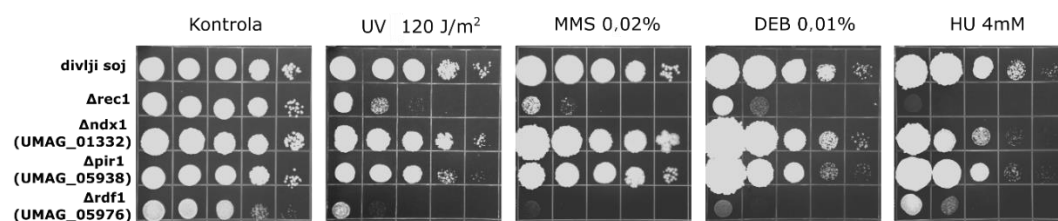


B

Rast inokuluma opadajuće brojnosti u 100x razblaženom YEPS medijumu i 0,8% PT-SN.



C



Slika 5. A *In silico* analiza homologije gena/proteina odabranih na osnovu prethodne transkriptomске analize (UMAG_05976, UMAG_05938 i UMAG_01332). Prikazane su šematske prezentacije proteinskih produkata koje ilustruju položaje filogenetski konzerviranih domena. Crvenom bojom prikazani su regioni visoke sekvencijske sličnosti između analiziranih proteina, dok sivi segmenti predstavljaju varijabilne ili neporavnate regione. Pristupni brojevi proteina redoslijedom prikazanim na panelima: Za UMAG_01332: *Sporisorium scitamineum* CDR88046.1, *Ustilago trichophora* SPO22349.1, *Sporisorium reilianum* SJX61417.1, *Kalmanozyma brasiliensis* XP_016291083.1, *Moesziomyces antarcticus* GAC74599.1, *Saccharomyces cerevisiae* AJV67253.1 (Pcd1). Za UMAG_05938: *Ustilago trichophora* SPO26901.1, *Kalmanozyma brasiliensis* XP_016289840.2, *Sporisorium reilianum* CBQ72836.1, *Moesziomyces aphidis* ETS59476.1. Za UMAG_05796: *Moesziomyces antarcticus* XP_014656645.1, *Pseudozyma hubeiensis* XP_012186284.1, *Tilletia horrida* KAK0535356.1. **B** Delecioni mutanti gena odabranih na osnovu prethodne transkriptomске analize inokulisani su u opadajućim gustinama ćelija (2×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 1×10^4 , 5×10^3 i 2×10^3 ćelija/mL) u 0,8% PT-SN i inkubirani na 30 °C. Rast je praćen zasejavanjem 10X serijskih razblaženja na čvrstu hranljivu podlogu nakon 24, 48 i 72 h inkubacije na 30 °C. Paralelne kulture gajene 24 h u 100× razblaženom YEPS medijumu služile su kao kontrola bazalne sposobnosti rasta. **C** Odgovor delecioni mutanata gena odabranih na osnovu prethodne transkriptomске analize na genotoksične agense. Desetostruka serijska razblaženja suspenzija od 2×10^7 mutantnih ćelija zasejana su na čvrstu hranljivu podlogu, a zatim izložena naznačenom dozom UV zračenja ili zasejana na podloge koje su sadržavale MMS, DEB ili HU. Mutant *Arecl*, koji je osjetljiv na sve primijenjene agense, korišćen je kao negativna kontrola. Eksperiment je izveden tri puta, a prikazani su reprezentativni rezultati.

Delecija UMAG_01332 i UMAG_05938 je značajno smanjila sposobnost rasta u 0,8% PT-SN, **Slika 5B**. Jasan rast je uočljiv tek nakon 48 h inkubacije najvećih inokuluma (2×10^4 do 1×10^4) kod *Andx1* mutanta (UMAG_01332) se nakon 72 h evidentira oporavak i kod najnižeg inokuluma, dok *Pir1* mutant (UMAG_05938) pokazuje izraženiju senzitivnost na 72 h, sporiji rast nižih inokuluma i potpuno odsustvo rasta najnižeg inokuluma. Mutant UMAG_01332 je pokazao izraženu osjetljivost na HU, dok je UMAG_05938 bio umjereno osjetljiv na UV, **Slika 5C**. Delecije UMAG_01716, UMAG_06503 i UMAG_02336 nisu pokazale mjerljive efekte na rast u 0,8% PT-SN supernatantu, tako da rezultati za ove kandidate nisu prikazani.

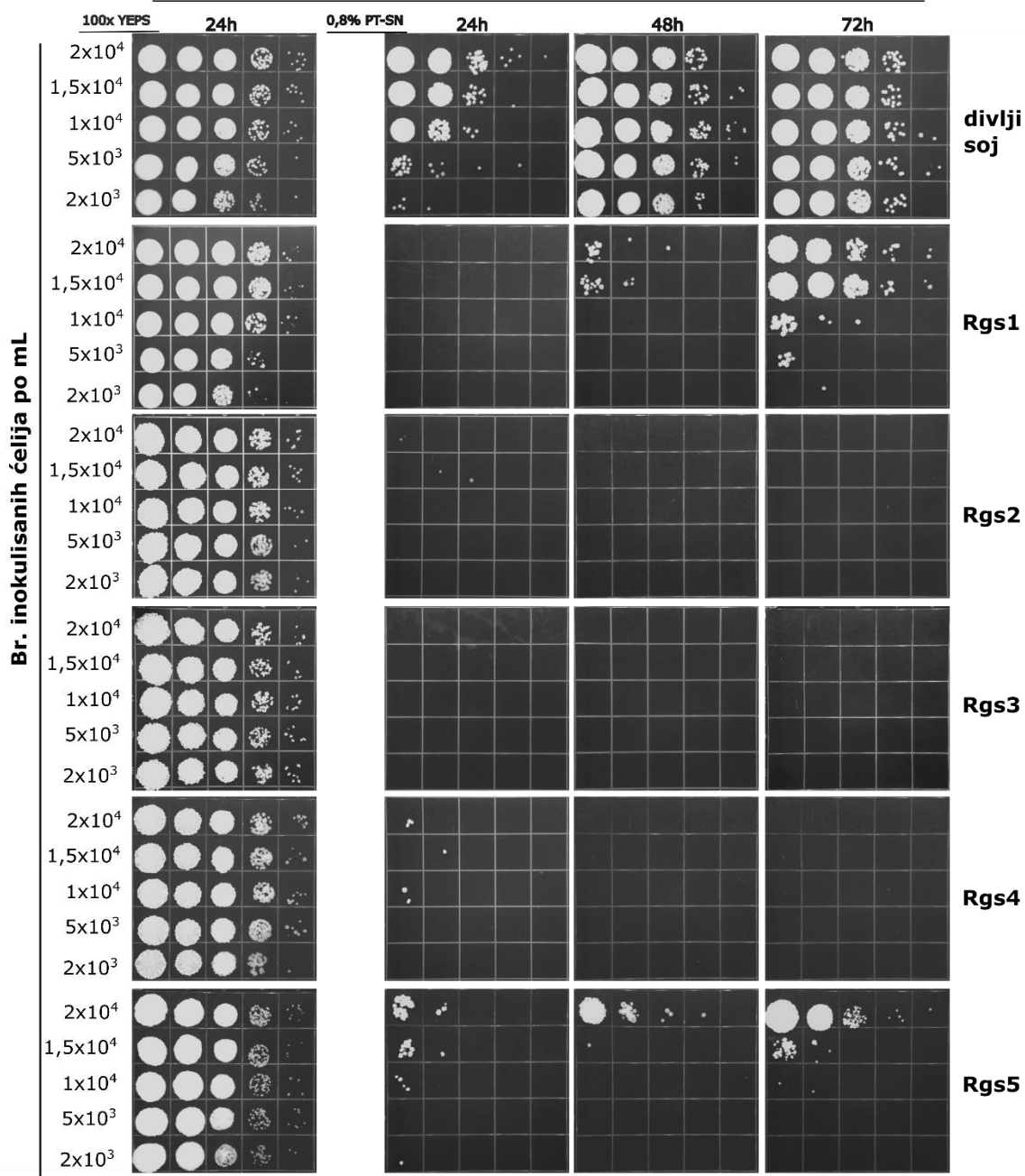
Eliminacija UMAG_05976 dovela je do drastičnog RUS defektnog fenotipa uporedivog sa fenotipom *Atat1* mutanta, uz jasno izražene defekte u reparaciji DNK, slične onima koji se uočavaju kod *Arecl* mutanta (osim u slučaju HU). Ovi rezultati pokazuju ključnu ulogu UMAG_05976 gena u efikasnoj operativnosti RUS-a i zaštiti genoma. Predložen je naziv *Rdf1* (RUS deployed factor 1) za UMAG_05976, dok za UMAG_01332 i UMAG_05938 su predloženi nazivi *Ndx1* i *Pir1*.

4.1.4 Izolovanje MMS-senzitivnih mutanata defektnih u RUS-u

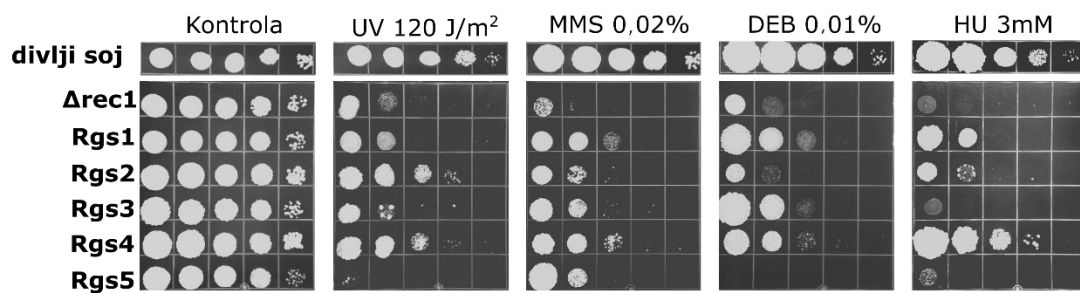
Nakon mutageneze, pojedinačni kandidati su najprije testirani za osjetljivost na MMS, a zatim su MMS-osjetljivi kandidati analizirani za RUS fenotip korišćenjem 0,8% PT-SN. Ovim pristupom testirano je približno 3000 kandidata, pri čemu je identifikovano 37 MMS-senzitivnih mutanata. Kada su ovi mutanti ispitani za RUS defektni fenotip, samo pet njih je pokazalo značajno narušenu sposobnost rasta u 0,8% PT-SN. Ovi sojevi su označeni kao Rgs (RUS/genotoksin senzitivni) od 1 do 5. Rgs2, Rgs3 i Rgs4 pokazuju potpuno odsustvo oporavka pri svim testiranim gustinama inokuluma, čak i nakon 72 h, dok su se Rgs1 i Rgs5 uspješno oporavili tek nakon 72 h i to isključivo pri najvećim gustinama inokuluma (2×10^4 , $1,5 \times 10^4$), **Slika 6A**.

A

Rast inokuluma opadajuće brojnosti u 100× razblaženom YEPS medijumu i 0,8% PT-SN.



B



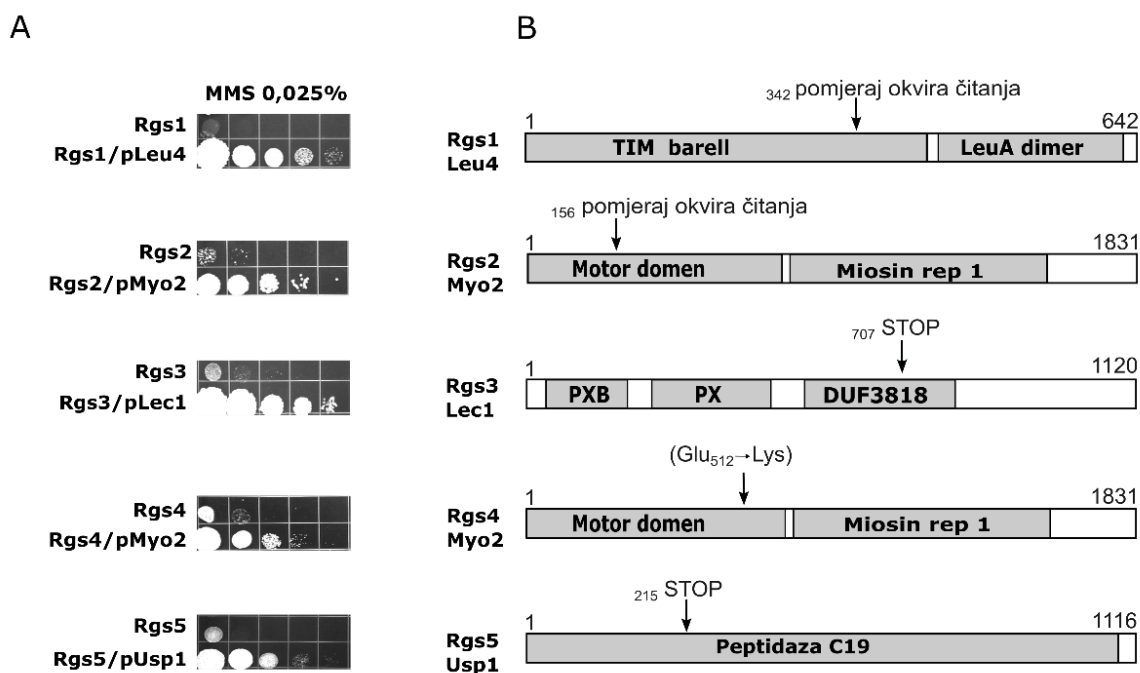
Slika 6. A Rgs mutanti inokulisani su pri opadajućim gustinama ćelija (2×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 1×10^4 , 5×10^3 i 2×10^3 ćelija/mL) u supernatantima dobijenim iz ćelijskih suspenzija tretiranih sa 0,8% H₂O₂ (0,8% PT-SN). Rast je praćen zasejavanjem 10X serijskih razblaženja na čvrstu hranljivu podlogu nakon 24, 48 i 72 h inkubacije na 30 °C. Kontrolni rast procijenjivan je nakon 24 h u 100 × razblaženom YEPS medijumu. **B** Odgovor Rgs mutanata na genotoksične agense. Desetostruka serijska razblaženja suspenzija od 2×10^7 mutantnih ćelija zasejana su na čvrstu podlogu i zatim izložena naznačenom dozom UV zračenja ili zasejana na podloge koje su sadržavale MMS, DEB ili HU. Mutant *ΔrecI* korišćen je kao negativna kontrola, osjetljiva na sve primijenjene agense. Testiranje je izvedeno dva puta, a prikazani su reprezentativni rezultati.

Dalja fenotipska karakterizacija Rgs mutanata obuhvatila je analizu njihovog odgovora na dodatne genotoksične agense: UV zračenje, MMS, DEB i HU. Divlji tip (WT), soj UIMG10, služio je kao pozitivna kontrola, dok je mutant *ΔrecI* korišten kao negativna kontrola. Kao što je prikazano na **Slici 6B**, svih pet Rgs sojeva je pokazalo različite stepene osjetljivosti ne samo na MMS, već i na UV zračenje, DEB i HU. Rgs1 je ispoljio umjerenu osjetljivost na sve genotoksične agense primijenjene u ovom testu. Iako blago osjetljiv na UV zračenje, Rgs2 je pokazao izraženu osjetljivost na hemijske agense. Rgs3 je veoma osjetljiv na UV zračenje, MMS i DEB, a uz to je pokazao i izuzetnu osjetljivost na HU. Slično Rgs1, Rgs4 je ispoljio središnju osjetljivost na MMS i DEB, ali relativno umereniju osjetljivost na UV i HU. Najsenzitivniji fenotip zabilježen je kod Rgs5, koji je pokazao izraženu osjetljivost na MMS i ekstremnu osjetljivost na UV zračenje, DEB i HU. Sudeći po dijametri njegovih kolonija, Rgs5 ispoljava i fenotip usporenog rasta.

4.1.5 Identifikacija mutiranih gena

Zahvaljujući izraženoj osjetljivosti Rgs sojeva na MMS, uspješno su klonirani mutirani geni u svih pet mutanata. Pored uspostavljanja rezistencije na MMS, svi komplementacioni klonovi takođe su pokazali rekonstituisanu sposobnost rasta u RUS supstratima uporedivu sa onom kod divljeg soja, **Slika 7A**. Primjenom metoda izolacije plazmida, analize DNK sekvenci, subkloniranja DNK i komplementacionih testova, u svim slučajevima komplementaciona aktivnost je lokalizovana na jedan otvoreni okvir čitanja (ORF). Identifikovani ORF-ovi dodijeljeni po sljedećem redoslijedu: Rgs1 – UMAG_04156; Rgs2 – UMAG_03286; Rgs3 – UMAG_01196; Rgs4 – UMAG_03286; i Rgs5 – UMAG_02639. Dakle, pokazalo se da su mutanti Rgs2 i Rgs4 mutirani u istom ORF-u.

Kako bi se potvrdilo da klonirani geni predstavljaju alele divljeg tipa koji korespondiraju mutantnim alelima Rgs sojeva, tj. da zaista čine komplementacione a ne supresorske sekvence, odgovarajući fragmenti genomske DNK su umnoženi PCR reakcijom koristeći ukupnu DNK izolovanu iz mutantnih sojeva. Sekvenciranjem dobijenih PCR produkata je potvrđeno da u svim navedenim slučajevima postoji inaktivirajuća mutacija, **Slika 7B**.



Slika 7. Identifikacija Rgs mutanata i determinisanje mutacija odgovornih za fenotip. **A** Čelije naznačenih Rgs mutanatih sojeva, transformisane plazmidom koji nosi komplementacioni fragment sa odgovarajućim genom, testirane su uz pomoć eseja tačkastog zasejavanja (engl. „spot assay“) na YEPSA podlogu suplementiranu sa 0,022% MMS, u cilju procene komplementacije fenotipa osetljivosti na genotoksični agens. Svi eksperimenti su izvedeni najmanje tri puta i predstavljeni su reprezentativni rezultati. **B** Šematski prikaz organizacije domena odgovarajućih proteina. Pretpostavljeni funkcionalni domeni označeni su sivom bojom. Strelice označavaju položaje i tipove identifikovanih mutacija, uključujući pomjeranje okvira čitanja (engl. “frameshift”), prevremene stop kodone ili zamene aminokiselina. Dužina proteina (u aminokiselinama) prikazana je sa desne strane.

Rgs1 nosi mutaciju u genu UMAG_04156, smještenom na hromozomu 12, koji kodira hipotetički protein dužine 642 aminokiseline i pokazuje sličnost sa 2-izopropilmalat sintazom - enzimom koji katalizuje prvi korak u biosintezi leucina. Budući da je to ključni enzim ovog biosintetskog puta, njegova funkcija je evoluciono očuvana među bakterijama, gljivama i biljkama. Inaktivirajuća mutacija je identifikovana kao delecija jednog T nukleotida na poziciji 1024, što dovodi do pomjeranja okvira čitanja na kodonu 342 i formiranja preuranjenog stop kodona. Budući da UMAG_04156 pokazuje najveću sličnost sa genom *Leu4* iz *S. cerevisiae*, te je UMAG_04156 označen kao *Leu4*.

