

Uloga fosfataze PGAM5 u mitofagiji posredovanoj BNIP3L/NIX receptorom

Ivanišević, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:656028>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Klara Ivanišević

**Uloga fosfataze PGAM5 u mitofagiji
posredovanoj BNIP3L/NIX receptorom**

Diplomski rad

Zagreb, 2023

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu pod vodstvom mentorice prof. dr. sc. Ivane Novak Nakir (rad je izrađen u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2020-02-3883 čiji je navedena mentorica voditelj) i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvala

Zahvaljujem mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivani Novak Nakir na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju.

Veliko hvala i mojoj komentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na strpljenju i realizaciji ovog rada.

Također se želim zahvaliti i dr. sc. Miji Marinković i mag. chem. Ani Rožić na razumijevanju i korisnim savjetima tijekom rada u laboratoriju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga fosfataze PGAM5 u mitofagiji posredovanoj BNIP3L/NIX receptorom

Klara Ivanišević

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dosadašnja istraživanja su pokazala kako je dimerizacija receptora BNIP3L/NIX molekularni mehanizam koji pospješuje mitofagiju posredovanu receptorom. Stvaranjem homodimera, BNIP3L/NIX receptor pojačano regrutira autofagosome. Kako bi se razjasnio mehanizam dimerizacije, identificiran je serin na poziciji 212, kao najvažnija aminokiselina na C-terminalnom kraju BNIP3L/NIX receptora odgovorna za dimerizaciju. Eksperimentalno je pokazano da fosforilacija serina 212 sprječava stvaranje dimera BNIP3L/NIX receptora. Pretraživanjem literature definirane su potencijalne fosfataze C-terminalnog kraja receptora BNIP3L/NIX, a među njima je bila i fosfataza PGAM5 čije se djelovanje nastojalo istražiti. Cilj ovog istraživanja je bio otkriti ima li PGAM5 ulogu u defosforilaciji serina 212 što bi razjasnilo jedan od mehanizama regulacije mitofagije. Metodama *pull-down* i koimunoprecipitacije analizirana je interakcija fosfataze PGAM5 s fuzioniranim proteinom EGFP-BNIP3L/NIX i njegovim mutantama BNIP3L/NIX-S212A i BNIP3L/NIX-S212E. Dobiveni rezultati dokazali su interakciju receptora BNIP3L/NIX s fosfatazom PGAM5.

Ključne riječi: autofagija, mitofagija, BNIP3L/NIX, dimerizacija, PGAM5
(64 stranice, 13 slika, 1 tablica, 101 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Novak Nakir
Komentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:
Prof. dr. sc. Nada Oršolić
Izv. prof. dr. sc. Silvija Černi
Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 07. 02. 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Role of PGAM5 phosphatase in BNIP3L/NIX- mediated mitophagy

Klara Ivanišević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Previous research has shown that dimerization of the BNIP3L/NIX receptor is a molecular mechanism that promotes receptor-mediated. Formation of a BNIP3L/NIX homodimer increases recruitment of mitochondria to autophagosomes. To elucidate the mechanism of dimerization, serine at position 212 was identified as the most important amino acid at the C-terminal end of the BNIP3L/NIX for dimerization. It was shown that serine 212 phosphorylation prevents the formation of BNIP3L/NIX dimers. By searching the literature, potential phosphatases of the C-terminal end of the BNIP3L/NIX receptor were defined, and among them was the PGAM5 phosphatase, whose activity was investigated in this master thesis. The aim of this research was to find whether PGAM5 has a role in the dephosphorylation of serine 212, which would clarify one of the mechanisms of mitophagy regulation. The interaction of the phosphatase PGAM5 with the fusion protein EGFP-BNIP3L/NIX and its mutants BNIP3L/NIX-S212A and BNIP3L/NIX-S212E was analyzed using pull-down and co-immunoprecipitation. The results have shown that BNIP3L/NIX is interacting with phosphatase PGAM5.

Keywords: autophagy, mitophagy, BNIP3L/NIX, dimerization, PGAM5
(64 pages, 13 figures, 1 table, 101 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Ivana Novak Nakir, PhD

Co-mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD

Reviewers:

Prof. Nada Oršolić, PhD

Assoc. Prof. Silvija Černi, PhD

Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD

Thesis accepted: 07. 02. 2023.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Autofagija	1
1.1.1. Mehanizam autofagije	4
1.2. MITOFAGIJA	6
1.2.1. Bazalna mitofagija	8
1.2.2. PINK1/Parkin-ovisna mitofagija	8
1.2.3. Mitofagija posredovana receptorom	10
1.2. Receptor BNIP3L/NIX	12
1.3. Dimerizacija receptora BNIP3L/NIX	13
1.4. Fosfataza PGAM5	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Osnovne kemikalije	18
3.1.2. Aparati	21
3.1.3. Puferske otopine	21
3.1.4. Osnovne otopine	22
3.1.5. Bakterijske stanice	23
3.1.6. Stanične linije	23
3.1.7. LB hranjive podloge	23
3.1.8. Mediji za uzgoj stanica	24
3.1.9. Kompleti za transfekciju	24
3.1.10. Protutijela	24
3.1.11. Inhibitori proteaza	24
3.1.13. Plazmidni vektori	25
3.2. Metode	26
3.2.1. Dokazivanje interakcije proteina BNIP3L/NIX s fosfatazom PGAM5 metodom koimunoprecipitacije	26
3.2.2. Proizvodnja i pročišćavanje fuzioniranog proteina His-PGAM5 iz bakterijskih stanica <i>His-Pull down metodom</i>	29
3.2.3. Dokazivanje interakcija proteina BNIP3L/NIX i fosfataze PGAM5 metodom <i>His-Pull down</i>	33
3.2.4. Statistička analiza podataka	34
3.2.5. Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije fosfataze PGAM5	34

4. REZULTATI	36
4.1 Provjera indukcije i pročišćavanja fuzioniranog proteina His-PGAM5.....	36
4.2 Utvrđivanje ekspresije proteina EGFP-BNIP3L/NIX i FLAG-PGAM5 te provjera njihove interakcije metodom koimpunoprecipitacije	37
4.3 Utvrđivanje ekspresije proteina EGFP-BNIP3L/NIX i njegovih mutanti S212A i S212E te provjera interakcije s fuzioniranim proteinima His-PGAM5 metodom <i>Pull down</i>	39
4.4. Analiza rezultata metode <i>Pull down</i> vezanja proteina BNIP3L/NIX i fosfataze PGAM5 .	41
4.5. Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije fosfataze PGAM5	42
5. RASPRAVA	43
6. ZAKLJUČAK	47
7. LITERATURA	48
8. ŽIVOTOPIS	60

POPIS KRATICA

AMBRA1 – aktivirajući faktor protein 1 u BECN1-reguliranoj autofagiji (engl. *Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1*)

AMPK – protein kinaza aktivirana AMP-om (engl. *AMP-activated protein kinase*)

Atg – geni povezani s autofagijom (engl. *Autophagy related genes*)

Atg8 – povezan s autofagijom 8 (engl. *Autophagy related 8*)

BCL2L13 – Bcl2-sličan protein 13 (engl. *Bcl2-like 13*)

BCL2 – B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)

BCL-XL – B stanični limfom- produžena izoforma (engl. *B-cell lymphoma-extra large*)

BH3 – Bcl-2 homolog 3 (engl. *Bcl-2 homology 3*)

BNIP3 – BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-vezujući protein 3 (engl. *BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3*)

BSA – albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*)

CCCP – karbonil cijanid 3-klorofenilhidrazon (engl. *Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone*)

ddH₂O – redestilirana voda, (engl. *Double distilled water*)

DMEM–Dulbeccov modificirani medij (engl. *Dulbeccos Modified Eagle Medium*)

DMSO – Dimetilsulfoksid (engl. *Dimethyl sulfoxide*)

DRP1 – Dinaminu sličan protein 1 (engl. *Dynamin-related protein 1*)

EDTA – Etilendiamin tetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGFP – pojačani zeleni fluorescentni protein (engl. *Enhanced green fluorescent protein*),

FBS – Fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*)

FIP200 – 200 kDa veliki protein koji je u interakciji s obitelji kinaza fokalne adhezije (engl. *Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*)

FIS1 – protein mitohondrijske fizije 1 (engl. *Mitochondrial fission 1 protein*)

FKBP8 –FK506 vezujući protein 8 (engl. *FK506 binding protein 8*)

FUNDC1 – protein 1 koji posjeduje domenu FUN14 (engl. *FUN14 domain-containing protein*