Kako je prethodno navedeno, i Rgs2 i Rgs4 su mutirani u UMAG_03286. Ovaj gen je pozicioniran na hromozomu 8, i kodira hipotetički protein dužine 1831 aminokiselinu sa jasnom homologijom sa miozinom V (Myo2). U *S. cerevisiae*, Myo2 posreduje aktin-zavisni transport vezikula i organela neophodan za polarizovani rast [81,82]. Mutantni alel u Rgs2 rezultat je delecije jednog A nukleotida na poziciji 468, što uzrokuje pomjeranje okvira čitanja na kodonu 156. Alel Rgs4 razlikuje se od divljeg tipa tranzicijom purinskih nukleotida G u A na poziciji 1534, čime se kodon za glutaminsku kiselinu (512) zamjenjuje kodonom za lizin. Iako su obje mutacije lokalizovane unutar motornog domena, **Slika 7B**, i obje dovode do sličnog defekta u RUS-u, kao i do ujednačene osjetljivosti na UV, evidentno je da mutantni alel u Rgs2 uzrokuje značajno veću senzitivnost na MMS, DEB i HU, **Slika 7B**. UMAG_03286 je označen kao *Myo2*.

Rgs3 nosi mutaciju koja dovodi do formiranja Stop kodona i slijedstveno tome do skraćene verzije (706/1120 aa) hipotetičkog proteina homolognog kvašćevom proteinu Lec1, nedavno okarakterisanom proteinu sa PX domenom uključenim u održavanje lipidne homeostaze i u organizaciji membrana [83]. Na osnovu toga predložen je naziv *Lec1* za UMAG_01196.

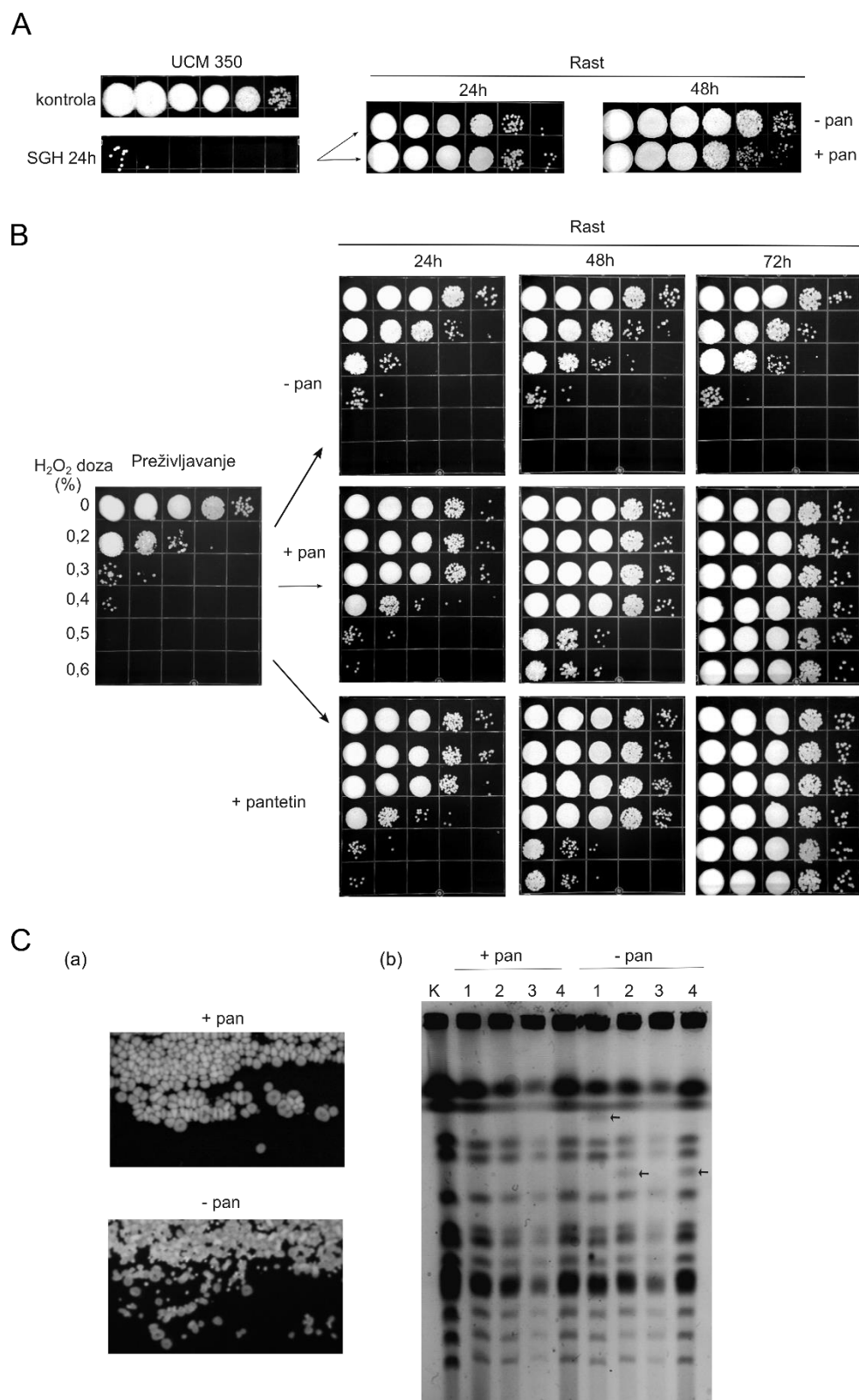
Zanimljivo, iako je Lec1 protein konzerviran među gljivama, BLASTP analiza ne pokazuje jasne homologe kod biljaka ili životinja.

Najzad, fenotip Rgs5 posljedica je mutacije koja dovodi do nastanka stop kodona koji prekida ORF na poziciji koja odgovara 215 kodonu, u genu koji kodira hipotetičku ubikvitin-specifičnu proteazu (USP) dužine 1116 aminokiselina. USP proteaze predstavljaju najveću porodicu deubikvitinacionih enzima, koji regulišu stabilnost proteina, signalizaciju i degradaciju uklanjanjem ubikvitinskih lanaca sa ciljnih proteina. Oni imaju ključnu ulogu u procesima kao što su reparacija DNK i progresija ćelijskog ciklusa [84]. Pored osjetljivosti na sve testirane genotoksične agense, Rgs5 pokazuje i izražen spororastući fenotip, **Slika 6B**. Budući da do sada nije objavljen rad koji opisuje USP u *U. maydis*, predložen je naziv *Usp1* za UMAG_02639.

4.2 Ispitivanje biološkog značaja programirane ćelijske smrti za opravak populacije nakon stresa

4.2.1 SGH i tretman vodonik-peroksidom ispoljavaju različit uticaj na resurse koenzima A.

Nakon masivnog pada brojnosti vijabilnih ćelija (>5 log jedinica), izazvanog SGH tretmanom, preživjele ćelije auktotrofnog soja UCM350 (*pan1-1*, *nar1-6*) su mogle, ako im se obnovi dostupnost atmosferskog kiseonika, da efikasno povrate brojnost populacije gotovo do njene početne gustine za manje od 48 h, **Slika 8A**. To bi značilo da pri ovom tipu (suicidne) smrti umiruće ćelije obezbjeđuju dovoljnu količinu nutrijenata (uključujući neophodni pantotenat i redukovani azot) tako da preživjele ćelije mogu da rastu, višestruko se multiplikuju, i uspješno obnove populaciju.



Slika 8. Zavisnost post-stresnog oporavka (RUS) populacije ćelija *Ustilago maydis* od prisustva pantotenata. **A** Oporavak populacije nakon 48 h inkubacije u uslovima samogenerisane hipoksije (SGH) u prisustvu ili odsustvu natrijum-pantotenata ($\pm$ pan). **B** Oporavak ćelijske populacije nakon 72 h nakon tretmana vodonik-peroksidom primjenom rastućih koncentracija H₂O₂ u prisustvu Fe³⁺ jona (Fentonova reakcija), bez ili uz dodatak pantotenata (pan) ili pantetina. Za analizu su pripremljena desetostruka serijska

razblaženja ćelijskih suspenzija koja su zasejana (tačkasti esej) na YEPS agar podlogu i inkubirana na 30 °C tokom 3 dana. **Ca**) Morfologija kolonija nastalih iz ćelijskih suspenzija koje su se oporavljale sa ili bez dodatka pantotenata nakon tretmana sa 0,3% vodonik-peroksidom. **b**) PFEG analiza hromozomske DNK iz četiri nasumično odabrane kolonije dobijene iz ćelijskih suspenzija koje su se oporavljale sa ili bez dodatka pantotenata. Strelice označavaju prisustvo dodatnih DNK traka koje nisu uočene kod netretiranih ćelija. Prikazane slike predstavljaju reprezentativne rezultate najmanje dva nezavisna eksperimenta.

Nasuprot tome, tretman peroksidom bio je praćen progresivnim gubitkom sposobnosti oporavka: dok su koncentracije od 0,2–0,3% H₂O₂ omogućavale ograničen ponovni rast, više koncentracije (≥0,4%) dovele su do potpunog izostanka oporavka, **Slika 8B**. Kako je u prethodnim radovima pokazano da soj UCM520 (*nar1-1 met1-2*) može da obnovi populaciju nakon tretmana peroksidom [1], što ukazuje da gen *Nar1* nema značajnu ulogu u ovom procesu, ispitano je da li je odsustvo oporavka kod UCM350 posljedica mutacije u genu *Pan1*.

Ovaj gubitak sposobnosti da se obnovi stresom devastirana populacija mogao je biti prevaziđen/kompenzovan dodavanjem pantotenata (pan) (metabolički aktivne komponente koenzima A), u finalnoj koncentraciji od 10 μM, **Slika 8B**. Suplementacija pantotenatom je omogućila gotovo potpunu obnovu gustine ćelija, čak i nakon ogromnog pada vijabilnosti od 5 redova veličine, izazvanog tretmanom sa 0,5% i 0,6% H₂O₂. Štaviše, dok su ćelije tretirane sa 0,3% H₂O₂ (ostavljene da se oporave i razmnožavaju bez dodatog pantotenata) formirale kolonije veoma varijabilne veličine i izmijenjene morfologije, u pan-suplementiranim suspenzijama sve tretirane kulture su se obnovile dajući kolonije prilično ujednačenog izgleda, što je ukazivalo na preciznu popravku i efikasan oporavak, **Slika 8Ca**.

Dakle, navedeni rezultati su jasno pokazali da je RUS fenotip, uočen kod soja UCM350, determinisan alelom *pan1-1*, tj. mutacijom u genu koji kodira pantoat-beta-alanin ligazu, enzim uključen u biosintezu pantotenata (i posredno koenzima A) [1,65]. Stoga je bilo sasvim razumljivo da je fenotip mogao biti suprimiran i dodavanjem pantetina, metaboličkog intermedijera koji se nalazi nizvodno u putu biosinteze CoA [34].

U svjetlu ovih nalaza, odmah su se nametnula dva pitanja:

Da li oporavak u uslovima ograničene količine pantotenata kod soja UCM350 dovodi do genomske nestabilnosti - pitanje koje je proizašlo iz gornjeg zapažanja da oporavak u nesuplementiranom medijumu dovodi do rasta kolonija sa krupnim fenotipskim izmjenama; i

Da li se izražene razlike između efekata SGH i tretmana peroksidom ispoljavaju isključivo u slučaju peroksida, imajući u vidu da je H₂O₂ generalno veoma reaktivan agens sposoban da ošteti širok spektar ćelijskih komponenti [85].

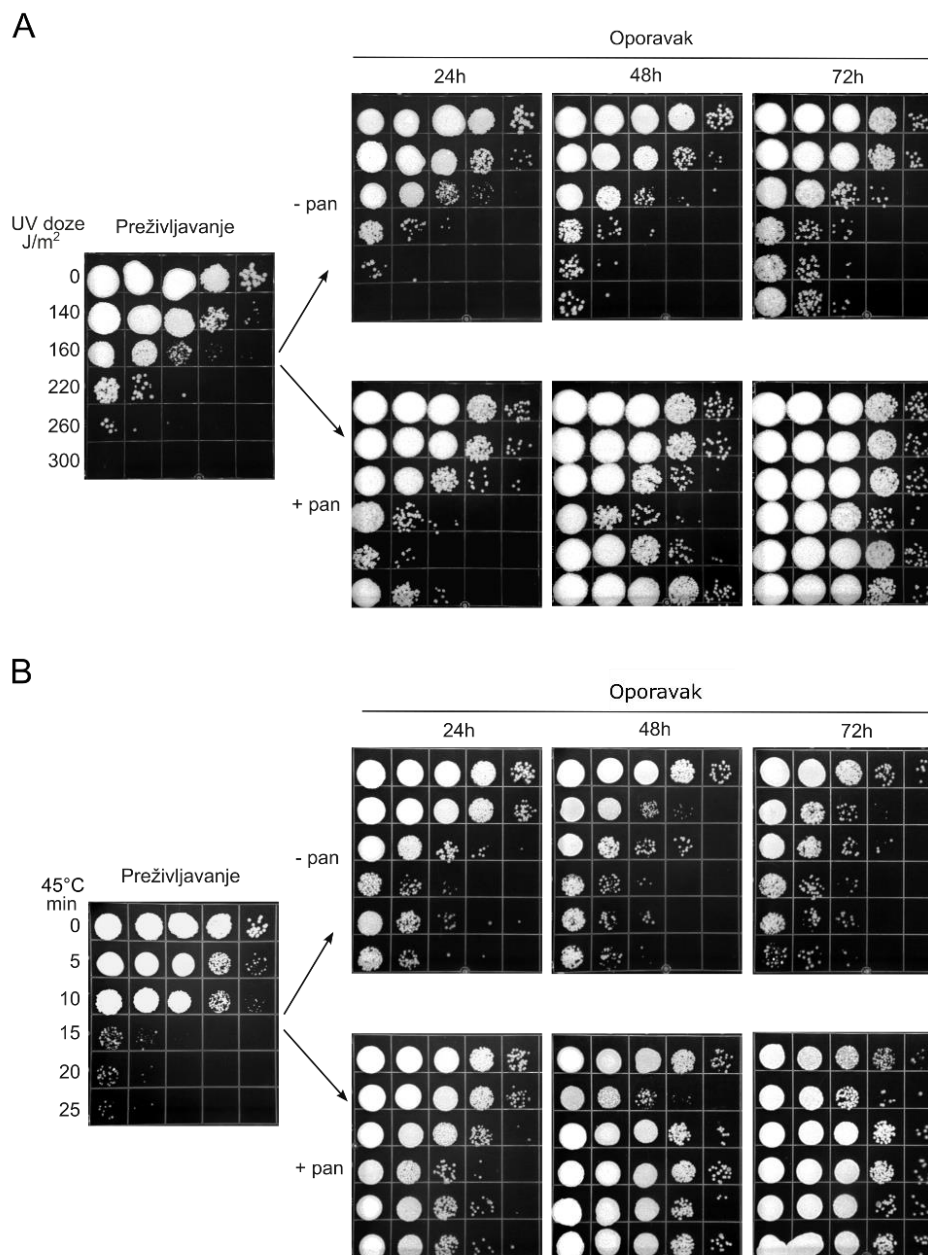
Kako bi se odgovorilo na prvo pitanje, analiziran je elektroforetski kariotip pojedinačnih kolonija formiranih iz preživjelih UCM350 ćelija koje su nakon tretmana sa 0,3% H₂O₂ inkubirane u uslovima sa ili bez dodatog pantotenata, **Slika 8Ca**. Kao što je već pomenuto, kolonije dobijene iz pan-suplementiranog uzorka nisu pokazivale značajne morfološke promjene. Saglasno tome, kada su četiri nezavisna izolata nasumično uzeta iz ove grupe, pripremljena i analizirana PFEG elektroforezom, **Slika 8Cb**, njihov hromozomski profil se nije razlikovao od onog kod netretirane kontrole. Nasuprot tome, u tri od četiri izolata potekla od ćelija oporavljenih bez dodatog pantotenata uočeni su očigledni hromozomski rearanžmani, što ukazuje na to da je proces reparacije oštećenih hromozoma, pod ovim uslovima, bio neprecizan.

Sljedeći korak istraživanja bio je usmjeren na ispitivanje da li se negativan efekat na rezerve koenzima A zaista ispoljava specifično, odnosno samo kao posljedica tretmana peroksidom.

4.2.2 Negativan uticaj na resurse koenzima A nije specifičan za tretman vodonik-peroksidom

Razmatrajući da li na rezerve koenzima A mogu uticati i faktori koji su po svojoj prirodi drugačiji od vodonik-peroksida, ispitan je uticaj dva fizička faktora - **UV zračenja i povišene**

temperature (45°C) koji se često, pojedinačno ili kombinovano, sreću u različitim ekološkim nišama. U skladu s tim, ćelije soja *UCM350* izložene su rastućim dozama ovih stresogenih agenasa, a njihov je oporavak praćen u uslovima sa ili bez suplementacije pantotonom.



Slika 9. Suspenzije ćelija soja *UCM350* (4×10^7 ćelija/mL) izlagane su UV zračenju i toplotnom stresu, u prisustvu ili odsustvu dodatka pantotenata (pan). Nakon tretmana, ćelije su inkubirane u tečnom medijumu, a oporavak populacije praćen je na svakih 24 h tokom perioda od 3 dana. **A** Oporavak nakon UV zračenja. **B** Oporavak nakon toplotnog stresa. Prikazane slike predstavljaju reprezentativne rezultate najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Kao što je prikazano na **Slici 9**, analiza je pokazala da je repopulacija nakon UV-zračenja, **Slika 9A**, kao i nakon toplotnog tretmana, **Slika 9B**, slično kao i u slučaju peroksida, postajala sve više zavisna od suplementacije pantotonom kako su doze stresora povećavane. Ovaj rezultat je, dakle, negirao pretpostavku da su razlike uočene između efekata SGH i tretmana peroksidom specifične samo za drastično djelovanje vodonik-peroksida.

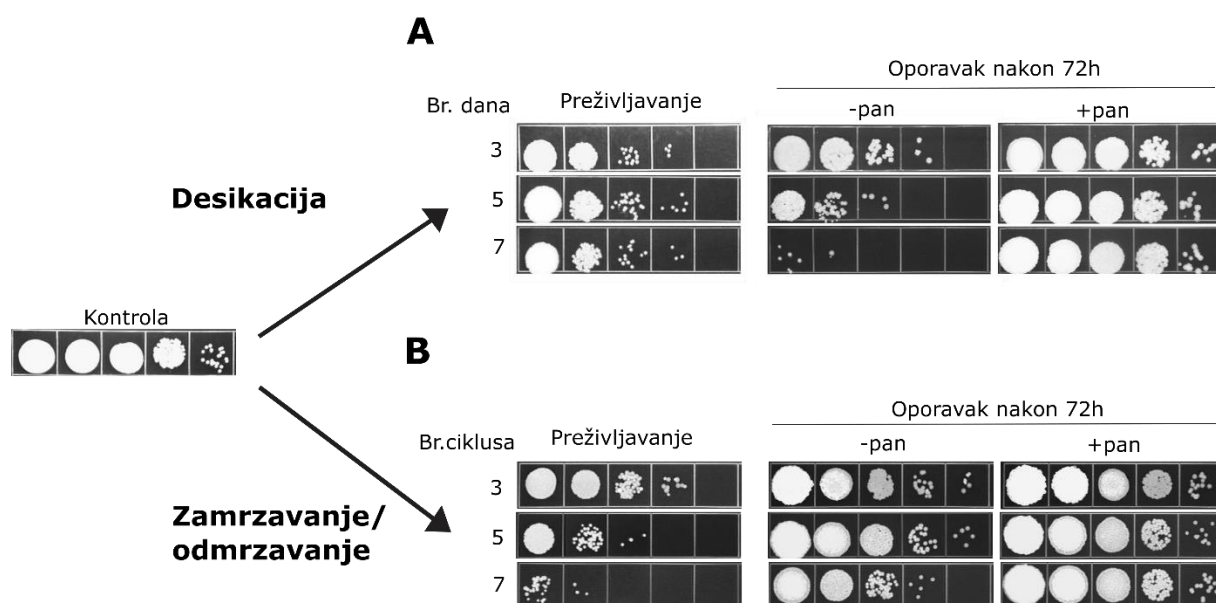
Vrijedno je istaći i dva dodatna opažanja proistekla iz rezultata prikazanih na **Slika 9**. Prvo, u slučaju UV tretmana konzistentno je primećena dozno-zavisna stimulacija oporavka ćelijske suspenzije izložene višim dozama UV zračenja (260 i 300 J/m²) koje su pokazivale brži rast nakon tretmana. Drugo, ćelije izložene toplotnom stresu (5 minuta na 45°C) su pokazale odloženu ćelijsku smrt, koja se ispoljila oko 48 sati nakon tretmana, nezavisno od pan-suplementacije. Ovaj odloženi odgovor sugerše da kratkotrajno izlaganje povišenoj temperaturi može izazvati mehanistički različit oblik ćelijske smrti u poređenju sa onim koji nastupa pri produženom stresu.

U tom smislu, iako je H₂O₂ laboratorijski stresor, dobijeni podaci pokazuju da se zaključci izvedeni iz tretmana peroksidom mogu proširiti i na stresogene faktore drugačije prirode (UV zračenje i toplotni stres).

4.2.3 UCM350 kao indikator kvaliteta supstrata nakon desikacije i zamrzavanja

U cilju dodatne validacije soja UCM350 kao pouzdanog indikatora nutritivnog kvaliteta supstrata oslobođenih iz mrtvih ćelija, ispitani su efekti još dva ekološki relevantna, ali znatno kompleksnija stresna modela - desikacije sa naknadnom rehidracijom i ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Za razliku od prethodno analiziranih stresora, čiji negativni efekat na ćeliju prestaje sa prestankom samog stresa, ovi oblici stresa predstavljaju produžene i dinamične procese koji dovode do naknadnih oštećenja i po svom prestanku.

Rezultati prikazani na **Slici 10** ukazuju na nekoliko ključnih obrazaca. Prije svega, neposredno preživljavanje nakon desikacije, čak i pri produženim vremenskim intervalima, ne pokazuje izražene razlike između doza tretmana. Međutim, razlike postaju jasno vidljive tokom faze oporavka nakon rehidracije. Konkretno, u odsustvu dodatog pantotenata dolazi do postepenog opadanja broja vijabilnih ćelija tokom inkubacije, što ukazuje da inicijalno preživjele ćelije nisu u stanju da održe dalju proliferaciju, **Slika 10A**. Nasuprot tome, suplementacija pantotenatom značajno poboljšava oporavak, što ukazuje na ograničenu dostupnost funkcionalnih CoA-resursa u supstratima nastalim nakon ovog tretmana. Odsustvo proliferacije i dodatni gubitak vijabilnosti u uslovima oporavka bez dodatog pantotenata dodatno potvrđuju prethodne rezultate prikazane na **Slici 8B** ukazujući da je pantotenat od ključnog značaja ne samo za oporavak populacije, već i za unutarćelijsku popravku nastalih oštećenja, **Slika 8C**.



Slika 10. Suspenzije ćelija soja UCM350 (4×10^7 ćelija/mL) izlagane ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja, i desikaciji, sa ili bez dodatka pantotenata (pan). Nakon tretmana, ćelije su inkubirane u tečnom medijumu, a oporavak populacije praćen je na svakih 24 h tokom perioda od 3 dana. A

Oporavak nakon desikacije. **B** Oporavak nakon ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Prikazane slike predstavljaju reprezentativne rezultate najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Kod tretmana zamrzavanjem uočava se drugačiji obrazac, gdje povećanje broja ciklusa stresa dovodi do progresivnog smanjenja broja vijabilnih ćelija, **Slika 10B**. Iako oba tipa stresa dijele zajedničku komponentu smanjene dostupnosti vode, zamrzavanje uključuje i dodatni mehanizam oštećenja - formiranje ledenih kristala koji mogu mehanički oštetiti ćelijske membrane. Ono što dodatno privlači pažnju jeste da supstrati oslobođeni nakon tretmana zamrzavanjem, iako ne u potpunosti, ipak podržavaju oporavak značajnog dijela populacije, jer je nivo oporavka populacije nakon tretmana zamrzavanjem sudeći po brojnosti vijabilnih ćelija u oporavku nakon 72h 20X veći u poređenju sa brojnosti populacije ćelija pri oporavku nakon uticaja drugih tipova stresa istog intenziteta, **Slika 9**. Ovakav obrazac ukazuje da ovaj tip stresnog tretmana ima specifičan uticaj na kvalitet oslobođenih nutrijenata u poređenju sa prethodno ispitivanim stresorima, pri čemu se čini da dostupnost CoA-resursa nije narušena u istoj mjeri.

Međutim, ono što je od primarne važnosti za istraživačku liniju koju ovde slijedimo, je činjenica da dobijeni rezultati sugerišu mogućnost da je ukupni nutritivni kvalitet oslobođenih supstrata - a ne samo CoA-resursa – očuvan tokom razgradnje ćelija koje su umrle usljed SGH tretmana. Drugim riječima, nametnulo se pitanje da li su supstrati oslobođeni iz ćelija koje prolaze kroz suicidalnu, SGH-indukovanu smrt generalno povoljniji/blagotvorniji za rast preživjelih ćelija nego nutrijenti oslobođeni nakon tretmana peroksidom? Ako jesu, da li razlog za tu razliku može ležati u tome što ova dva tretmana indukuju različite tipove smrti?

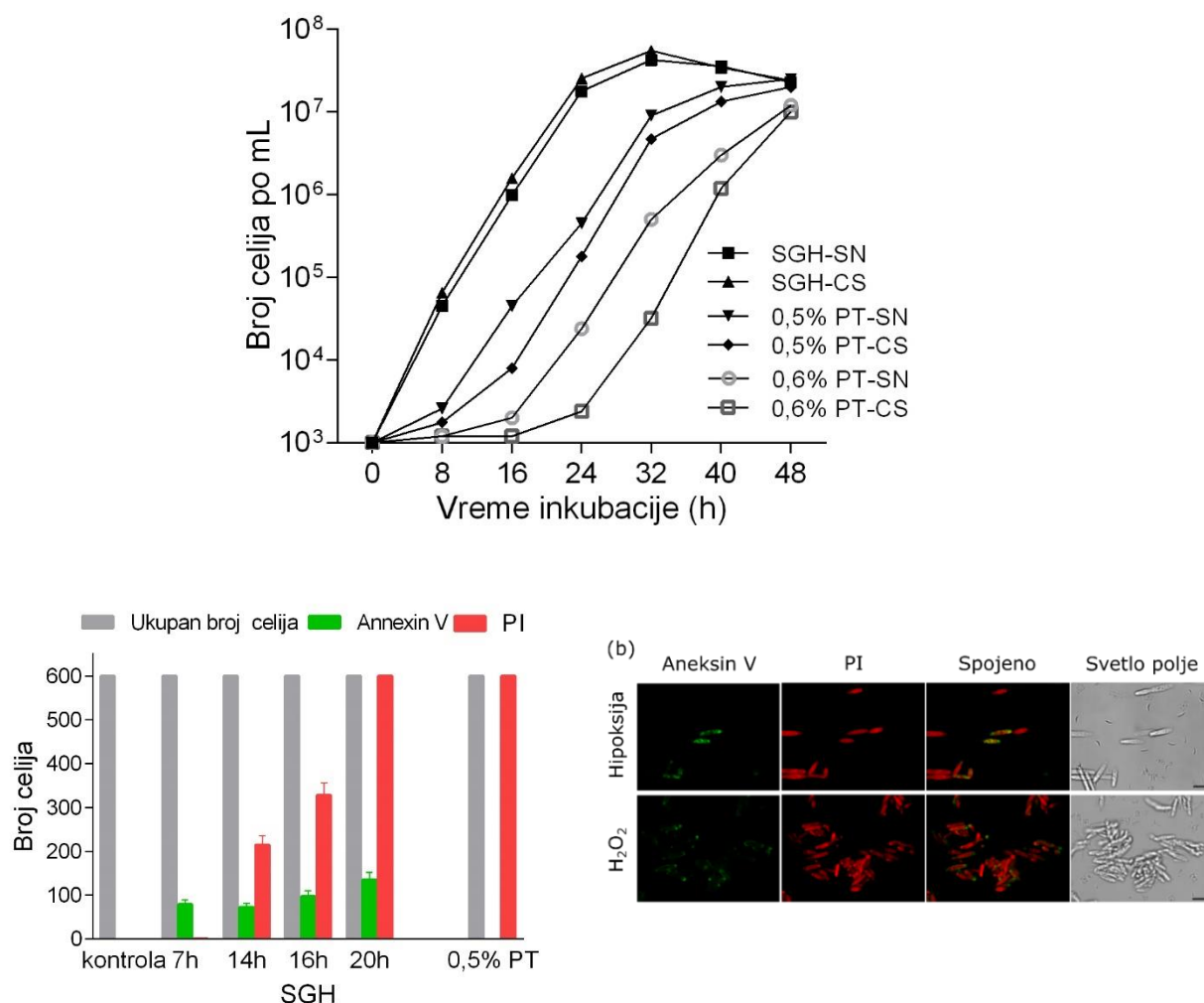
Analize koje slijede osmišljene su da ispituju ove mogućnosti.

4.2.4 Suicidna, SGH-indukovana smrt se odvija kroz PCD i generiše nutrijente povoljne za rast

Kako bi se ispitalo da li je ukupni nutritivni kvalitet supstrata oslobođenih tokom SGH-indukovane smrti bolje očuvan nego kvalitet nutrijenata porijeklom iz ćelija tretiranih peroksidom (PT), najjednostavnije bi bilo uporediti rast netretiranih, svježih ćelija u supernatantima dobijenim iz SGH-tretiranih kultura sa rastom u supernatantima PT-kultura. Međutim, sa stanovišta ekološke realnosti, primjerenije je bilo uporediti uticaj koji na rast ispoljavaju ne samo supernatanti, već i odgovarajuće ćelijske suspenzije, odnosno ukupne nekromase. Rast u prisustvu ukupne nekromase vjernije odražava uslove sa kojima se *U. maydis* može suočiti u prirodi.

Uzimajući sve ovo u obzir, upoređeni su efekti rasta kako SGH- tako i PT-ćelijskih suspenzija, kao i njima odgovarajućih supernatanata. Pošto je cilj bio da se utvrdi da li SGH-nekromasa poseduje povoljniji supstratni potencijal, posmatrani su efekti rasta u poređenju sa kapacitetom za rast koji pružaju ćelije tretirane sa 0,5% H₂O₂, za koje je ranije pokazano da daju najpovoljniji odnos između stimulativnih i inhibitornih faktora [1]. Kao dodatna referenca uključeni su i uzorci dobijeni tretmanom sa 0,6% H₂O₂ (ćelijske suspenzije - CS, i odgovarajući supernatanti - SN).

S obzirom na to da tretmani peroksidom utiču na raspoloživost koenzima A, ovaj parametar je anuliran korišćenjem soja *U. maydis* UIMG10 (Pan⁺) i suplementacijom svih uzoraka pantotenatom (10 μM). Da bi nutritivni kapacitet supstrata bio uporediv, SGH-uzorci (prvobitne gustine 4×10⁸ ćelija/mL) razblaženi su desetostruko, tako da razblaženja odgovaraju gustini PT-supstrata (4×10⁷ ćelija/mL). Supernatanti su dobijeni centrifugiranjem i filtracijom (0,45 μm) tretiranih suspenzija nakon 5 sati post-PT inkubacije na 30°C. Na taj način pripremljeni SGH i PT uzorci su inokulisani svežim ćelijama soja UIMG10 (1×10³/mL) i inkubirani na 30°C uz stalnu agitaciju. Rast je praćen u intervalima od 8 sati tokom 48 sati.



Slika 11. Smrt ćelija indukovana samogenerisanom hipoksijom (SGH) podstiče produkciju derivata koji stimulišu rast. **A** Krive rasta soja *U. maydis* UMG10 (inokulum 10³ ćelija) u supernatantima (SN) i ćelijskim suspenzijama (CS) dobijenim nakon SGH ili tretmana vodonik-peroksidom (PT; 0,5% / 0,6%). Pošto su PT supstrati pripremani pri gustini od 4×10^7 ćelija/mL, početni SGH uzorci (4×10^8 ćelija/mL) razblaženi su 10× kako bi nutritivni kapacitet svih supstrata bio uporediv. Supernatanti su dobijeni centrifugiranjem i filtriranjem ćelija kroz Millipore filtere poroznosti 0,45 µm nakon 5 h inkubacije na 30 °C nakon tretmana. Grafikon predstavlja rezultat tri nezavisna mjerenja. Standardne devijacije nisu prikazane zbog logaritamske skale rasta. **B(a)** Detekcija apoptoze/programirane ćelijske smrti (PCD) i nekroze primjenom bojenja Aneksinom V i propidijum-jodidom (PI) u ćelijama izloženim SGH ili tretiranim vodonik-peroksidom (0,5% PT). Stubovi greške predstavljaju standardne devijacije tri nezavisna eksperimenta. **B(b)** Reprezentativne slike SGH i PT ćelija dobijene konfokalnom fluorescentnom mikroskopijom nakon bojenja Aneksinom V i propidijum-jodidom (PI). Skala = 10 µm; Svetlo polje-totalna brojnost ćelija na polju.

Kako je prikazano na **Slici 11A**, inokulumi zasejani u SGH-ćelijske suspenzije (SGH-CS) i u SGH-supernatante (SGH-SN) pokazali su znatno bržu reprodukciju, nadmašivši po brzini rasta sljedeću najbrže rastuću kulturu - inokulum zasejan u 0,5% PT supernatant - za više od jednog reda veličine tokom prvih 24 časa, dostižući maksimalnu gustinu već nakon 32 sata. Ovi rezultati ukazuju na to da je ukupni nutritivni kvalitet, a ne samo sadržaj koenzima A, očuvan na višem nivou u slučaju SGH-indukovane smrti. Zanimljivo je da je razlika između rasta u SGH-CS i SGH-SN kulturama bila minimalna, pri čemu su suspenzije ponekad podržavale čak i blago bolji rast od odgovarajućih supernatanta. Nasuprot tome, krive rasta dobijene za ćelijske suspenzije i supernatante pripremljene iz 0,5% PT-ćelija pokazale su jasno razilaženje, koje je bilo još izraženije pri rastu u uzorcima dobijenim pri tretmanu većom (0,6%) koncentracijom vodonik-peroksida. Očigledno je da faze zastoja (lag faze) u PT-CS kulturama traju duže nego u odgovarajućim SN

kulturama, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima koja su pokazala da inhibični efekat ne može da se sa PT suspenzija u potpunosti prenese na supernatante [1].

Sledeći korak bio je da se utvrdi da li se suicidalna, SGH-indukovana smrt kod *U. maydis* zaista odvija putem PCD-a. Treba napomenuti da je u prethodnoj studiji primijećeno da je SGH-indukovana smrt bila povezana sa izraženim porastom reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i „lestvičastom“ fragmentacijom DNK [65], dva procesa koja su često, ali ne uvijek, u korelaciji sa PCD-om [37,47]. Stoga je bilo važno da se ova mogućnost testira na kritičniji način, odnosno ispitivanjem eksternalizacije fosfatidilserina, koja se smatra jednim od najpouzdanijih markera PCD-a.

S obzirom na to da se SGH-uslovi postepeno razvijaju tokom inkubacije, pojedinačni alikvoti su u različitim vremenskim tačkama analizirani na prisustvo PCD-a i nekroze pomoću aneksina-V u kombinaciji sa propidijum-jodidom (PI).

Kao što je prikazano na **Slici 11Ba**, nakon 7 sati SGH inkubacije zabeležen je značajan udio aneksin V-pozitivnih ćelija (13,2%), što ukazuje na to da su, pod SGH-uslovima, ćelije *U. maydis* zaista indukovane da uđu u proces apoptoze. Pošto je u istoj vremenskoj tački kultura imala samo 0,17% PI-pozitivnih ćelija, većina aneksin-pozitivnih ćelija nalazila se u ranom apoptotskom stadijumu. Međutim, od 7. sata nadalje broj PI-pozitivnih ćelija rastao je eksponencijalno, dostižući maksimum u 20. satu, dok je udio aneksin-pozitivnih ćelija ostao približno konstantan. Ovi podaci sugerišu da, kao i u brojnim eksperimentalnim sistemima opisanim do sada, uključujući *U. maydis*, apoptotske ćelije prolaze kroz različite faze - od ranog apoptotskog preko kasnog apoptotskog do nekrotičnog stadijuma [39]. Shodno tome, u kasnijim fazama aneksin V-pozitivne ćelije postaju i PI-pozitivne, što je potvrđeno mikroskopskom analizom, **Slika 11Bb**.

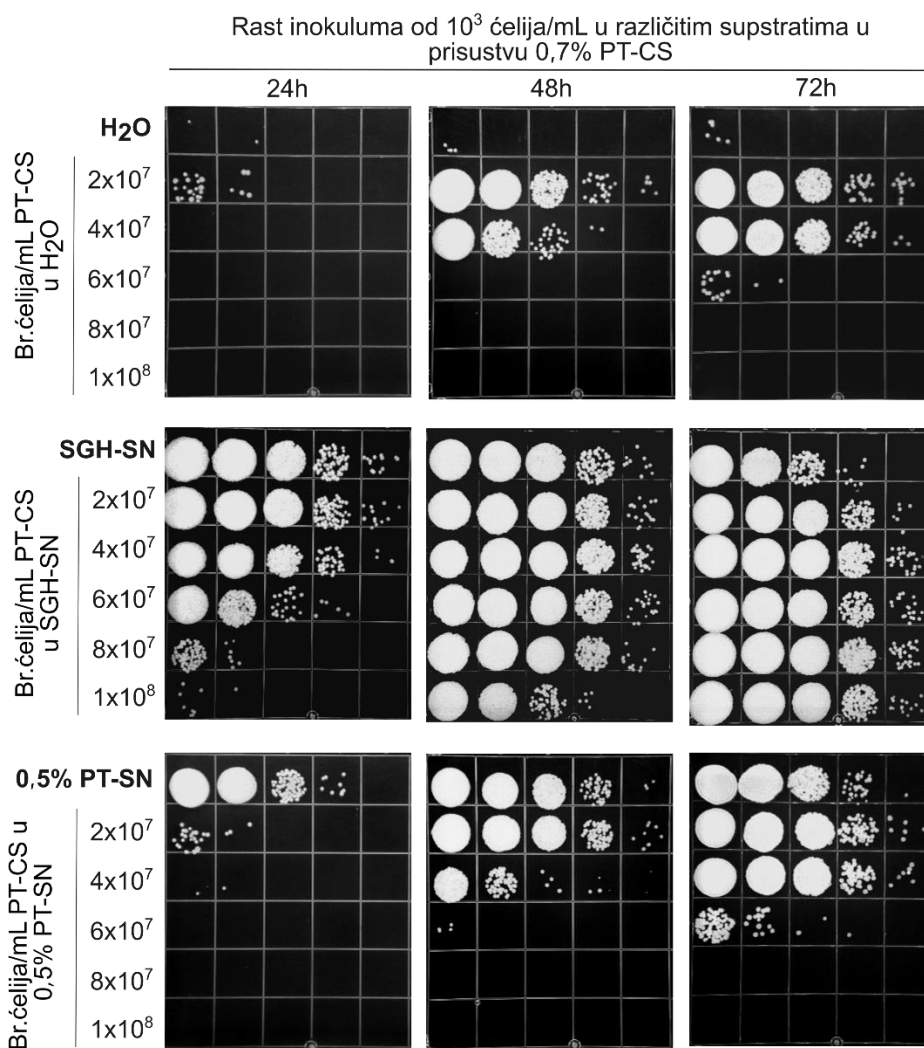
Za razliku od SGH uzoraka, u 0,5% PT suspenziji gotovo sve ćelije bile su nekrotične (>99% PI-pozitivnih) posmatrano neposredno nakon tretmana.