1)

GABARAP– protein udružen s GABA receptorom skupine A (engl. *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*),

GABARAPL1- protein udružen s GABA receptorom skupine A sličan 1(engl. *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1*)

GABARAPL2– protein udružen s GABA receptorom skupine A sličan 2(engl. *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2*)

IPTG – Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid

LAMP2A – protein 2A udružen s membranom lizosoma (engl. *Lysosomal-associated membrane protein 2A*)

MAP1LC3A – prema engl. *Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha*

MAP1LC3B – prema engl. *Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta*

MAP1LC3C – prema engl. *Microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma*

LIR domena – engl. *LC3-interacting region*

MFN1/2 – mitofuzin 1/2 (engl. *Mitofusin 1/2*)

BNIP3L/NIX – protein sličan BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-vezujućem proteinu-3 (engl. *BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3-like*)

OPA1 – protein optičke atrofije (engl. *Optic atrophy 1 protein*)

PGAM5 – član 5 obitelji proteina fosfoglicerat mutaze (engl. *Phosphoglycerate mutase family member 5*)

PHB2 – prohibitin 2 (engl. *Prohibitin 2*)

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PINK1 – PTENom inducirana kinaza 1 (engl. *PTEN-induced putative kinase 1*)

PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (engl. *Phosphate-buffered saline*)

PMSF – Fenilmetilsulfonilfluorid (engl. *Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

SDS – natrij dodecil sulfat (engl. *Sodium dodecyl sulfate*)

TCL– ukupni stanični lizat (engl. *Total cell lysate*)

TM – transmembranski (engl. *Transmembrane*)

TOMM20 – translokaza vanjske mitohondrijske membrane 20 (engl. *Translocase of outer mitochondrial membrane 20*)

TEMED – N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin

UBA – domena udružena s ubikvitinom (engl. *Ubiquitin-associated domain*)

ULK1 – kinaza slična proteinu Unc-51 (engl. *Unc-51-like kinase 1*)

UPS – ubikvitin- proteasomalni put (engl. *Ubiquitin-proteasomal system*)

VDAC1 – naponom reguliran anionski kanal 1 (engl. *Voltage-dependent anion channel 1*)

VPS34 – sortirajući protein vakuole 34 (engl. *Vacuolar protein sorting 34*)