U cjelini, eksperimenti su pokazali da pod SGH-uslovima ćelije *U. maydis* zaista prolaze kroz PCD oblik umiranja, da su supstrati ćelija koje su prošle kroz PCD znatno povoljniji za rast od nutrijenata oslobođenih iz nekromase koja nije rezultat PCD-a, kao i da se ovi nalazi podudaraju sa rezultatima dobijenim za *C. reinhardtii* [86]. Dodatno, krive rasta SGH-CS i SGH-SN kultura se prilično dobro poklapaju, što ukazuje na to da prisustvo ukupne SGH-nekromase ne nameće dodatni stres ćelijama u fazi rasta.

4.2.5 Produkti PCD-a mogu doprinijeti prevazilaženju inhibičnih efekata nekromase nastale ne-PCD putem

Mikroorganizmi su izloženi brojnim, pa čak i simultanim stresovima koji mogu devastirati njihove populacije, stvarajući nekromase različite prirode i varijabilnog nutritivnog kvaliteta, u pogledu stimulacije rasta preživjelih ćelija [87,88]. Stoga je bilo od posebnog značaja ispitati da li materijal oslobođen programiranom ćelijskom smrću može doprinijeti prevazilaženju inhibičnih efekata koji na rast ispoljavaju nekromase nastale ne-PCD putem.

Kinetika rasta *U. maydis* UIMG10 ćelija je praćena u prisustvu rastućih gustina peroksidom-tretiranih ćelija (PT-CS), resuspendovanih u vodi, u desetostruko razblaženom SGH (PCD) filtratu, i u supernatantu dobijenom tretmanom sa 0,5% H₂O₂ (PT-SN). U ovom inicijalnom eksperimentu korišćeno je pet gustina PT ćelija tretiranih sa 0,7% H₂O₂ (2×10⁷, 4×10⁷, 6×10⁷, 8×10⁷ i 1×10⁸ ćelija/mL). Svi uzorci su inokulisani sa 1×10³ netretiranih ćelija, inkubirani na 30°C uz snažno šejkiranje, a dinamika rasta praćena je zasejavanjem 10X serijskih razblaženja na YEPS medijum. Rezultati su prikazani zbirno na **Slici 12**.



Slika 12. Prevazilaženje toksičnih efekata ćelijske suspenzije tretirane vodonik-peroksidom (nekromase) pomoću materijala oslobođenih tokom programirane ćelijske smrti (PCD). Rast svježih ćelija soja *U. maydis* UIMG10 (inokulum 10^3 ćelija/mL) u različitim medijumima (H₂O, supernatant nastao tokom samogenerisane hipoksije – SGH-SN, i supernatant dobijen iz ćelija tretiranih sa 0,5% vodonik-peroksida – 0,5% PT-SN) u prisustvu rastućih količina ćelijskih suspenzija/nekromase dobijene tretmanom sa 0,7% vodonik-peroksida (PT-CS). Rast je procijenjivan nakon 24, 48 i 72 h inkubacije. Desetostruka serijska razblaženja su zasejana (tačkasti esej) na bogatu YEPSA podlogu i inkubirana na 30 °C tokom 3 dana. Prikazane slike predstavljaju reprezentativne rezultate najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Inhibitorni efekat nekromase na rast zasejanih ćelija je zavisio od koncentracije PT ćelija. Pri najvišim gustinama PT ćelija resuspendovanih u vodi, dolazilo je čak i do potpunog gubitka vijabilnosti inokulisanih ćelija. Međutim, nakon 24 i 48 sati, svi uzorci suplementirani PCD supstratima pokazali su izrazito poboljšanje preživljavanja i proliferacije tj. u PCD supernatantima inokulumi su mogli da prežive i proliferišu čak i pri početnom odnosu živih prema mrtvim ćelijama od $1:10^5$. Iako sa znatno sporijom kinetikom i na primjetno nižem nivou, i 0,5% PT filtrat je pokazao značajnu sposobnost da ublaži inhibitorne efekte 0,7% PT nekromase.

Dakle, može se zaključiti da jedinjenja oslobođena iz ćelija koje umiru putem PCD-a posjeduju izraženu sposobnost da stimulišu proliferaciju ćelija i u prisustvu nekromase nastale ne-PCD putem. Posmatrano sa ekološkog stanovišta, ovo zapažanje implicira da bi dinamika obnove devastiranih populacija presudno zavisila od proporcije ćelija koje su umrle putem PCD-a.

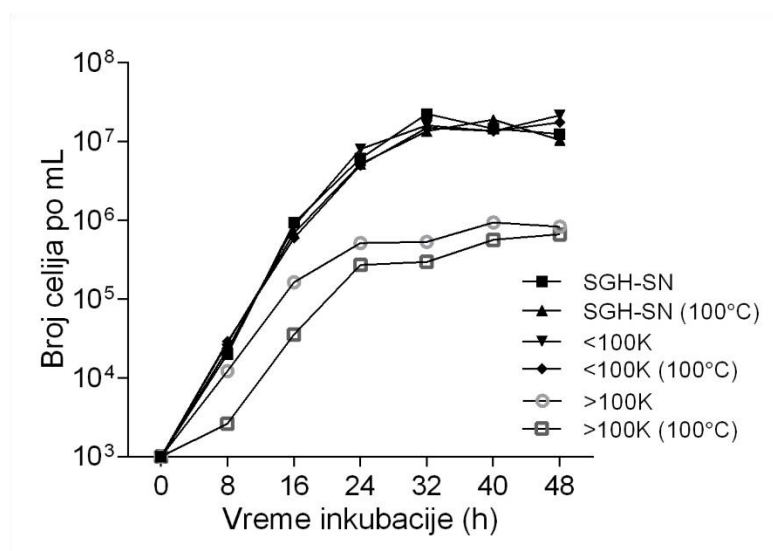
4.2.6 Karakterizacija produkata PCD-a

Na osnovu ranijih istraživanja na *S. cerevisiae* [47] i *C. reinhardtii* [45] u kojima je pokazano da toplotni tretman PCD materijala ne utiče na njegovu sposobnost da podstiče rast, analiziran je uticaj termičke obrade na aktivnost PCD supstrata. Pored toga, ispitana je i mogućnost da tokom PCD-a nastaju supramolekulske strukture koje učestvuju u distribuciji nutrijenata, uključujući potencijalnu ulogu ekstracelularnih mikrovezikula [50]. U tu svrhu, PCD materijal je frakcionisan ultrafiltracijom prema molekulknoj masi.

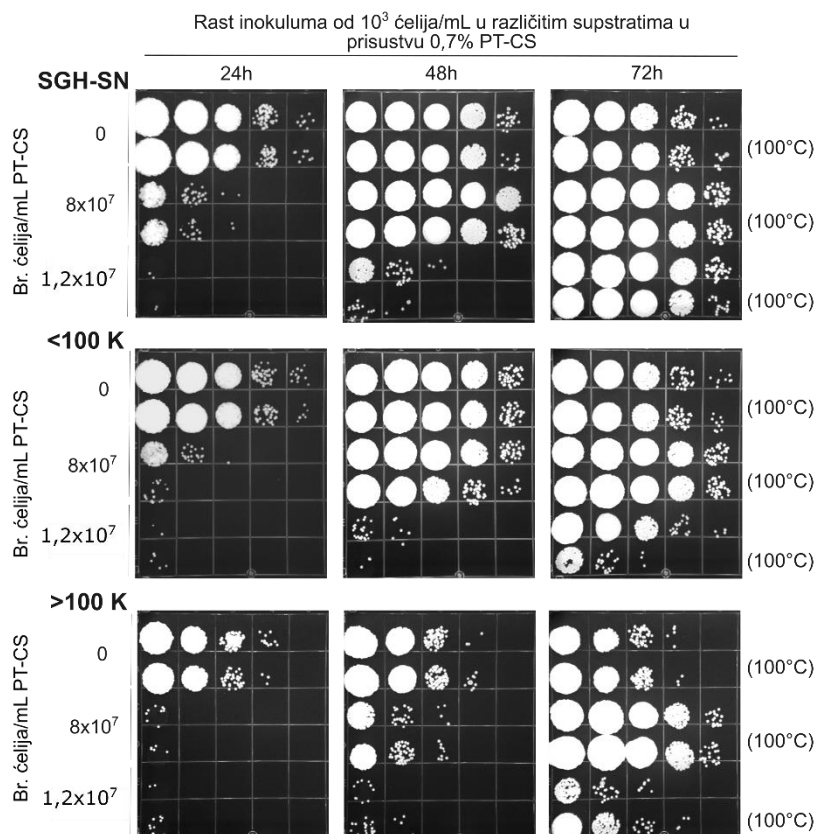
Pripremljen je standardni SGH-SN (filtrat od 0,45 µm), koji je zatim frakcionisan ultrafiltracijom pomoću membrane sa graničnom propustljivošću od 100 kDa (Amicon Ultracel 100-K, Merck Millipore, Irska). Materijal koji je prošao kroz filter (<100K filtrat) i materijal zadržan na filteru (>100K retentat) dovedeni su na početni volumen pomoću sterilne destilovane vode. Početni SGH-SN i obe frakcije su zatim analizirani u pogledu toplotne ne/stabilnosti materijala koje oni sadrže, pri čemu je ova ne/stabilnost praćena u odnosu na njihove sposobnosti da stimulišu rast.

Kao što je prikazano na **Slici 13A**, uzorci zagrijani 20 minuta na 100°C pokazali su gotovo identične krive rasta kao i netretirani ekvivalenti, što ukazuje da toplotni tretman ne utiče značajno na njihovu sposobnost da stimulišu rast. Takođe, bilo je očigledno da se većina materijala nalazila u <100K frakciji, što pokazuje da distribucija nutrijenata nije presudno zavisna od prisustva supramolekularnih struktura. Što se tiče retentata, njegov nutritivni kapacitet iznosio je oko 7% ukupnog sadržaja sudeći prema brojnosti vijabilnih ćelija nakon 72h rasta u istom. Zanimljivo je da je, za razliku od filtrata, recikliranje materijala u retentatu bilo djelimično narušeno toplotnim tretmanom - što se manifestovalo produženjem lag faze rasta u odnosu na onu u netretiranom uzorku.

A



B



Slika 13. Uticaj termičkog tretmana (100°C tokom 20 minuta) na efekat stimulacije rasta supernatantom dobijenim iz SGH uslova (SGH-SN) i njegovim derivatima (frakcije molekulske mase manje od 100 kDa (<100K) i veće od 100 kDa (>100K)). **A** Krive rasta ćelija (inokulum 10^3 ćelija/mL) inkubiranih sa nativnim ili termički tretiranim supernatantima. **B** Rast svežih ćelija u termički netretiranim i tretiranim supernatantima u prisustvu 0,7% PT nekromase: ukupan SGH-SN, <100K i >100K, bez prisustva (kontrola) i u prisustvu 8×10^7 ćelija/mL i $1,2 \times 10^8$ ćelija/mL 0,7% PT nekromase. Rast je praćen u intervalima od 24 h tokom perioda od 3 dana. Desetostruka serijska razblaženja zasejana su tačkastim esejom na bogatu

YEPSA podlogu i inkubirana na 30 °C tokom 3 dana. Prikazane slike predstavljaju reprezentativne rezultate najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Sljedeći korak je bio da se ispita stimulacija rasta u prisustvu PT ćelija korišćenjem toplotno tretiranih i netretiranih SGH supernatanta. Rezultati su pokazali da termički obrađen SGH-SN ima blago smanjenu aktivnost, ali je taj efekat uočen samo pri najvišoj testiranoj koncentraciji PT ćelija (1×10^8 ćelija/mL) (podaci nisu prikazani). Da bi se provjerilo da li je uočena promjena značajna, eksperiment je ponovljen primjenom još veće koncentracije PT ćelija ($1,2 \times 10^8$ ćelija/mL). U analizu su uključene i 100K frakcije. Kako bi se uočili eventualno izraženiji efekti tretmana na 100K frakcije dodatno je korišćena i koncentracija od 8×10^7 PT ćelija/mL. Rast je praćen tokom tri dana, a rezultati su prikazani na **Slici 13B**.

Prvo što treba istaći jeste da se značajan uticaj termičkog tretmana mogao uočiti samo pri veoma visokim gustinama PT ćelija. Ovaj efekat je bio izraženiji u slučaju termički tretiranog <100K filtrata. Već u prisustvu 8×10^7 PT ćelija/mL rast u tretiranom <100K filtratu tokom prvih 48 sati zaostajao je za rastom odgovarajuće kontrole. Ova razlika bila je još vidljivija kod rasta inokuluma zasijanih u $1,2 \times 10^8$ PT ćelija/mL čak i nakon 48 h inkubacije. Iako su znaci rasta bili evidentni, uzorci suplementovani prokuvanim <100K filtratom i nakon 72 sata inkubacije značajno su zaostajali (>50 puta) za netretiranom kontrolom.

U istom eksperimentalnom sistemu nije uočen negativan uticaj toplote na sposobnost 100K retentata da stimuliše rast; naprotiv, inokulumi u medijumu sa termički obrađenim 100K retentatom preživljavali su i rasli čak i bolje nego u odgovarajućim kontrolama.

Na osnovu ovih nalaza mogu se izvesti dva zaključka:

Materijal iznad 100 kDa nije glavni nosilac nutritivnog kapaciteta SGH supstrata.

Tretman toplotom ne utiče značajno na sposobnost ovih supstrata da podstaknu ćelijsku proliferaciju, bilo u prisustvu ili odsustvu ne-PCD nekromase.

Ipak, primijećeno je da je sposobnost toplotno tretiranog <100K filtrata da podstiče rast pri najvišim gustinama PT ćelija smanjena u poređenju sa tretiranim ukupnim SGH-supernatantom, što može ukazivati na postojanje termoprotektivnih svojstava vezanih za komponente iz retentata.

4.2.7 Povoljni efekti SGH-supstrata porijeklom iz *U. maydis* ispoljavaju se i na srodne vrste

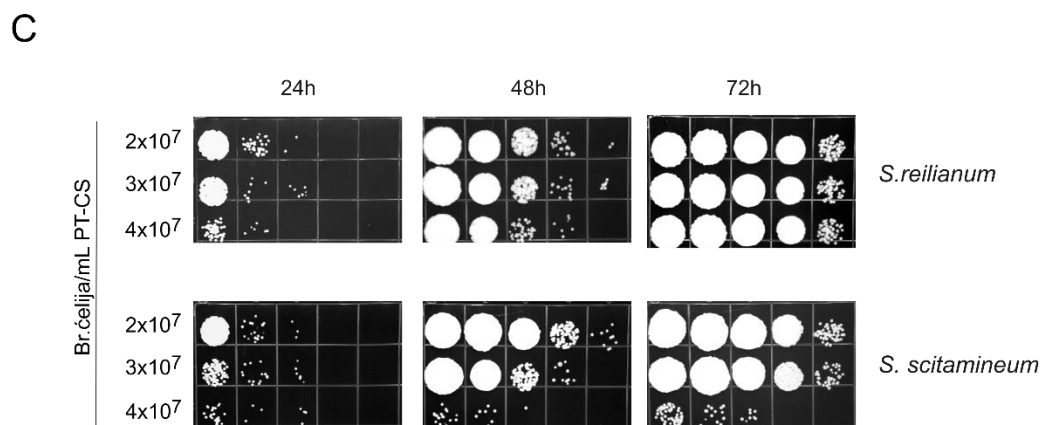
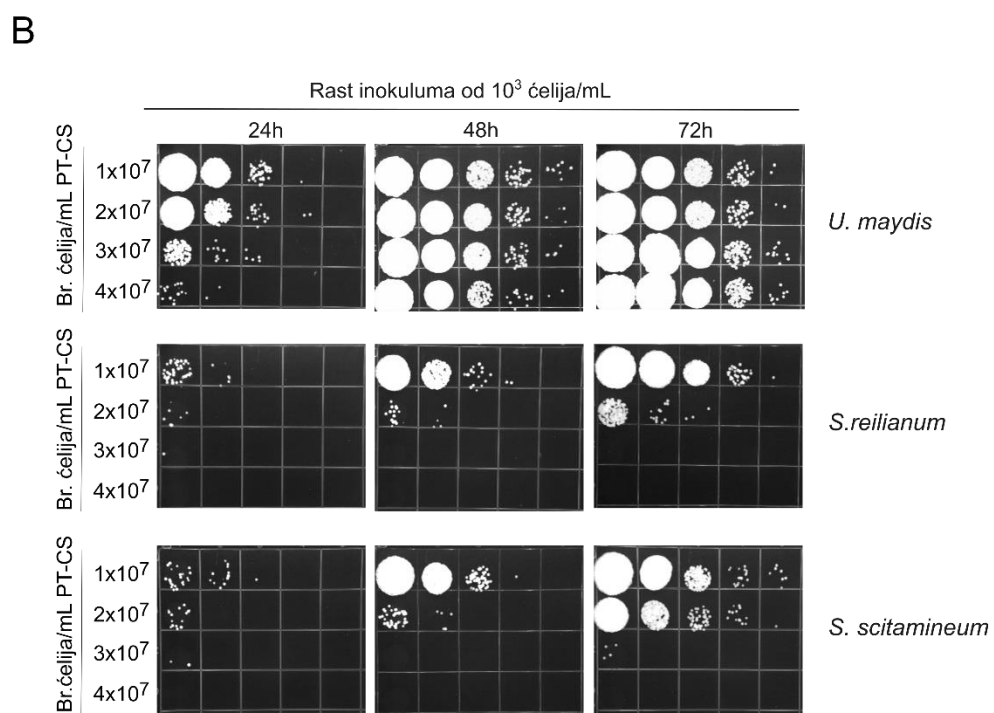
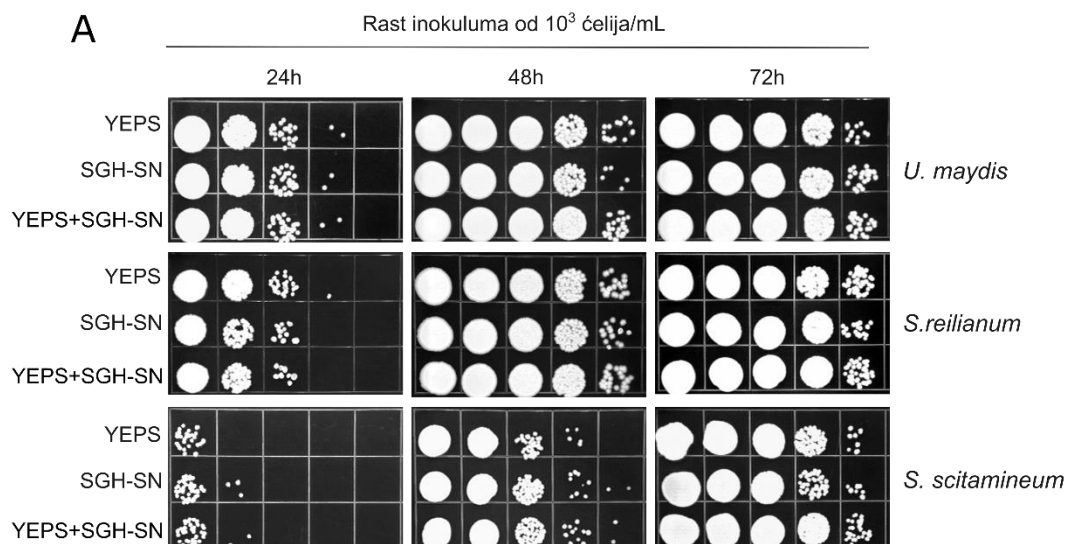
Da bi se utvrdilo da li SGH-materijal pokazuje sličnu selektivnost, ispitani su njegovi efekti na dvije blisko srodne vrste iz familije Ustilaginaceae: *Sporisorium reilianum* i *Sporisorium scitamineum*. Ove vrste su uzgajane pod tri različita eksperimentalna uslova:

u 100X razblaženom YEPS medijumu (za čiji je nutritivni kapacitet predhodno bilo ustanovljeno da je ekvivalentan 10X razblaženom SGH-SN),

u 10X razblaženom SGH-SN, i

u smiješi ova dva supstrata (u razmjeri 1:1).

Paralelne kulture *U. maydis* uzgajane su pod istim uslovima, služeći kao kontrola. Rast je praćen svakodnevno tokom tri dana na 30°C, a rezultati su prikazani na **Slici 14A**.



Slika 14. Efekti SGH supernatanta soja *U. maydis* UIMG10 (SGH-SN) na potencijal rasta filogenetski bliskih vrsta. **A** Rast svježih ćelija (inokulum 10^3 ćelija/mL) vrsta *Ustilago maydis*, *Sporisorium reilianum* i *Sporisorium scitamineum* u tri različita medijuma: $100\times$ razblaženom bogatom hranljivom medijumu (YEPS), SGH-SN i njihovoj smješi (1:1). **B** Rast svježih ćelija (inokulum 10^3 ćelija/mL) vrsta *Ustilago maydis*, *Sporisorium reilianum* i *Sporisorium scitamineum* u prisustvu rastućih gustina nekromase ($1\times-4\times 10^7$ ćelija/mL *U. maydis* ćelija tretiranih sa 0,7% vodonik-peroksida; 0,7% PT-CS). **C** Rast svježih ćelija (inokulum 10^3 ćelija/mL) vrsta *S. reilianum* i *S. scitamineum* u SGH-SN u prisustvu naznačenih gustina 0,7% PT-CS. Rast je praćen na svakih 24 h tokom 3 dana. Desetostruka serijska razblaženja su zasejana na bogatu YEPS agar podlogu i inkubirana na 30 °C tokom 3 dana. Prikazane slike predstavljaju reprezentativne rezultate najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Sveukupno, iako se dinamika rasta kod testiranih vrsta međusobno razlikovala, *S. reilianum* i *S. scitamineum* su pokazali unutar zadatih uslova obrazac rasta koji je bio vrlo sličan onom koji je pokazao *U. maydis*. Povoljan efekat SGH-materijala bio je očigledan, a svaka od ovih vrsta je pokazala profil rasta u ovom medijumu sličan onom uočenom u $100\times$ razblaženom YEPS-u. Nije uočena nikakva inhibicija rasta kod *S. reilianum* i *S. scitamineum*. Dakle, rezultati pokazuju da se povoljni efekti SGH-materijala porijeklom iz *U. maydis* protežu i na najmanje dvije srodne vrste.

Sljedeći korak je bio da se ispita može li SGH-materijal i u slučaju *S. reilianum* i *S. scitamineum* da ublaži inhibitorski efekat PT ćelija. Međutim, prije nego što se to moglo testirati, najprije je bilo potrebno da se procjeni sama osjetljivost *S. reilianum* i *S. scitamineum* ćelija na inhibitorne efekte 0,7% PT nekromase. Stoga je testirana sposobnost ćelija ove dvije vrste da prežive i da se razmnožavaju pri gustinama PT ćelija u rasponu od 1×10^7 do 4×10^7 ćelija/mL, tokom perioda od tri dana, pri čemu su ekvivalentni inokulumi *U. maydis* korišćeni kao referenca. Kako je prikazano na **Slici 14B**, obe *Sporisorium* vrste pokazale su, u odnosu na *U. maydis*, znatno slabije preživljavanje i rast pri većim gustinama PT ćelija što ukazuje na njihovu veću osjetljivost na štetne efekte 0,7% PT nekromase. Međutim, iako su obje *Sporisorium* vrste pokazale visoku osjetljivost na 0,7% PT nekromasu, dodatak SGH-SN imao je povoljan efekat na njihov rast, **Slika 14C**.

Dakle, pokazano je da se povoljni efekti SGH-materijala porijeklom iz *U. maydis* protežu i na najmanje dvije blisko srodne vrste, iako stepen pozitivnog efekta varira. Takođe je važno istaći da je *U. maydis*, u poređenju sa srodnim vrstama, pokazao znatno veću otpornost na nepovoljne efekte 0,7% PT nekromase.

5 Diskusija

5.1 Genotoksični potencijal poststresnih supstrata i faktori koji povezuju RUS sa odgovorom na oštećenje DNK

Mikroorganizmi su u prirodnim staništima izloženi djelovanju različitih stresogenih faktora koji suzbijaju njihovu sposobnost rasta i razmnožavanja. Pojedinačno ili kombinovano djelovanje ovih faktora može izazvati nivo oštećenja u ćeliji koji prevazilazi njen inherentni kapacitet za popravku oštećenih makromolekula, tako da ćelije masovno umiru te populacija doživljava drastičan pad brojnosti. Stoga je obnavljanje nakon masovnog umiranja vitalan zadatak za svaku populaciju mikroorganizama, a poznavanje mehanizama i ćelijskih faktora koji u tome učestvuju je značajno za sveobuhvatno razumijevanje strategija kojima mikroorganizmi dugoročno opstaju čak i u krajnje promjenljivim sredinskim uslovima. Tako je u ovom teorijskom kontekstu, a korišćenjem jednoćelijske bazidiomicete *U. maydis*, na osnovu eksperimentalnih rezultata definisan fenomen RUS-a, kao procesa koji obuhvata devastiranje populacije (masovan pad brojnosti vijabilnih ćelija i oslobađanje intracelularnih molekula) i njeno obnavljanje zasnovano na sposobnosti preživjelih ćelija da za svoju proliferaciju usvajaju i recikliraju nutritivni materijal porijeklom od umrlih ćelija [1,17].

Međutim, analiza efekta oslobođenog materijala na rast neoštećenih ćelija je pokazala da ovi supstrati mogu imati oprečnu biološku aktivnost - nutritivnu i toksičnu - pri čemu intenzitet jednog ili drugog efekta može varirati u zavisnosti od tipa stresa [87,88], intenziteta stresa [1], kao i specifičnog tipa ćelijske smrti [45]. U pogledu intenziteta stresa, prethodni eksperimenti na *U. maydis* su pokazali da nutrijenti oslobođeni iz tretiranih ćelija postaju progresivno toksičniji ne samo pri višim dozama stresora, već i sa produženim periodom inkubacije nakon tretmana [1]. Ovi rezultati ukazuju na to da bi *U. maydis* morao posjedovati ćelijske mehanizme uključene ne samo u reapsorpciju oslobođenih jedinjenja iz spoljašnje sredine, nego i u savladavanje njihove citotoksičnosti koja je indukovana tretmanom. Prethodna istraživanja takođe su pokazala da neki od faktora koji omogućavaju efikasnu repopulaciju istovremeno učestvuju i u procesima popravke DNK oštećenja.

Polazeći od ovih zapažanja, najprije je postavljeno pitanje da li biomolekuli oslobođeni tokom raspadanja ćelija mogu, pored citotoksičnog, imati i genotoksično dejstvo na neoštećene ćelije. Primjenom alkalnog komet testa ispitana je genotoksičnost supernatanta porijeklom iz suspenzije ćelija tretiranih sa 0,7% vodonik-peroksidom. Rezultati su pokazali približno 50% veći stepen oštećenja genomske DNK u odnosu na ćelije gajene u kontrolnom medijumu, **Slika 3**, čime je potvrđena pretpostavka da supstrati oslobođeni iz 0,7% PT ćelija mogu imati genotoksični potencijal. Zadatak budućih analiza bi mogao biti da se bliže odrede koji su konkretni produkti nekrotične smrti u najvećoj mjeri odgovorni za oštećenja genoma, kao i mehanizmi kojima se ta oštećenja indukuju. U svakom slučaju, jasno je da precizno određivanje hemijske prirode genotoksičnih molekula predstavlja bitan preduslov sveobuhvatnog razumijevanja RUS fenomena, a posebno za rasvjetljavanje preciznih uloga koje vrše ćelijski faktori uključeni u obnovu populacija i zaštitu genoma.

Ispitivanje uloge gena za koje se zna da učestvuju u različitim putevima reparacije oštećene DNK je pokazalo da većina gena koji igraju direktnu ulogu u homolognoj rekombinaciji ima minimalan uticaj, dok ključni geni zaduženi za reparaciju isecanjem baza ili isecanjem nukleotida ne pokazuju nikakav jasno uočljiv efekat na oporavak i iskorišćavanje RUS supstrata pod primijenjenim eksperimentalnim uslovima. Pri razmatranju ovih rezultata treba imati u vidu da je moguće da postoji funkcionalna redundantnost pojedinačnih puteva u odgovoru na izazove koje nameće rast u PT-SN. Testiranje ove mogućnosti zahtjeva generisanje duplih i trostrukih mutanata koji ciljaju centralne faktore više puteva popravke DNK. Svakako nije isključena ni mogućnost da

U. maydis ćelije posjeduju alternativne, još neotkrivene puteve čija je uloga u RUS-u redundantna sa ulogom kanoničnih puteva reparacije.

Međutim, ono što je bilo posebno interesantno jeste da delecija gena *Dss1* pokazuje izrazito negativan efekat na rast u 0,8% PT-SN, sudeći prema činjenici da je $\Delta dss1$ soj značajno zaostajao u rastu za divljim tipom pri svim gustinama inokuluma. Ovaj efekat se može objasniti plejotropnom prirodom *Dss1* proteina, čije funkcije prevazilaze njegovu ulogu u homolognoj rekombinaciji i obuhvataju održavanje integriteta proteazoma i eksport iRNK iz nukleusa [76,77] - procese od suštinskog značaja za homeostazu proteina i regulaciju genske ekspresije. Dodatno, *Dss1* je uključen u novootkrivenu posttranslacionu modifikaciju nazvanu DSS-ilacija [89], kojom se oksidovani proteini usmjeravaju ka proteazomskoj degradaciji, čime se ovaj protein pozicionira na kritičnoj raskrsnici između kontrole kvaliteta proteina i upravljanja oksidativnim i genotoksičnim stresom. Moguće je da zapravo konvergencija poremećaja u svim ovim putevima pojačava ćelijski stres u RUS uslovima i objašnjava izraženost fenotipa $\Delta dss1$ soja.

Od druga dva gena uključena u mehanizme genomske stabilnosti koji su se pokazali značajnim za RUS, gubitak *Atr1* je rezultirao ekstremnim RUS defektnim fenotipom, dok je $\Delta rec1$ pokazao inhibiciju rasta sličnu onoj kod $\Delta dss1$ mutanta. Ovo zapažanje je razumljivo u svjetlu multifunkcionalnih uloga *Atr1* i *Rec1* proteina. *Atr1* nije samo kontrolna kinaza ćelijskog ciklusa; on je globalni regulator replikacionog stresa i centralni čuvar genomske stabilnosti. *Atr1* stabilizuje replikacioni aparat, koordinira reparaciju DNK, reguliše dinamiku replikacije i učestvuje u zaštiti same strukture hromozoma [90,91]. Činjenica da *Atr1* funkcioniše kao glavni regulator odgovora na oštećenja DNK, podržava mogućnost da je odsustvo izraženih RUS fenotipova kod pojedinačnih mutanata HR, BER ili NER puteva posljedica funkcionalne redundancije među ovim sistemima tokom RUS-a.

Rec1 je naročito interesantan gen *U. maydis*, prvobitno identifikovan od strane Robina Holideja kao determinanta rekombinacione reparacije DNK [92,93]. Kasnije je kloniran [94], te je pokazano da kodira protein sa 3'→5' egzonukleaznom aktivnošću neophodnom za prevenciju nastanka mutacija i održavanje genomske stabilnosti [95]. Značajno je da se preživljavanje nakon izlaganja UV zračenju *rec1* mutanta poboljšava kada se oštećene ćelije vještački blokiraju u G2 fazi prije mitoze, što pokazuje da *Rec1* povezuje reparaciju DNK sa kontrolnom tačkom ćelijskog ciklusa [96]. Predloženo je da protein sadrži N-terminalni egzonukleazni domen i C-terminalni domen povezan sa kontrolnom ćelijskog ciklusa. Izolacija mutanata razdvojenih fenotipova - kompetentnih za reparaciju, ali defektnih u RUS-u, ili obrnuto - bila bi izuzetno informativna.

Pored analize poznatih faktora genomske stabilnosti, dodatni uvidi u molekularne mehanizme RUS-a mogu se dobiti i proučavanjem gena čija se ekspresija mijenja u uslovima rasta na RUS supstratima. Iako se funkcije gena često predviđaju na osnovu sličnosti na nivou sekvence i strukture sa poznatim proteinima u drugim organizmima, kao i na osnovu prisustva konzerviranih proteinskih domena, takav pristup ima značajna ograničenja. Poznato je da unutar velikih proteinskih superfamilija isti strukturni domeni mogu biti povezani sa različitim biohemijskim aktivnostima, te da evoluciona divergencija može dovesti do funkcionalne specijalizacije uprkos očuvanoj strukturi. Zbog toga sama arhitektura domena ili homologija na nivou sekvence ne predstavljaju pouzdan dokaz funkcije, a oslanjanje isključivo na bioinformatičke predikcije može rezultirati pogrešnim ili previše pojednostavljenim anotacijama [97]. Stoga eksperimentalna funkcionalna analiza unutar same vrste ostaje neophodan korak za potvrdu i precizno definisanje uloge kandidat gena.

Jedan od pristupa identifikaciji potencijalnih novih faktora uključenih u RUS bio je u ovom radu zasnovan na analizi transkriptomskog odgovora ćelija tokom rasta u PT-SN, koja je pokazala da se veliki broj gena indukuje tokom rasta u RUS uslovima [64]. Zanimljivo je da se broj jedinstveno eksprimiranih gena povećava sa porastom doze vodonik-peroksida kojima su dobijeni supernatanti, pri čemu je njihov broj porastao sa 85 u 0,4% PT-SN na 121 u 0,7% PT-SN. Ovi rezultati ukazuju na postojanje specifičnog seta gena koji bi mogli biti direktno uključeni u procese recikliranja i

obrade RUS supstrata. Iako bi funkcionalni značaj ovih gena mogao u principu biti relativno brzo testiran korišćenjem kolekcije delecioni mutanata na nivou čitavog genoma, takve kolekcije za *U. maydis* još uvijek nisu dostupne. Zbog toga je bilo neophodno selektivno pristupiti izboru kandidatskih gena sa liste onih čija je ekspresija povišena u 0,7% PT-SN uslovima.

Od šest analiziranih UMAG gena, tri su pokazala jasan RUS fenotip, pri čemu je UMAG_05976 takođe ispoljio izražen defekt u reparaciji DNK. UMAG_01332, homolog *S. cerevisiae* gena *PCD1*, **Slika 5A**, takođe je uključen u RUS. *PCD1* kodira Nudix hidrolazu odgovornu za uklanjanje oksidovanih nukleotida (npr. 8-oxo-dGTP) [98] i uklanjanje oksidovanih CoA disulfida iz peroksizoma [99], ali mutant za ovaj gen nije pokazao povećanu osjetljivost na agense koji oštećuju DNK.

UMAG_05938, identifikovan je kao „Pirin-like“ protein iz kupin superfamilije. Ova superfamilija je jedna od funkcionalno najraznovrsnijih proteinskih familija koje su do danas identifikovane uključujući metal-vezujuće enzime, proteine za skladištenje rezervnih materija u sjemenu, proteine koji vezuju šećere, šećerne izomerase, kao i druge metal-zavisne enzime sa katalitičkom aktivnošću. Pirinu slični proteini su veoma konzervirana grupa proteina koja je široko rasporstana među skoro svim biološkim carstvima, ali je interesantno da ne postoje kod *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* [100]. Do ovog istraživanja UMAG_05938 nije imao opisanu funkciju, tako da je ovdje prvi put pružen uvid o njegovoj uključenosti u biološke procese i to specifično njegov doprinos oporavku i rastu *U. maydis* ćelija u RUS supstratima. Međutim, biće važno nastaviti istraživanja na ovom ćelijskom faktoru da bi se precizno odredio biohemijski mehanizam njegovog djelovanja unutar ovog procesa kao i definisale druge uloge koje ovaj protein može da vrši u *U. maydis*. Uzimajući u obzir već pomenuto odsustvo ovog tipa proteina kod *S. cerevisiae* kao i značajno slabiji rast ovog organizma u RUS uslovima [34], bilo bi interesantno ispitati heterolognu ekspresiju ovog gena u kvascu te ustanoviti da li bi prisustvo ovog proteina u ćeliji kvasca doprinijelo uspješnijem oporavku u navedenim uslovima.

Ključni nalaz koji je zahtijevao posebnu pažnju u ovoj studiji odnosi se na gen UMAG_05976. Naime, analiza transkriptoma ćelija koje su rasle u RUS uslovima pokazala je da rast u 0,7% PT-SN indukuje ekspresiju većeg broja gena čiji proteinski produkti nemaju značajnu sličnost sa proteinima izvan vrste *Ustilago maydis*. Zbog odsustva prepoznatljivih homolognih sekvenci i funkcionalnih domena, ovi geni su anotirani kao geni nepoznate funkcije i mogu se svrstati u tzv. siročad (engl. „orphan“) gene. Karakteristično je da većina ovih otvorenih okvira čitanja sadrži informaciju za protein često kraći od 150 aminokiselina, što otvara pitanje da li svi predstavljaju gene ili su dijelom rezultat ograničenja bioinformatičkih metoda predikcije. Ipak, među njima postoje i izuzeci koji posjeduju znatno duže sekvence, što ih čini pogodnijim kandidatima za funkcionalnu analizu.