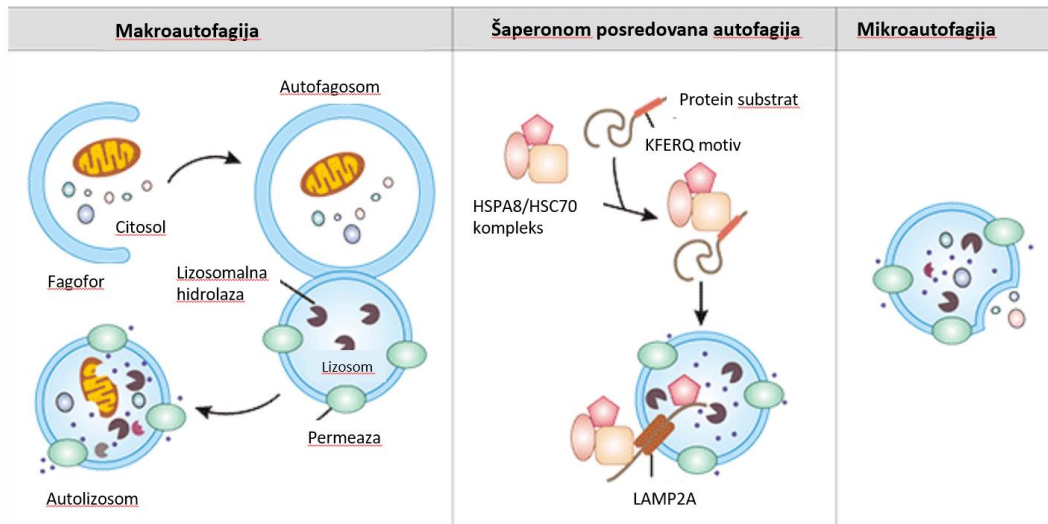
1. UVOD

Kao odgovor na podražaje iz okoliša, stanice pokreću čitav niz promjena u borbi protiv oštećenja te povećavaju toleranciju na stres, a po potrebi popravljaju nastalu štetu. Nakon vanjskog podražaja, mnogi unutarstanični proteini se pogrešno saviju ili odmotaju, izlažući tako svoje hidrofobne regije kako bi stvorili proteinske nakupine koje mogu nanijeti ozbiljnu štetu stanicama. Nadalje, stresne situacije mogu dovesti do oštećenja drugih makromolekula pa i čitavih staničnih organela. Stoga su eukariotske stanice razvile dva unutarstanična mehanizma za uklanjanje nepotrebnih i štetnih dijelova kako bi održale ravnotežu: ubikvitin-proteasomalni put (od engl. *ubiquitin-proteasomal system*, UPS) i put razgradnje posredovan lizosomom, tzv. autofagiju. Pri tome je važno naglasiti da je UPS ograničen na razgradnju proteina, dok je autofagija odgovorna za razgradnju svih vrsta makromolekula i staničnih dijelova (Lilienbaum, 2013).

1.1. Autofagija

Autofagija je evolucijski konzerviran stanični proces odgovoran za recikliranje i razgradnju staničnih dijelova i organela te je neophodan za diferencijaciju, razvoj i homeostazu (Yang i sur., 2010). Autofagija sudjeluje u uklanjanju pogrešno smotanih ili nagomilanih proteina, oštećenih organela, te uklanjanju patogena, kao što su virusi koji se razgrađuju uz pomoć lizosomalnih enzima (Sharma i sur., 2018), ali je također i specijalizirana za uklanjanje nepotrebnog materijala u stanicama. U slučajevima gladi, autofagija razlaganjem staničnih komponenti potiče stanični opstanak održavajući minimalnu razinu potrebne stanične energije. Budući da je čišćenje stanica vrlo važna uloga autofagije pa tako i čitavog tijela, autofagija može djelovati antitumorski uništavanjem kancerogenih stanica i razgradnjom endogenih ili egzogenih kancerogenih tvari, favorizirajući tako razvoj zdravih stanica. S druge strane, autofagija može imati i suprotnu ulogu u razvoju raka jer je uključena u radio- i kemo-rezistenciju, metastaziranje i ponovno pojavljivanje tumora (Huang i sur., 2018). Nadalje, autofagija ima bitnu ulogu u mnogim prirođenim i stečenim imunološkim procesima, potiče predočavanje antigena na površini stanica, uključena je u stanično starenje, štiti od nestabilnosti genoma i sprječava nekrozu te tako igra ključnu ulogu u prevenciji bolesti kao što su rak, neurodegeneracije, kardiomiopatije, dijabetes, bolesti jetre, autoimune bolesti i infekcije (Yang i sur., 2020).

Na temelju mehanizama kojim se unutarstanični materijali isporučuju u lizosom na razgradnju i recikliranje, autofagija se može podijeliti na makroautofagiju, autofagiju posredovanu šaperonima i mikroautofagiju (Slika 1). Iako se mehanizmi ova tri tipa autofagije razlikuju, svi oni provode proteolitičku razgradnju citosolnih komponenti u lizosomu.



Slika 1. Različite vrste autofagije. Makroautofagija, autofagija posredovana šaperonima i mikroautofagija. Preuzeto i prilagođeno prema Parzych i Klionsky, 2014.

Makroautofagija se temelji na spajanju autofagosoma, koji nosi materijal koji je potrebno razgraditi, s lizosomom pri čemu nastaje autolizosom u kojem dolazi do razgradnje sadržaja koji se do njega dopremio. Nasuprot makroautofagiji, u mikroautofagiji citosolne komponente izravno uzima sam lizosom kroz invaginaciju lizosomske membrane, unoseći tako sadržaj u unutrašnjost gdje se potom razgrađuje. I makroautofagija i mikroautofagija mogu zahvatiti velike strukture kroz selektivne i neselektivne mehanizme. Treća vrsta autofagije je autofagija posredovana šaperonima, a samo proteini s C-terminalnim pentapeptidnim KFERQ motivom prolaze kroz ovaj tip razgradnje (Tasset i sur., 2016). Šaperon HSPA8/HSC70 prepoznaje KFERQ aminokiselinski motiv na proteinu što rezultira dovođenjem proteina do LAMP2A receptora (engl. *lysosomal-associated membrane protein 2A*) na membranu lizosoma gdje započinje razgradnja. Označeni proteini se prebacuju preko lizosomalne membrane u kompleksu sa šaperonima (poput HSPA8/HSC70) koje prepoznaje receptor LAMP2A, što u konačnici dovodi do odmatanja i razgradnje unesenog proteina.