Upravo je zbog toga gen UMAG_05976 predstavljao posebno interesantan cilj istraživanja, jer za razliku od većine prethodno analiziranih, nije postojala jasna indikacija njegove potencijalne uloge u ćeliji. *In silico* analiza pokazala je da njegovi homolozi ne postoje izvan grupe gljiva garežnica. Dodatno, BLASTP pretraga je otkrila da samo mali broj vrsta unutar ove grupe posjeduje proteine sa značajnom sličnošću sa aminokiselinskom sekvencom ovog proteina, pri čemu je visok stepen sličnosti duž čitave sekvence uočen samo kod jedne do sada sekvencirane vrste. Ovakva ograničena filogenetska distribucija sugerše da ovaj gen vjerovatno pripada grupi evolutivno mladih ili filogenetski usko ograničenih (engl. „lineage-specific“) gena, koji se često označavaju kao tzv. geni siročad (engl. „orphan“).

Da bi se ispitala funkcionalna uloga ovog gena, konstruisan je delecioni mutant. Eksperimentalni rezultati su pokazali da njegova inaktivacija dovodi do izrazito snažnog RUS defektnog fenotipa, praćenog takođe izraženom osjetljivošću na sve testirane genotoksične agense [101]. Mutant je pokazao potpunu nesposobnost rasta u RUS supstratima pri svim ispitivanim gustinama inokuluma, što jasno ukazuje na to da ovaj gen predstavlja stvaran i biološki značajan faktor u ćeliji *U. maydis*.

Ovi rezultati takođe sugerišu da U_{MAG_05976} zauzima važno mjesto na presjeku procesa obnove populacije nakon stresa i mehanizama očuvanja genomske stabilnosti.

Međutim, činjenica da ovaj gen ne kodira za prepoznatljive proteinske domene niti ima široko rasprostranjene homologe, ukazuje da će određivanje njegove tačne molekularne funkcije vjerovatno predstavljati značajan eksperimentalni izazov. Ipak, kada ovakvi filogenetski usko ograničeni geni ispoljavaju jasan fenotip povezan sa reparacijom DNK - kao u slučaju U_{MAG_05976} - njihova funkcionalna karakterizacija postaje znatno pristupačnija. Naime, iako je ovaj gen identifikovan kroz analizu RUS fenotipa, izražen defekt u odgovoru na genotoksične agense ukazuje da njegova primarna funkcija može biti bliže povezana sa opštim mehanizmima održavanja genomske stabilnosti. Ova okolnost može predstavljati važnu metodološku prednost za buduća istraživanja, jer su putevi odgovora na oštećenja DNK znatno bolje okarakterisani od molekularnih mehanizama koji stoje u osnovi RUS fenomena. Stoga bi naredni koraci u funkcionalnoj karakterizaciji ovog faktora mogli uključivati najprije analizu epistatičkih interakcija sa ključnim genima za poznate puteve reparacije DNK. Takav pristup mogao bi omogućiti pozicioniranje ovog faktora unutar postojećih mreža odgovora na oštećenja genoma, dok bi potvrda funkcionalnih interakcija otvorila mogućnost daljih istraživanja fizičkih interakcija i identifikacije potencijalnih proteinskih partnera. Najzad, imajući u vidu izuzetnu otpornost *U. maydis* na UV i gama zračenje [102], moguće je da upravo ovakvi evoluciono specifični geni doprinose jedinstvenim adaptivnim osobinama ove vrste. Njihova dalja analiza stoga bi mogla pružiti nove uvide u molekularne mehanizme koji stoje u osnovi izuzetne otpornosti ove gljive na genotoksični stres.

Uprkos činjenici da je transkriptomaska analiza omogućila identifikaciju nekoliko biološki značajnih gena uključenih u RUS, važno je naglasiti da ovaj pristup sam po sebi ne predstavlja najpouzdaniji način za identifikaciju faktora čija bi inaktivacija dovela do jasno uočljivih fenotipskih promjena. U ovoj disertaciji analizirano je sedam gena sa povišenom ekspresijom tokom rasta na RUS supstratima u poređenju sa rastom u kontrolnom medijumu, ali je delecija samo tri od njih rezultirala izraženim efektom na rast mutanata. Dodatno, relativni nivoi ekspresije unutar analizirane grupe gena nisu pokazali jasnu korelaciju sa efektom na RUS fenotip nakon njihove inaktivacije. Jedno od vjerovatnih objašnjenja za ovakav rezultat jeste postojanje dodatnih nivoa regulacije genske aktivnosti, uključujući posttranskripcione i posttranslacione mehanizme koji mogu značajno uticati na konačni funkcionalni ishod u ćeliji. Pored toga, funkcionalna redundancija između različitih ćelijskih faktora može dovesti do djelimične ili potpune kompenzacije gubitka pojedinih proteina, čime se maskira direktan fenotipski efekat njihovog nedostatka.

UV mutageneza, kao drugi pristup korišten u okviru ove disertacije za identifikaciju novih RUS faktora, nema navedene nedostatke transkriptomskog pristupa. Ipak, riječ je o neciljanom, te samim time manje sistematičnom pristupu koji u osnovi zavisi od slučajnosti, jer se inaktivacija gena u genomu dešava nasumično, zbog čega geni veće dužine imaju veću vjerovatnoću da budu pogođeni inaktivirajućim mutacijama. Još jedan nedostatak je to što esencijalni geni često mogu biti izostavljeni. Takođe, s obzirom na to da se geni uključeni u RUS identifikuju detektovanjem mutacija koje dovode do gubitka funkcije, malo je vjerovatno da će biti prepoznati geni sa redundantnim funkcijama.

Uprkos tome, postoje jasne prednosti. Prije svega, ključna prednost ovog pristupa leži u tome što se mogu otkriti geni koji se konstitutivno eksprimiraju. Još jedna prednost je to što mutacione promjene obično dovode do pouzdanih fenotipskih promjena pogodnih za kvantitativnu analizu. Jasno je da u osnovi ove prednosti leži sam način selekcije kandidata. Najzad, uzročno-posljedična veza između mutacije i fenotipa može preliminarno ukazati čak i na mehanizam djelovanja proteina divljeg tipa.

Primjenom ovog pristupa identifikovana su četiri nova faktora uključena u RUS i očuvanje genomske stabilnosti: *Leu4*, *Myo2*, *Lec1* i *Usp1*. Svaki od ovih faktora pokazao je različit stepen

osjetljivosti na više agenasa koji izazivaju DNK oštećenja ili replikativni zastoj, kao i izraženu nesposobnost korišćenja RUS supstrata. Posebno izraženi fenotipovi uočeni su kod *lec1* i *usp1* mutanata. Naime, *lec1* mutant je pokazivao izraženu osjetljivost na UV zračenje i izuzetnu osjetljivost na replikativni stres izazvan hidroksiureom (HU), dok je *usp1* mutant ispoljavao najizrazitiji fenotip u pogledu osjetljivosti na genotoksične agense, što ukazuje na važnu ulogu ovog proteina u održavanju genomske stabilnosti.

Mutacija u genu *Leu4*, koji kodira izopropilmalat sintazu i katalizuje prvi korak u biosintezi leucina, može imati šire metaboličke posljedice koje prevazilaze auktrofiju za ovu aminokiselinu. Leucin je poznat kao važan signal nutrijentnog statusa u ćeliji i jedan od ključnih aktivatora TORC1 signalnog puta, centralnog regulatora ćelijskog rasta i odgovora na stres [103,104]. Stoga poremećaj u biosintezi leucina može uticati na pravilnu regulaciju TOR signalizacije čak i u uslovima kada je leucin dostupan iz spoljašnje sredine, jer metabolički tok kroz put biosinteze može imati regulatorni značaj nezavisan od same koncentracije ove aminokiseline. U skladu s tim, pokazano je da enzimi uključeni u metabolizam razgranatih aminokiselina mogu modulirati TORC1 aktivnost putem promjena u metaboličkom toku i energetsom statusu ćelije [105], dok novija istraživanja ukazuju da je biosinteza ovih aminokiselina povezana sa regulacijom TORC1 tokom progresije ćelijskog ciklusa [106]. TOR signalizacija je, pored regulacije rasta i translacije, povezana i sa odgovorom na oštećenja DNK i tolerancijom na replikativni stres. Dodatno, reakcija koju katalizuje *Leu4* koristi acetyl-CoA kao supstrat, što potencijalno povezuje metabolizam leucina sa unutarćelijskim pulom acetyl-CoA i procesima poput histonske acetilacije koja utiče na strukturu hromatina i regulaciju ekspresije gena uključenih u popravku DNK [107]. U tom kontekstu, povećana osjetljivost *leu4* mutanata na genotoksične agense može odražavati složen uticaj poremećenog metabolizma leucina na nutrijentno signaliziranje, metaboličku homeostazu i mehanizme očuvanja genomske stabilnosti. Istovremeno, zanimljivo je da geni uključeni u biosintezu leucina do sada nisu bili direktno povezivani sa procesima popravke DNK, što ukazuje na mogućnost postojanja indirektnih ili do sada neprepoznatih veza između metaboličkog statusa ćelije i odgovora na oštećenja genoma.

Ono što je dodatno interesantno za ovaj ćelijski produkt kod *U. maydis* jeste da gen koji ga kodira postoji samo u jednoj kopiji u genomu, za razliku od *S. cerevisiae*, kod kojeg su prisutne dvije kopije ovog gena. U budućim istraživanjima bilo bi značajno usmjeriti pažnju na razjašnjavanje konkretnih mehanizama putem kojih inaktivacija ovog gena može dovesti do smanjenja efikasnosti popravke DNK, s obzirom na to da dostupna naučna literatura trenutno ne pruža jasno eksperimentalno objašnjenje za ovu pojavu.

Mutacije identifikovane u genima *Myo2*, *Lec1* i *Usp1* ukazuju da operativnost RUS-a zavisi ne samo od metaboličkih i regulatornih faktora, već i od pravilnog funkcionisanja sistema uključenih u unutarćelijski transport, organizaciju membrana i regulaciju proteinske stabilnosti. Protein *Myo2*, pripadnik klase V miozina, predstavlja motorni protein koji posreduje u transportu vezikula i organela duž aktinskih filamenata i ključan je za polarizovani rast ćelije [81,82]. Iako ovaj protein ranije nije bio direktno povezivan sa procesima popravke DNK ili zaštite genoma, osjetljivost *myo2* mutanta na genotoksične agense sugerise da unutarćelijski transport i dinamika vezikula mogu imati indirektnu, ali važnu ulogu u ćelijskom odgovoru na DNK oštećenja. U uslovima RUS-a, gdje ćelije moraju brzo reorganizovati svoj metabolizam i prilagoditi se rastu u kompleksnom okruženju nastalom nakon intenzivnog stresa, efikasan vezikularni transport može biti od presudnog značaja za pravilnu distribuciju membranskih komponenti, transportnih sistema i faktora uključenih u odgovor na stres.

Protein *Lec1*, koji sadrži PX domen i uključen je u održavanje lipidne homeostaze i organizacije membrana [83], dodatno podržava ovu hipotezu. PX domeni omogućavaju specifično vezivanje fosfoinozitida i ciljano lokalizovanje proteina na određenim membranskim odjeljcima, što sugerise da *Lec1* može učestvovati u organizaciji membranskih platformi važnih za signalizaciju i transport proteina uključenih u stresni odgovor. Do sada je pokazano da Δ *lec1* mutant kod *S. cerevisiae* pokazuje povećanu osjetljivost na antifungalni agens amphotericin B, koji djeluje interakcijom sa

ergosterolom u plazma membrani, što dodatno ukazuje na ulogu ovog proteina u održavanju lipidne homeostaze membrana [83]. Naši rezultati proširuju funkcionalni profil ovog proteina i otvaraju pitanje mehanizma putem kojeg *Lec1* može doprinositi očuvanju genomske stabilnosti.

Treći identifikovani faktor, *Usp1*, pripada porodici ubiquitin-specifičnih proteaza koje uklanjanjem ubiquitinskih lanaca sa ciljnih proteina regulišu njihovu stabilnost, lokalizaciju i funkciju [84]. Članovi ove porodice proteina široko su uključeni u regulaciju odgovora na oštećenja DNK i održavanje genomske stabilnosti, prije svega modulacijom ubikvitinacije histona, remodelovanja hromatina, kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa i preko stabilizacije faktora uključenih u popravku DNK [84,108]. U skladu sa ovim funkcijama, izražena osjetljivost *usp1* mutanta na različite genotoksične agense ukazuje da ovaj protein vjerovatno učestvuje u regulaciji mehanizama koji doprinose očuvanju genomske stabilnosti tokom stresnih uslova.

Interesantno je da su u prethodnim analizama kao faktori važni za efikasan RUS i otpornost na genotoksični stres identifikovani i proteini *Did4* (*Vps2*) i *Snf8* (*Vps22*), komponente ESCRT sistema (engl. „Endosomal Sorting Complex Required for Transport“) uključenog u endozomalno sortiranje proteina i dinamiku vezikularnog transporta. U tom kontekstu, identifikacija gena *Myo2* i *Lec1* dodatno ukazuje na potencijalnu ulogu procesa vezanih za remodelovanje membrana, vezikularni transport i organizaciju endomembranskog sistema u adaptaciji ćelija na stresne uslove. Zanimljivo je i da je u kvascu deubikvitinaza *Doa4* (*Ubp4*) funkcionalno povezana sa komponentama ESCRT sistema [109], što otvara mogućnost da slična veza između *Usp1* i ESCRT puta može postojati i u *U. maydis*.

Posmatrano zajedno, funkcije ovih proteina ukazuju na potencijalnu zajedničku ulogu procesa vezanih za endomembranski transport, organizaciju membrana i regulaciju metabolizma proteina u omogućavanju uspješnog rasta u RUS uslovima. U okruženju koje sadrži produkte intenzivnog oksidativnog i genotoksičnog stresa, ćelije vjerovatno moraju brzo reorganizovati svoj proteom, uklanjati oštećene proteine i efikasno redistribuirati ključne komponente ćelijskog aparata. U tom kontekstu, poremećaji u unutarćelijskom transportu, organizaciji membrana ili ubikvitin-zavisnoj regulaciji proteinske stabilnosti mogli bi značajno kompromitovati sposobnost ćelije da održi genomsku stabilnost i istovremeno se prilagodi rastu u RUS sredini. Ovi rezultati stoga dodatno podržavaju ideju da mehanizmi koji omogućavaju obnovu populacije u RUS uslovima obuhvataju integrisanu mrežu procesa koja uključuje ne samo kanonične puteve popravke DNK, već i sisteme koji kontrolišu organizaciju ćelije i održavanje proteinske homeostaze tokom stresnog odgovora.

Do sada predstavljeni rezultati ukazuju da uspješna repopulacija nakon katastrofalnog gubitka vijabilnosti ne zavisi isključivo od sposobnosti ćelija da iskoriste nutrijente oslobođene iz oštećenih ćelija, već i od njihove sposobnosti da se prilagode kompleksnom i toksičnom okruženju koje nastaje nakon intenzivnog stresa. Identifikacija faktora uključenih u održavanje genomske stabilnosti, metabolizam, unutarćelijski transport i homeostazu proteina sugerise da RUS predstavlja integrisan adaptivni proces u kojem se metabolička reorganizacija i mehanizmi odgovora na stres prepliću kako bi omogućili oporavak populacije. U tom kontekstu, sposobnost ćelija da održe genomsku stabilnost i pravilnu organizaciju ćelijskih funkcija može predstavljati jedan od ključnih preduslova za uspješan oporavak populacije u sredini nakon stresa. Jasno je da precizno definisanje funkcija novootkrivenih faktora u RUS-u zahtijeva intenzivna istraživanja i akumulaciju brojnih eksperimentalnih podataka. Neophodan preduslov iscrpne analize je sigurno i precizno određivanje hemijske prirode genotoksičnih molekula. Ostaje otvoreno pitanje da li su još neki od filogenetski usko ograničenih gena uključeni u RUS i zaštitu genoma.

5.2 Biološki značaj programirane ćelijske smrti za oporavak populacije nakon stresa

Već je nekoliko puta naglašena potreba da se fenomen RUS-a koncipira kao integralan proces koji obuhvata dva osnovna aspekta: ćelijsku samorazgradnju i recikliranje nutrijenata. Iako su ova

dva aspekta različita, oni su čvrsto povezani krajnjim produktima ćelijske dekompozicije - mikrobnim molekulima koji omogućavaju ponovni rast i reprodukciju preživjelih ćelija. Isto je tako istaknuto da u mjeri u kojoj se proces ćelijske razgradnje odvija aktivno (autolitički), preživjele ćelije ostvaruju nutritivnu korist od liziranih ćelija, istovremeno izbjegavajući metabolički trošak sinteze sopstvenih hidrolitičkih enzima koji bi im inače bili neophodni za pribavljanje nutrijenata iz dostupne nekromase. Pored toga, potrebno je u cilju dalje diskusije uzeti u obzir i uvid da ukupni nutritivni kvalitet materijala oslobođenog iz umirućih ćelija zavisi od prirode i intenziteta stresa, kao i od specifičnog načina ćelijske smrti.

Prije svega, važna je činjenica da se najpovoljniji nutrijenti oslobađaju iz ćelija koje umiru aktivno, genetički programiranom smrću, što sugerise da ovaj tip smrti može imati ključnu ulogu u oblikovanju energetsko-metaboličkog okruženja dostupnog preživjelim ćelijama. Ovo zapažanje dotiče dugogodišnje pitanje evolucije PCD u jednoćelijskim organizmima, gdje smrt ćelije istovremeno znači i smrt jedinke, čime se isključuje mogućnost direktne selekcije za bilo koju osobinu, uključujući i sam PCD. Ipak, sve je veći broj eksperimentalnih podataka [42,46,110], koji ukazuju na to da PCD kod jednoćelijskih organizama može imati adaptivni karakter, u smislu da preživjele ćelije ostvaruju korist od biomolekula oslobođenih iz umirućih ćelija. U tom smislu, PCD se može posmatrati kao efikasan mehanizam altruističkog „prenosa fitnesa“ na preživjele srodne jedinke ili članove iste grupe [40]. Novija istraživanja koja kombinuju matematičko modeliranje i eksperimentalne podatke pokazuju da scenario u kome se fiziološki normalne ćelije žrtvuju ne može biti evolutivno održiv, već se za objašnjenje evolucije PCD-a postulira sposobnost oštećenih ili fiziološki kompromitovanih ćelija da prepoznaju predstojeću smrt i preventivno odgovore usmjeravajući nadolazeću smrt ka njenoj aktivno regulisanoj formi [32]. Na osnovu analize primjera iz literature moguće je pretpostaviti da se ovakav odgovor razvio kako bi se smanjilo rasipanje resursa, kako bi se razgradnja intracelularnih komponenti odvijala na način koji sprečava nekrotičnu toksičnost i, sa druge strane, radi obezbjeđivanja korisnim hranljivih materija preživjelim srođnicima, i da bi se oslobodila jedinjenja koja djeluju protiv kompetitora [32]. Stoga, PCD može predstavljati ne samo altruističku adaptaciju koja obezbjeđuje nutritivne koristi preživjelim članovima grupe, već i mehanizam koji redukuje kolateralnu štetu za srođnike.

Ova razmatranja se mogu primijeniti i na fenomen suicidalne smrti izazvane samogenerisanom hipoksijom. U SGH uslovima stresirane ćelije i pokreću PCD mehanizme kako bi oslobodile korisne molekule. Time se izbjegavaju nekrotični procesi i stvaranje štetnih molekula koji bi preživjelim ćelijama ometale rast i reprodukciju. Zaista, u poređenju sa efektima rasta u prisustvu ćelija koje su umrle nekrotično, i SGH-CS i SGH-SN su pokazali znatno povoljnije efekte. Pored toga, inokulumi uzgajani u SGH-CS proliferirali su jednako brzo i intenzivno kao i oni u SGH-SN, što ukazuje na to da ukupna nekromasa nastala tokom PCD-a ne bi predstavljala dodatno toksično opterećenje za preživjele ćelije.

Međutim, ovdje je od posebnog značaja novi nalaz da produkti PCD-a mogu stimulisati rast čak i u prisustvu nekromase nastale nekrotičnim procesima [111]. Razmjere ovog stimulatornog potencijala mogu se naslutiti iz činjenice da u testiranim uslovima SGH-SN ne samo da omogućuje preživljavanje nego je u stanju da podspješi proliferaciju čak i pri početnom odnosu živih prema mrtvim ćelijama od 1:10⁵. Ovaj uvid ima značajne ekološke implikacije kada se razmatra PCD kao potencijalna adaptivna strategija mikroorganizama u uslovima promjenljivih i nepovoljnih sredina.

Postoji nekoliko razloga zbog kojih je ovaj nalaz posebno značajan. Prvo, mikroorganizmi su u prirodnim staništima redovno izloženi različitim stresovima koji se razlikuju po tipu i intenzitetu. Ovi stresovi mogu djelovati istovremeno ili ciklično, dodatno povećavajući izazove sa kojima se već stresirane ćelije suočavaju i doprinoseći varijabilnosti ishoda. Drugo, brojni eksperimenti su pokazali da intenzitet i tip stresa određuju način ćelijske smrti [37,44,112]. Tako ćelije izložene stresu nižeg intenziteta češće umiru putem programirane ćelijske smrti, dok stresovi većeg intenziteta dovode do nekrotične smrti. Treće, intenzitet stresa ne utiče samo na tip ćelijske smrti već i na toksičnost molekula koji se oslobađaju tokom ovog procesa [1]. Uzimajući u obzir ove

činjenice, kao i realnu pretpostavku da u prirodnom staništu stresovi nisu ravnomjerno raspoređeni, može se očekivati da populacije neće biti uniformno stresirane. U okviru iste populacije mogu se, dakle, simultano javiti različiti oblici ćelijske smrti, što posljedično dovodi do nastanka nekromasa različitog sastava i nutritivne vrijednosti.

Uzimajući sve ovo u obzir, nalaz da supstrati generisani tokom PCD-a mogu efikasno neutralisati inhibitorne efekte nekromase nastale ne-PCD procesima ukazuje na to da će oporavak populacije nakon katastrofalnih događaja u presudnoj mjeri zavisiti od zastupljenosti ćelija koje su umrle putem programirane ćelijske smrti.

Pored toga, efikasnost rasta u prisustvu nekromase nastale nekrotičnom smrću direktno je povezana sa gustom početnog inokuluma [1,87,88]. U kontekstu masovnog gubitka vijabilnosti, dostupnost povoljnih nutrijenata nastalih tokom PCD može biti presudna za inicijalni oporavak populacije. Drugim riječima, prisustvo nutritivno povoljnih PCD supstrata omogućava preživjelim ćelijama da započnu rano umnožavanje čak i u sredini bogatoj nekrotičnom nekromasom. Kako se populacija oporavlja i povećava brojnost, njena sposobnost da koristi manje povoljne izvore nutrijenata srazmjerno raste. Dakle, iz ekološke perspektive, PCD se stoga može posmatrati kao važna adaptacija koja povećava fitnes populacije, naročito u ranim fazama post-stresnog oporavka. Ovakvo tumačenje bi bilo u skladu sa nalazima da povećana stopa PCD može ubrzati oporavak populacije kod nekih mikroalgi izloženih osmotskom stresu [113].

Dalje razumijevanje ovog procesa vjerovatno će biti moguće tek nakon identifikacije molekularne prirode glavnih PCD-derivata koji pospješuju rast. Do sada je učinjeno veoma malo napora u tom pravcu. U tom kontekstu interesantna je pretpostavka da bi mikrovezikule mogle služiti kao sistem za dostavljanje korisnih molekula [50].

Rezultati ovde prikazanih preliminarnih istraživanja pokazali su da frakcija SGH-SN koja sadrži molekule čija je masa manja od 100 kDa predstavlja glavnog nosioca nutritivnog potencijala, što sugerise da dostupnost korisnih nutrijenata u *U. maydis* vjerovatno ne zavisi presudno od prisustva supramolekularnih struktura. S druge strane, iako je u ovom radu, kao i istraživanjima drugih autora pokazano da termički tretman ne utiče značajno na sposobnost ovih materijala da stimuliraju rast [45], ipak je primijećen izražen uticaj termičke obrade na sposobnost <100 kDa filtrata da podstiče rast pri visokim gustinama PT ćelija. Dok je ovaj efekat termičkog tretmana izostao kada je u pitanju frakcija veća od 100 kDa, termička obrada frakcije veće od 100 kDa je čak rezultirala nešto bržim oporavkom populacije nakon 72 h. Ovo ukazuje na to da frakcija veća od 100 kDa može posjedovati određena svojstva koja štite termolabilne molekule, ili da su molekuli prisutni u toj frakciji po svojoj prirodi termostabilni. Da li je ovaj efekat zaista biološki relevantan ostaje pitanje za buduća istraživanja.

Na osnovu prethodnih istraživanja testirano je i da li materijali oslobođeni tokom SGH kod *U. maydis* stimuliraju isključivo rast ćelija te vrste. U tu svrhu analiziran je njihov efekat na dvije srodne vrste iz iste porodice *Ustilaginaceae* - *S. reilianum* i *S. scitamineum*. Rezultat je bio negativan u smislu stroge specifičnosti. Organska jedinjenja oslobođena tokom PCD kod *U. maydis* takođe su podsticala rast ovih blisko srodnih vrsta. Ovo se razlikuje od rezultata dobijenih kod *C. reinhardtii* i *A. densus*, gdje su pozitivni efekti PCD produkata bili ograničeni na vrstu koja ih je generisala [30,50]. Međutim, dok se ne sprovedu dodatna istraživanja koja bi procijenila odnos između filogenije i djelovanja PCD materijala vrste *U. maydis* na široj taksonomskoj skali, dalje tumačenje ovih razlika bilo bi preuranjeno. Najviše što se za sada može reći jeste da su, za razliku od akvatičnih algi, sve tri vrste iz porodice *Ustilaginaceae* terestrični paraziti, vjerovatno oblikovani drugačijim ekološkim ograničenjima.

Međutim, iz navedenih poređenja je proizašlo još jedno važno zapažanje. Pri izlaganju rastućim koncentracijama PT ćelija, *U. maydis* je pokazao, u poređenju sa svojim bliskim srodnicima, znatno veću sposobnost da toleriše inhibitorne efekte nekromase nastale ne-PCD putem. U ranijoj komparativnoj studiji i *U. maydis* i *S. cerevisiae* su bili sposobni da obnove populacije nakon

snažnog oksidativnog stresa, ali je *U. maydis* pokazao i veći stepen i veću brzinu ponovnog rasta [34]. Posmatrano iz perspektive ekološkog fitnesa, ove osobine zajedno mogu *U. maydis* obezbijediti značajnu kompetitivnu prednost.

Pored centralnih nalaza ovog rada, važno je istaći i dodatna zapažanja koja imaju potencijalni metodološki i konceptualni značaj. Naime, rezultati dobijeni upotrebom auktotrofnog soja UCM350, nesposobnog da sintetiše koenzim A, ukazuju na to da bi se ovaj soj mogao koristiti kao funkcionalni bioesej za procjenu kvaliteta supstrata oslobođenih iz umirućih ćelija nakon djelovanja različitih tipova stresa. U tom smislu, sposobnost preživjelih ćelija da obnove populaciju može poslužiti kao indirektan pokazatelj očuvanosti ključnih metaboličkih resursa u post-stresnom okruženju. Vrijednost soja UCM350 testirana je primjenom dva složena, ekološki relevantna stresna modela - desikacije i ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. U ovim uslovima efekti stresa nisu linearni niti određeni jednim parametrom, već zavise od kombinovanog djelovanja više faktora, uključujući trajanje tretmana, broj ciklusa i dinamiku procesa. Izbor ovih stresora zasnovan je na prethodnim nalazima koji ukazuju na povezanost između intenziteta stresa i nivoa oporavka soja UCM350, odnosno dostupnosti CoA-resursa u oslobođenim supstratima, te omogućava procjenu funkcionalnosti ovog soja u kompleksnijim, višefaznim stresnim uslovima.

Oba stresora uključuju ograničenje dostupnosti vode: desikacija dovodi do direktnog gubitka vode iz ćelije, dok zamrzavanje uzrokuje dehidraciju usljed formiranja kristala leda, pri čemu voda postaje funkcionalno nedostupna. Pored toga, efekti stresa ne završavaju se tokom faze dehidratacije, već se nastavljaju tokom rehidratacije, kada dolazi do osmotskih promjena, destabilizacije membrana i poremećaja ćelijske homeostaze [114], što može uticati na kvalitet biomolekula oslobođenih iz oštećenih ili mrtvih ćelija.

Rezultati dobijeni u uslovima desikacije ukazuju na potrebu daljeg razjašnjenja prirode nastalih oštećenja, odnosno da li se prvenstveno radi o oštećenjima genoma ili i o drugim tipovima ćelijskih oštećenja u čijoj popravci učestvuje pantotemat.

Posebno je značajno da dobijeni rezultati ukazuju na važnost koenzima A (CoA) i njegovih prekursora, ne samo u kontekstu podrške proliferaciji, već i kao faktora koji utiče na efikasnost unutarćelijske reparacije. U tom smislu, dostupnost CoA može predstavljati jednu od ključnih determinanti uspješnog oporavka populacije nakon izlaganja različitim stresnim uslovima.

Stoga, koenzim A se može posmatrati kao potencijalni indikator koji povezuje tip i intenzitet stresa sa kvalitetom oslobođenih supstrata i ishodom ćelijske smrti. Dalja istraživanja bi mogla razjasniti da li ovaj odnos predstavlja opšti princip ili specifičnost eksperimentalnog sistema korišćenog u ovom radu.

Najzad, ne treba posebno isticati koliko pojedine hipoteze, za svoju potpunu verifikaciju zahtijevaju detaljnih i raznovrsnih analiza. Sigurno da je od najneposrednijeg značaja determinisanje prirode i uloge stimulatornih komponenti PCD supstrata. Takođe, poseban intelektualni izazov predstavlja puno razumijevanje altruističkog karaktera PCD-a. Čini se jasnim da ova forma umiranja dobija svoj puni biološki smisao ako su produkti ove smrti generisani i zaista dopremani prvenstveno predstavnicima iste vrste. Samo buduća istraživanja i detaljne analize mogu nam s preciznošću reći da li je ova pretpostavka validna.

6 Zaključci

1. Biomolekuli oslobođeni iz ćelija umrlih nekrozom ostvaruju pored citotoksičnih i genotoksične efekte na preživjele ćelije.
2. Pokazano je da su funkcije faktora uključenih u očuvanje genomske stabilnosti - Atr1, Rec1 i Dss1 - od presudnog značaja za sposobnost ćelija *U. maydis* da koriste supstrate oslobođene iz stresom ubijenih ćelija (engl. "Repopulation upon shattering" (RUS)) i obnove populaciju. Na osnovu njihovih poznatih funkcija, može se tvrditi da Atr1 i Rec1 ovaj efekat najverovatnije ostvaruju kroz regulaciju ćelijskog ciklusa i modulaciju aktivnosti nizvodnih faktora uključenih u popravku DNK oštećenja. Budući da Brh2 ne igra ključnu ulogu u RUS-u, nameće se zaključak da svoj bitan uticaj u obnovi populacije Dss1 primarno ostvaruje preko svoje uloge u održavanju homeostaze proteina.
3. Kombinovanim metodološkim pristupima (primjenom transkriptomike, generisanja delecionih mutanata i nasumične mutageneza ćelija divljeg soja) identifikovano je 7 novih faktora (Ndx1, Pir1, Rdf1, Leu4, Myo2, Lec1 i Usp1) koji učestvuju u RUS-u. Od ovih 7 ćelijskih faktora, 5 (Rdf1, Leu4, Myo2, Lec1 i Usp1) igra značajnu ulogu u očuvanju genomske stabilnosti. Identifikovani faktori imaju poznate uloge u ćelijским procesima: uklanjanja oksidovanih nukleotida, biosinteze leucina, održavanju lipidne homeostaze i organizacije membrana, formiranju citoskeletnih elemenata, regulaciji ubikvitinacije histona, remodelovanju hromatina, toleranciji na replikativni stres, regulaciji kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa i stabilizaciji faktora uključenih u popravku DNK. Iz dobijenih rezultata jasno sledi da je za uspješan RUS neophodna kompleksna mreža unutarćelijskih faktora, da su procesi obnove populacija pri RUS uslovima spregnuti sa procesima koji doprinose očuvanju integriteta genoma i da pojedini faktori koji povezuju ove procese ne pripadaju kanoničnim putevima reparacije DNK lezija.
4. Činjenica da se novootkriveni ćelijski faktor **Rdf1** pokazao kao izuzetno važan i za RUS i za održavanje genomske stabilnosti, sugerise mogućnost da izrazitoj rezistentnosti ćelija *U. maydis* na UV i jonizujuća zračenja svoj doprinos daju i faktori koji imaju vrlo ograničenu filogenetsku distribuciju. Ovo otkriće naglašava potrebu da se u budućim istraživanjima ispita uloga i drugih pretpostavljenih gena iz iste kategorije.
5. Pokazano je da koenzim A predstavlja ključni faktor koji utiče na uspješnost oporavka populacije u RUS uslovima, pri čemu njegov nedostatak dovodi do dodatnog post-stresnog umiranja, do neprecizne popravke DNK oštećenja i može biti indikator vrste ćelijske smrti koja prethodi oslobađanju biomolekula.
6. Pokazano je da samogenerisana hipoksija kod *U. maydis* indukuje programirano ćelijsko umiranje čiji produkti omogućavaju efikasan rast, ali i prevazilaženje negativnih efekata koje ispoljavaju produkti nekrotične smrti. Ovaj nalaz ukazuje na to da će oporavak populacije nakon katastrofalnih događaja u presudnoj mjeri zavisiti od zastupljenosti ćelija koje su umrle putem programirane ćelijske smrti. Prema tome, PCD se može posmatrati kao važna adaptacija koja povećava fitnes populacije, naročito u ranim fazama post-stresnog oporavka.

7. Produkti programirane ćelijske smrti ispoljavaju korisne efekte koji nisu ograničeni samo na *U. maydis*, već se protježu i na dvije vrlo srodne vrste - *Sporisorium scitamineum* i *Sporisorium reilianum*. Ovaj nalaz se ne podudara sa rezultatima dobijenim kod nekoliko vrsta mikroalgi, te zahtjeva dodatna istraživanja uključujući bazidiomicete koje su filogenetski udaljenije nego što su ispitivane vrste *Sporisorium*-a.

7 Literatura

- [1] Milisavljevic M, Petkovic J, Samardzic J, Kojic M. Bioavailability of Nutritional Resources From Cells Killed by Oxidation Supports Expansion of Survivors in *Ustilago maydis* Populations. *Front Microbiol* 2018;9:990. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00990>.
- [2] Steinberg G, Perez-Martin J. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* 2008;18:61–7. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.11.008>.
- [3] Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, Kahmann R. *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* 2009;47:423–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081923>.
- [4] Stukenbrock EH, McDonald BA. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu Rev Phytopathol* 2008;46:75–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.010708.154114>.
- [5] Holloman WK, Schirawski J, Holliday R. The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* 2008;45 Suppl 1:S31–39. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.04.006>.
- [6] Symington LS. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:630–70, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.4.630-670.2002>.
- [7] Kojic M, Kostrub CF, Buchman AR, Holloman WK. BRCA2 homolog required for proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell* 2002;10:683–91. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00632-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00632-9).
- [8] Kojic M, Yang H, Kostrub CF, Pavletich NP, Holloman WK. The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell* 2003;12:1043–9. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00367-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00367-8).
- [9] Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma L-J, Brefort T, Saville BJ, et al. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 2006;444:97–101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>.
- [10] Schimel J, Balser TC, Wallenstein M. Microbial Stress-Response Physiology and Its Implications for Ecosystem Function. *Ecology* 2007;88:1386–94. <https://doi.org/10.1890/06-0219>.
- [11] Bacterial Stress Responses | Wiley Online Books n.d. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1128/9781555816841> (accessed April 6, 2026).
- [12] Rothschild LJ, Mancinelli RL. Life in extreme environments. *Nature* 2001;409:1092–101. <https://doi.org/10.1038/35059215>.
- [13] Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>.
- [14] Nyström T. Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Mol Microbiol* 2004;54:855–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04342.x>.
- [15] Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:373–95, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.373-395.2002>.
- [16] Veening J-W, Smits WK, Kuipers OP. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2008;62:193–210. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163002>.
- [17] Kojic M, Milisavljevic M. When disaster strikes: Reconstitution of population density by expansion of survivors. *Mol Ecol* 2020;29:4757–64. <https://doi.org/10.1111/mec.15680>.

- [18] Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:548–72. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>.
- [19] Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 2006;101:514–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>.
- [20] Corliss JO. Biodiversity and Biocomplexity of the Protists and an Overview of Their Significant Roles in Maintenance of Our Biosphere n.d.
- [21] Berleman JE, Bauer CE. Characterization of cyst cell formation in the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Microbiology* 2004;150:383–90. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26846-0>.
- [22] Nicholson WL, Fajardo-Cavazos P, Rebeil R, Slieman TA, Riesenman PJ, Law JF, et al. Bacterial endospores and their significance in stress resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;81:27–32. <https://doi.org/10.1023/A:1020561122764>.
- [23] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711–45. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.
- [24] Berry DB, Gasch AP. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol Biol Cell* 2008;19:4580–7. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-07-0680>.
- [25] Mitchell A, Romano GH, Groisman B, Yona A, Dekel E, Kupiec M, et al. Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature* 2009;460:220–4. <https://doi.org/10.1038/nature08112>.
- [26] Simons AM. Modes of response to environmental change and the elusive empirical evidence for bet hedging. *Proc Biol Sci* 2011;278:1601–9. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0176>.
- [27] The SOS Response: A Double-Edged Sword between the Persister and Resister Formation | ACS Omega n.d. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.5c10078> (accessed April 27, 2026).
- [28] Pribis JP, Zhai Y, Hastings PJ, Rosenberg SM. Stress-Induced Mutagenesis, Gambler Cells, and Stealth Targeting Antibiotic-Induced Evolution. *mBio* 2022;13:e0107422. <https://doi.org/10.1128/mbio.01074-22>.
- [29] The Origin and Evolution of Programmed Cell Death - Ameisen - Major Reference Works - Wiley Online Library n.d. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0021988> (accessed April 6, 2026).
- [30] Durand PM, Choudhury R, Rashidi A, Michod RE. Programmed death in a unicellular organism has species-specific fitness effects. *Biol Lett* 2014;10:20131088. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.1088>.
- [31] Mason CA, Hamer G, Bryers JD. The death and lysis of microorganisms in environmental processes. *FEMS Microbiology Letters* 1986;39:373–401. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90024-8).
- [32] Van Dyken JD, Zee PC. Disentangling the Factors Selecting for Unicellular Programmed Cell Death. *Am Nat* 2024;204:468–81. <https://doi.org/10.1086/732199>.
- [33] Levy SF, Ziv N, Siegal ML. Bet hedging in yeast by heterogeneous, age-correlated expression of a stress protectant. *PLoS Biol* 2012;10:e1001325. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001325>.
- [34] Milisavljevic M, Kojic M. A comparative study of liquid holding restitution of viability after oxidative stress in *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae* cell populations. *Fungal Genet Biol* 2020;134:103284. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103284>.
- [35] Marks RA, Ekwealor JTB, Artur MAS, Bondi L, Boothby TC, Carmo OMS, et al. Life on the dry side: a roadmap to understanding desiccation tolerance and accelerating translational applications. *Nat Commun* 2025;16:3284. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58656-y>.