Ključni događaj makroautofagije je stvaranje vezikula autofosoma, koje selektivno ili neselektivno obuhvata stanični sadržaj namijenjen za razgradnju putem fuzije autofosoma s

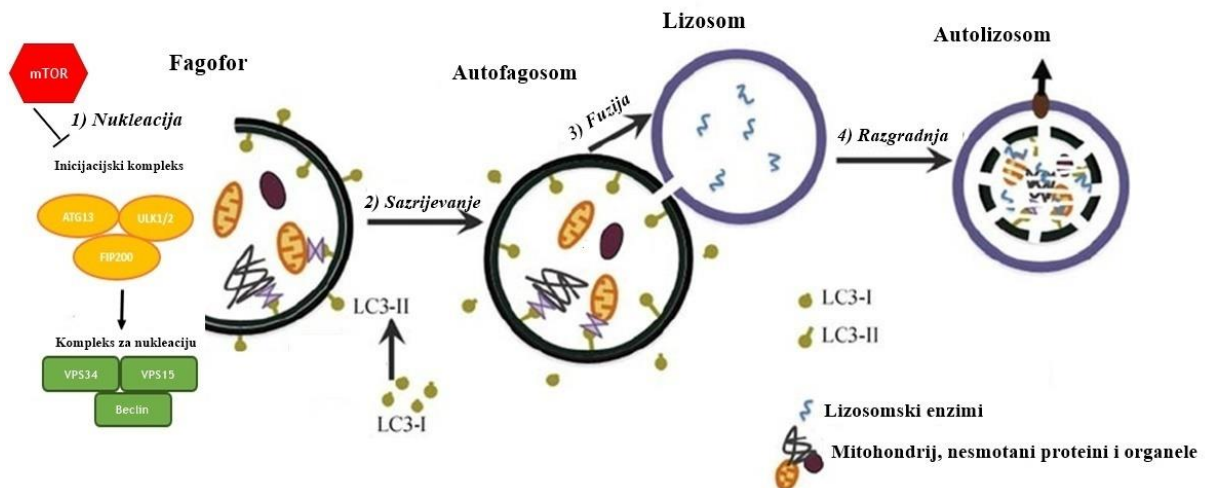
lizosomima. S obzirom na razgradnju i specifičnost postoje dva tipa autofagije, neselektivna i selektivna autofagija. Kao odgovor na nedostatak hranjivih tvari, aktivira se neselektivna autofagija u kojoj se lizosomom razgrađuju biokemijski raznovrsni materijali odabrani na neselektivan način kako bi se stanicama osigurale nužne aminokiseline i hranjive tvari. Nasuprot tome, selektivna autofagija odvija se u svrhu uklanjanja oštećenih ili nepotrebnih organela ili nakupina makromolekula čak i u uvjetima bogatim hranjivim tvarima. Selektivna autofagija je precizno reguliran proces temeljen na specifičnom prepoznavanju organela i interakciji receptora autofagije preko LIR domene (prema engl. *LC3 Interacting Region*) s članovima proteinske obitelji Atg8 (prema engl. *Autophagy related genes 8*) koji se kod ljudi nazivaju MAP1LC3A (prema engl. *Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha*), za koji će se u nastavku teksta koristiti uvriježena skraćenica LC3, MAP1LC3B (prema engl. *Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta*), MAP1LC3C (prema engl. *Microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma*), GABARAP (prema engl. *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*), GABARAPL1 (prema engl. *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1*) i GABARAPL2 (prema engl. *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2*).

Do sada je zabilježeno mnogo vrsta selektivne autofagije u eukariotima: uklanjanje patogenih mikroorganizama (ksenofagija) (Levine, 2005; Kudchodkar i Levine, 2009), peroksisoma (peksofagija) (Komatsu i sur., 2006), endoplazmatskog retikuluma (ERfagija) (Reef i sur., 2006), proteinskih nakupina (agrefagija) (Ding i sur., 2007; Komatsu i sur., 2007; Ding i Yin 2008; Matsumoto i sur., 2011), ribosoma (ribofagija) (Kraft i sur., 2008; MacIntosh i Bassham, 2011), lipida (lipofagija) (Singh i sur., 2009; Ding i sur., 2010a). Osim navedenih, jedan od najbolje proučenih tipova selektivne autofagije je mitofagija, kojom se selektivno uklanjaju mitohondriji (Lemasters, 2005).

1.1.1. Mehanizam autofagije

Iako je autofagija otkrivena prije više od 50 godina, njeni molekularni mehanizmi shvaćeni su tek 90-tih godina prošlog stoljeća nakon genetskog probira u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, gdje su otkrivene mutacije u genima povezanim s autofagijom. Mnoga otkrića samih mehanizama autofagije, načina regulacije i djelovanja proučavani su upravo na kvascima, pa su tako identificirana 32 različita gena koja su povezana s autofagijom tzv. Atg geni (prema engl. *Autophagy related genes*) (Ohsumi i sur., 1998), od kojih mnogi imaju homologe u stanicama sisavaca (Klionsky i sur., 2003; Nakatogawa i sur., 2009). Većina proteina iz obitelji ATG gradi višemolekulske komplekse kako bi se reguliralo stvaranje autofagosoma. To uključuje: (1) kompleks ULK1/2/ATG13/FIP200 (prema engl. *Unc-51 like autophagy activating kinase1/2 /Autophagy related gene 13/ FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa; Short=FIP200*); (2) kompleks fosfatidilinozitol 3-kinaze klase III (PI3K III) sastavljen od tri glavna proteina VPS34 (prema engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*), VPS15 (prema engl. *serine/threonine-protein kinase VPS15*) i Beclin1; i (3) dva ubikvitinu slična konjugacijska sustava, ATG12/ATG5 i Atg8/LC3 (Yang i Klionsky, 2010). Autofagija je složeni proces reguliran na molekularnoj razini koji ovisi o brojnim signalnim putevima. Sam proces autofagije se može podijeliti na četiri ključne faze, nukleaciju, sazrijevanje autofagosoma, fuziju autofagosoma s lizosomom i razgradnju sadržaja u autolizosomu (Slika 2). Pokretanje autofagije je strogo regulirano središnjom signalnom molekulom, kinazom mTOR (prema engl. *Mechanistic target of rapamycin*) (Noda i sur., 1998). Kada je stanica u stanju bogatom hranjivim tvarima, molekula mTOR je aktivna i autofagija je inhibirana. Indukcijom autofagije, nedostatkom hrane ili pod utjecajem stresa, mTOR je inhibiran što omogućuje stvaranje i aktivaciju Atg13/ULK1/2/FIP200 kompleksa, potrebnog u najranijim fazama stvaranja fagofora iz lipidnog dvosloja. Proces autofagije započinje, a fagofor se širi kako bi obuhvatio unutarstanični teret obilježen za razgradnju. Aktivirani Atg13/ULK1/2/FIP200 kompleks dalje aktivira sekundarni kompleks VPS34/VPS15/Beclin koji dovodi do nukleacije fagofora (Axe i sur., 2008). Fagofor sazrijevanjem prelazi u autofagosom, koji se stapa s lizosomom, potičući tako razgradnju sadržaja autofagosoma hidrolitičkim enzimima. Za rast i sazrijevanje fagofora ključni su proteini obitelji Atg8/LC3. Obitelj proteina Atg8/LC3 smještena je citoplazmi, a tijekom sazrijevanja fagofora dolazi do konverzije LC3-I u LC3-II. Konverzijom se postiže kovalentno vezanje LC3 na membranu novonastajućeg autofagosoma. Takav se oblik proteina LC3 naziva lipidiranim oblikom.

Glavne produkte razgradnje lizosomske permeaze i transporteri odvođe natrag u citoplazmu, gdje se ponovno mogu koristiti za izgradnju makromolekula i sudjelovati u aktivnom metabolizmu. Autofagija se iz tog razloga može smatrati staničnim "centrom za recikliranje" koja također promiče energetska učinkovitost kroz proizvodnju ATP-a i posreduje kontrolu štete uklanjanjem nefunkcionalnih proteina i organela.



Slika 2. Molekularni mehanizam regulacije autofagije. Preuzeto i prilagođeno iz Wilkinson i sur., 2014.