- [36] Carmona-Gutierrez D, Ruckenstuhl C, Bauer MA, Eisenberg T, Büttner S, Madeo F. Cell death in yeast: growing applications of a dying buddy. *Cell Death Differ* 2010;17:733–4. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.10>.
- [37] Madeo F, Fröhlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, et al. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 1999;145:757–67. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.757>.
- [38] Mukherjee D, Gupta S, Saran N, Datta R, Ghosh A. Induction of apoptosis-like cell death and clearance of stress-induced intracellular protein aggregates: dual roles for *Ustilago maydis* metacaspase Mca1. *Mol Microbiol* 2017;106:815–31. <https://doi.org/10.1111/mmi.13848>.
- [39] Soberanes-Gutiérrez CV, León-Ramírez C, Sánchez-Segura L, Cordero-Martínez E, Vega-Arreguín JC, Ruiz-Herrera J. Cell death in *Ustilago maydis*: comparison with other fungi and the effect of metformin and curcumin on its chronological lifespan. *FEMS Yeast Res* 2020;20:foaa051. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa051>.
- [40] Durand PM, Barreto Filho MM, Michod RE. Cell Death in Evolutionary Transitions in Individuality. *Yale J Biol Med* 2019;92:651–62.
- [41] Durand PM, Sym S, Michod RE. Programmed Cell Death and Complexity in Microbial Systems. *Curr Biol* 2016;26:R587–93. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.057>.
- [42] Durand PM, Ramsey G. The Nature of Programmed Cell Death. *Biol Theory* 2019;14:30–41. <https://doi.org/10.1007/s13752-018-0311-0>.
- [43] Nedelcu AM, Driscoll WW, Durand PM, Herron MD, Rashidi A. On the paradigm of altruistic suicide in the unicellular world. *Evolution* 2011;65:3–20. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01103.x>.
- [44] Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leão CL, Côrte-Real M. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology (Reading)* 2001;147:2409–15. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-9-2409>.
- [45] Durand PM, Rashidi A, Michod RE. How an organism dies affects the fitness of its neighbors. *Am Nat* 2011;177:224–32. <https://doi.org/10.1086/657686>.
- [46] Yordanova ZP, Woltering EJ, Kapchina-Toteva VM, Iakimova ET. Mastoparan-induced programmed cell death in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann Bot* 2013;111:191–205. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs264>.
- [47] Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Fröhlich K-U, Wissing S, et al. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 2004;164:501–7. <https://doi.org/10.1083/jcb.200310014>.
- [48] Vardi A, Eisenstadt D, Murik O, Berman-Frank I, Zohary T, Levine A, et al. Synchronization of cell death in a dinoflagellate population is mediated by an excreted thiol protease. *Environmental Microbiology* 2007;9:360–9. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01146.x>.
- [49] The demise of the marine cyanobacterium, *Trichodesmium* spp., via an autocatalyzed cell death pathway - Berman-Frank - 2004 - *Limnology and Oceanography* - Wiley Online Library n.d. <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.4319/lo.2004.49.4.0997> (accessed April 6, 2026).
- [50] Barreto Filho MM, Vieira HH, Morris JJ, Bagatini IL. Species-specific effects and the ecological role of programmed cell death in the microalgae *Ankistrodesmus* (Sphaeropleales, Selenastraceae). *Biol Lett* 2022;18:20220259. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0259>.
- [51] Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:563–75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.
- [52] Mustonen V, Lässig M. From fitness landscapes to seascapes: non-equilibrium dynamics of selection and adaptation. *Trends Genet* 2009;25:111–9. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.01.002>.
- [53] Ketola T, Mikonranta L, Zhang J, Saarinen K, Ormälä A-M, Friman V-P, et al. Fluctuating temperature leads to evolution of thermal generalism and preadaptation to novel environments. *Evolution* 2013;67:2936–44. <https://doi.org/10.1111/evo.12148>.

- [54] Ackermann M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:497–508. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3491>.
- [55] Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2004;305:1622–5. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>.
- [56] Van den Bergh B, Michiels JE, Wenseleers T, Windels EM, Boer PV, Kestemont D, et al. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence. *Nat Microbiol* 2016;1:16020. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.20>.
- [57] Bojsen R, Regenber B, Folkesson A. Persistence and drug tolerance in pathogenic yeast. *Curr Genet* 2017;63:19–22. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0613-3>.
- [58] Rosswag de Souza S, Böke E, Zaffagnini G. Proteostasis in cellular dormancy: lessons from yeast to oocytes. *Trends in Biochemical Sciences* 2025;50:646–62. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2025.05.004>.
- [59] Conlon BP, Rowe SE, Gandt AB, Nuxoll AS, Donegan NP, Zalis EA, et al. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat Microbiol* 2016;1:16051. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.51>.
- [60] Defraigne V, Fauvart M, Michiels J. Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resist Updat* 2018;38:12–26. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.03.002>.
- [61] Yamasaki R, Song S, Benedik MJ, Wood TK. Persister Cells Resuscitate Using Membrane Sensors that Activate Chemotaxis, Lower cAMP Levels, and Revive Ribosomes. *iScience* 2020;23:100792. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100792>.
- [62] Yordanova ZP, Woltering EJ, Kapchina-Toteva VM, Iakimova ET. Mastoparan-induced programmed cell death in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann Bot* 2013;111:191–205. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs264>.
- [63] Vardi A, Eisenstadt D, Murik O, Berman-Frank I, Zohary T, Levine A, et al. Synchronization of cell death in a dinoflagellate population is mediated by an excreted thiol protease. *Environ Microbiol* 2007;9:360–9. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01146.x>.
- [64] Malesevic J, Kojic M, Stanovcic S, Azanjac N, Milisavljevic M. Identification of Genes Promoting Growth of *Ustilago maydis* on Biomolecules Released from Cells Killed by Oxidation. *J Fungi (Basel)* 2022;8:957. <https://doi.org/10.3390/jof8090957>.
- [65] Petkovic J, Kojic M, Milisavljevic M. 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;7:92. <https://doi.org/10.3390/jof7020092>.
- [66] Fabrizio P, Longo VD. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* 2007;371:89–95. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5_8.
- [67] Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* 2013;13:632–42. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.009>.
- [68] Grahl N, Cramer RA. Regulation of Hypoxia Adaptation: An Overlooked Virulence Attribute of Pathogenic Fungi? *Med Mycol* 2010;48:1–15. <https://doi.org/10.3109/13693780902947342>.
- [69] Himmelreich U, Dzendrowskyj TE, Allen C, Dowd S, Malik R, Shehan BP, et al. *Cryptococcus* distinguished from gliomas with MR spectroscopy: an experimental rat and cell culture study. *Radiology* 2001;220:122–8. <https://doi.org/10.1148/radiology.220.1.r01jl25122>.
- [70] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184–91. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- [71] Azevedo F, Marques F, Fokt H, Oliveira R, Johansson B. Measuring oxidative DNA damage and DNA repair using the yeast comet assay. *Yeast* 2011;28:55–61. <https://doi.org/10.1002/yea.1820>.
- [72] Walsh KD, Kato TA. Alkaline Comet Assay to Detect DNA Damage. *Methods Mol Biol* 2023;2519:65–72. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2433-3_7.

- [73] Møller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;98:336–45. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_167.x.
- [74] Kojic M, Holloman WK. BRCA2-RAD51-DSS1 Interplay Examined from a Microbial Perspective. *Cell Cycle* 2004;3:245–6. <https://doi.org/10.4161/cc.3.3.700>.
- [75] Zhou Q, Holloman WK. Dss1 Regulates Association of Brh2 with Rad51. *Biochemistry* 2017;56:3318–27. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00184>.
- [76] Paraskevopoulos K, Kriegenburg F, Tatham MH, Rösner HI, Medina B, Larsen IB, et al. Dss1 Is a 26S Proteasome Ubiquitin Receptor. *Mol Cell* 2014;56:453–61. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.008>.
- [77] Wilmes GM, Bergkessel M, Bandyopadhyay S, Shales M, Braberg H, Cagney G, et al. A Genetic Interaction Map of RNA-Processing Factors Reveals Links between Sem1/Dss1-Containing Complexes and mRNA Export and Splicing. *Molecular Cell* 2008;32:735–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.012>.
- [78] Kojic M, Mao N, Zhou Q, Lisby M, Holloman WK. Compensatory role for Rad52 during recombinational repair in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* 2008;67:1156–68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06116.x>.
- [79] de Sena-Tomás C, Yu EY, Calzada A, Holloman WK, Lue NF, Pérez-Martín J. Fungal Ku prevents permanent cell cycle arrest by suppressing DNA damage signaling at telomeres. *Nucleic Acids Res* 2015;43:2138–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv082>.
- [80] de Sena-Tomás C, Fernández-Álvarez A, Holloman WK, Pérez-Martín J. The DNA Damage Response Signaling Cascade Regulates Proliferation of the Phytopathogenic Fungus *Ustilago maydis* in Planta[W]. *Plant Cell* 2011;23:1654–65. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082552>.
- [81] Johnston GC, Prendergast JA, Singer RA. The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J Cell Biol* 1991;113:539–51. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.3.539>.
- [82] Altmann K, Frank M, Neumann D, Jakobs S, Westermann B. The class V myosin motor protein, Myo2, plays a major role in mitochondrial motility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2008;181:119–30. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709099>.
- [83] Castro IG, Shortill SP, Dziurdzik SK, Cadou A, Ganesan S, Valenti R, et al. Systematic analysis of membrane contact sites in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers modulators of cellular lipid distribution. *Elife* 2022;11:e74602. <https://doi.org/10.7554/eLife.74602>.
- [84] Clague MJ, Urbé S, Komander D. Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20:338–52. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0099-1>.
- [85] Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabiscol E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 2008;1780:1217–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>.
- [86] Durand PM, Rashidi A, Michod RE. How an organism dies affects the fitness of its neighbors. *Am Nat* 2011;177:224–32. <https://doi.org/10.1086/657686>.
- [87] Smakman F, Hall AR. Exposure to lysed bacteria can promote or inhibit growth of neighboring live bacteria depending on local abiotic conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 2022;98:fiac011. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac011>.
- [88] Zayed N, Figueiredo J, Van Holm W, Boon N, Bernaerts K, Teughels W. Mode of killing determines the necrotrophic response of oral bacteria. *J Oral Microbiol* 2023;15:2184930. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2184930>.
- [89] Zhang Y, Chang F-M, Huang J, Junco JJ, Maffi SK, Pridgen HI, et al. DSSylation, a novel protein modification targets proteins induced by oxidative stress, and facilitates their degradation in cells. *Protein Cell* 2014;5:124–40. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-0018-8>.
- [90] Branzei D, Foiani M. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:208–19. <https://doi.org/10.1038/nrm2852>.

- [91] Tannous EA, Burgers PM. Novel insights into the mechanism of cell cycle kinases Mec1(ATR) and Tel1(ATM). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2021;56:441–54. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1925218>.
- [92] Holliday R. Radiation sensitive mutants of *Ustilago maydis*. *Mutat Res* 1965;2:557–9. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(65\)90022-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(65)90022-9).
- [93] Holliday R, Halliwell RE, Evans MW, Rowell V. Genetic characterization of rec-1, a mutant of *Ustilago maydis* defective in repair and recombination. *Genet Res* 1976;27:413–53. <https://doi.org/10.1017/s0016672300016621>.
- [94] Tsukuda T, Bauchwitz R, Holloman WK. Isolation of the REC1 gene controlling recombination in *Ustilago maydis*. *Gene* 1989;85:335–41. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90426-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90426-5).
- [95] Onel K, Thelen MP, Ferguson DO, Bennett RL, Holloman WK. Mutation avoidance and DNA repair proficiency in *Ustilago maydis* are differentially lost with progressive truncation of the REC1 gene product. *Mol Cell Biol* 1995;15:5329–38. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.10.5329>.
- [96] Onel K, Koff A, Bennett RL, Unrau P, Holloman WK. The REC1 gene of *Ustilago maydis*, which encodes a 3'→5' exonuclease, couples DNA repair and completion of DNA synthesis to a mitotic checkpoint. *Genetics* 1996;143:165–74. <https://doi.org/10.1093/genetics/143.1.165>.
- [97] Annotation Error in Public Databases: Misannotation of Molecular Function in Enzyme Superfamilies | PLOS Computational Biology n.d. <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1000605> (accessed April 6, 2026).
- [98] Nunoshiba T, Ishida R, Sasaki M, Iwai S, Nakabeppu Y, Yamamoto K. A novel Nudix hydrolase for oxidized purine nucleoside triphosphates encoded by ORFYLR151c (PCD1 gene) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2004;32:5339–48. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh868>.
- [99] Cartwright JL, Gasmi L, Spiller DG, McLennan AG. The *Saccharomyces cerevisiae* PCD1 gene encodes a peroxisomal nudix hydrolase active toward coenzyme A and its derivatives. *J Biol Chem* 2000;275:32925–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005015200>.
- [100] Calcagnile M, Damiano F, Talà A, Alifano P. Pirin, a redox-sensitive modulator of beta-oxidation, generates hydroxyl radicals and interacts with CatR, the transcriptional repressor of the major vegetative catalase gene in *Streptomyces*. *Microbiol Res* 2025;301:128310. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2025.128310>.
- [101] Stanovcic S, Milisavljevic M, Kolarevic S, Kojic M. Exploring the intersection between necromass reutilization and genome protection reveals novel proteins that contribute to both processes in *Ustilago maydis*. *Biol Direct* 2026. <https://doi.org/10.1186/s13062-026-00771-x>.
- [102] Holliday R. Radiation sensitive mutants of *Ustilago maydis*. *Mutat Res* 1965;2:557–9. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(65\)90022-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(65)90022-9).
- [103] Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, Van Zeebroeck G, Rubio-Teixeira M, Thevelein JM. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 2014;38:254–99. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>.
- [104] Zhao Y, Cholewa J, Shang H, Yang Y, Ding X, Wang Q, et al. Advances in the Role of Leucine-Sensing in the Regulation of Protein Synthesis in Aging Skeletal Muscle. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:646482. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.646482>.
- [105] Kingsbury JM, Sen ND, Cardenas ME. Branched-Chain Aminotransferases Control TORC1 Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 2015;11:e1005714. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005714>.
- [106] Blank HM, Reuse C, Schmidt-Hohagen K, Hammer SE, Hiller K, Polymenis M. Branched-chain amino acid synthesis is coupled to TOR activation early in the cell cycle in yeast. *EMBO Rep* 2023;24:e57372. <https://doi.org/10.15252/embr.202357372>.

- [107] Cai L, Sutter BM, Li B, Tu BP. Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Mol Cell* 2011;42:426–37. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.004>.
- [108] Vogel K, Isono E. Erasing marks: Functions of plant deubiquitylating enzymes in modulating the ubiquitin code. *Plant Cell* 2024;36:3057–73. <https://doi.org/10.1093/plcell/koae129>.
- [109] Buysse D, Pfitzner A-K, West M, Roux A, Odorizzi G. The ubiquitin hydrolase Doa4 directly binds Snf7 to inhibit recruitment of ESCRT-III remodeling factors in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* 2020;133:jcs241455. <https://doi.org/10.1242/jcs.241455>.
- [110] Orellana MV, Pang WL, Durand PM, Whitehead K, Baliga NS. A role for programmed cell death in the microbial loop. *PLoS One* 2013;8:e62595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062595>.
- [111] Stanovcic S, Milisavljevic M, Azanjac N, Kojic S, Kojic M. Biomolecules Generated During Programmed Cell Death (PCD) Enhance the Capacity of Proliferating *Ustilago maydis* Cells to Overcome the Negative Impacts of Non-PCD Necromass. *Microb Ecol* 2026;89:73. <https://doi.org/10.1007/s00248-026-02736-z>.
- [112] Huh G-H, Damsz B, Matsumoto TK, Reddy MP, Rus AM, Ibeas JI, et al. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* 2002;29:649–59. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01247.x>.
- [113] Zeballos N, Grulois D, Leung C, Chevin L-M. Acceptable Loss: Fitness Consequences of Salinity-Induced Cell Death in a Halotolerant Microalga. *Am Nat* 2023;201:825–40. <https://doi.org/10.1086/724417>.
- [114] Farrant JM, Hilhorst HWM. What is dry? Exploring metabolism and molecular mobility at extremely low water contents. *J Exp Bot* 2021;72:1507–10. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa579>.

Biografija

Stefan Stanovčić je rođen 29.06.1992. godine na Cetinju, Crna Gora. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2011. godine, a diplomirao 2015. godine sa prosečnom ocenom 7,74. Master akademske studije upisao je 2015. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Primenjena genetika, a završio 2016. godine sa prosečnom ocijenom 9.0. Master rad pod nazivom „Procena uloge epigenetičkog nasleđivanja u adaptivnom odgovoru populacija na kratkotrajnu i dugotrajnu izloženost olovu“ izradio je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju.

Doktorske studije upisao je 2017. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Genetika, pod mentorstvom dr Milorada Kojića. Od juna 2020. godine zaposlen je u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka.

Učestvovao je na projektima: GENOVA – Faktori BRCA2-posredovane homologne rekombinacije: identifikacija novih komponenti, njihova međusobna interakcija i doprinos očuvanju genomske stabilnosti i odgovoru na stres, pod rukovodstvom dr Mire Milisavljević, kao i PROMIS – Procena sezonske dinamike vazdušnog rezistoma u odgovoru na izloženost zagađenju vazduha u metropolitanskom području Beograda (AirPollRes)- pod rukovodstvom dr Katarine Novović.

Do sada je objavio sedam naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja te učestvovao sa saopštenjima na četiri međunarodna i jednom nacionalnom naučnom skupu.

Изјава о ауторству

Потписани-а Стефан Становчић

број индекса Б3036/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Нови ћелијски фактори укључени у заштиту генома и обнову популације ћелија *Ustilago maydis* након генотоксичног и цитотоксичног 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 Стефан Становчић

Број индекса Б3036/2017

Студијски програм Генетика

Наслов рада Нови ћелијски фактори укључени у заштиту генома и обнову популације ћелија *Ustilago maydis* након генотоксичног и цитотоксичног стреса

Ментор др Милорад Којић др Бранко Јовчић

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:

Нови ћелијски фактори укључени у заштиту генома и обнову популације ћелија *Ustilago maydis* након генотоксичног и цитотоксичног 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, _____