Postoje brojni endogeni i egzogeni čimbenici koji reguliraju autofagiju, kao što su transkripcijski čimbenici, promjene u količini ili koncentraciji različitih citoplazmatskih molekula, oštećenih organela, egzogenih spojeva i patogena (Füllgrabe i sur., 2016; Barnwal i sur., 2016; Battu i sur., 2018) pa se iz tog razloga mehanizmi autofagije razlikuju. Nadalje, otkriveno je da je autofagija fino podešena i epigenetskom regulacijom, uključujući metilaciju DNA, histonske modifikacije i nekodirajuće RNA molekule. Epigenetske modifikacije utječu na to kada će se i u kojim uvjetima aktivirati ili utišati ekspresija pojedinih gena, koji u konačnici znače zdravlje ili bolest. Već je prethodno spomenuto kako autofagija ima dvojaku ulogu u razvoju tumora. Autofagija može promicati mehanizme za razvoj tumorskih stanica, štoviše potiče mehanizme za angioin vazivnost, imunološku otpornost, metastaziranje i otpornost na liječenje (Dawson i sur., 2012). Nedavna istraživanja pokazala su da su različiti geni za suzbijanje tumora i onkogeni koji su uključeni u autofagiju strogo regulirani različitim epigenetskim modifikacijama (Mandhair i sur., 2021). Nadalje, drugo istraživanje je pokazalo da receptor vitamina D može modulirati autofagiju u normalnim mliječnim žlijezdama i luminalnim stanicama raka dojke, što upućuje na potencijalnu terapijsku vezu između razine vitamina D i rizika pojave i progresije raka dojke (Tavera-Mendoza i sur., 2017).

1.2 MITOFAGIJA

Mitochondriji su organeli neophodni za funkcioniranje većine stanica. Reguliraju energetske stanične ravnoteže, diferencijaciju i smrt stanica. Također, mitochondriji imaju i brojne druge uloge u stanici, uključujući regulaciju i skladištenje kalcija, sintezu steroida i hema (Kroemer i sur., 2007). To su također vrlo dinamični organeli koji imaju sposobnost fuzije i fuzije, odnosno dijeljenja i stapanja. Pri fiziološkim uvjetima, mitochondriji se stalno nalaze u fuzijskim i fizijskim procesima kako bi normalno funkcionirali. Stoga, biogeneza funkcionalnih i uklanjanje nefunkcionalnih mitochondrija moraju biti visoko regulirani i učinkoviti procesi. Postoje brojni unutarstanični i izvanstanični signali koji reguliraju fuziju i fiziju mitochondrija, uključujući oksidacijski stres, membranski potencijal i apoptozu (Kroemer i sur., 2007). Najbolje proučavani proteini koji su uključeni u mitochondrijsku fuziju su proteini vanjske mitochondrijske membrane, mitofuzini 1 i 2 (MFN1 (prema engl. *mitofusin-1*) i MFN2 (prema engl. *mitofusin-2*) i OPA1 (prema engl. *optic atrophy 1*) (Ranieri i sur., 2013). Navedeni proteini hidroliziraju GTP kako bi omogućili fuziju dviju susjednih mitochondrijskih membrana i dijeljenje mitochondrijske DNA, proteina i metabolita (Hall i sur., 2014). MFN1 i MFN2 omogućuju fuziju vanjske mitochondrijske membrane, dok je s druge strane, OPA1 odgovoran za fuziju unutarnjih mitochondrijskih membrana. Fizija je regulirana proteinima, DRP1 (prema engl. *dynammin-related protein 1*) i FIS1 (prema engl. *fission protein 1*). Za razliku od mitofuzina i OPA1, protein DRP1 je lokaliziran u citoplazmi. Prilikom aktivacije DRP1 se poveže s FIS1 koji je lokaliziran na vanjskoj mitochondrijskoj membrani pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa koji omogućuje fiziju mitochondrija (Westermann, 2010).

Mitofagija, definirana kao selektivna autofagija mitochondrija, prvo je opisana u kvascu, gdje je utvrđeno da prisutnost mutiranog proteina Uth1p u vanjskoj mitochondrijskoj membrani (OMM prema engl. *outer mitochondrial membrane*) blokira autofagiju tijekom gladovanja (Doblado i sur., 2021). Uklanjanje mitochondrija kroz autofagiju zahtijeva dva koraka: indukciju i označavanje mitochondrija za prepoznavanje od strane mašinerije autofagije. Aktivacija mitofagije može se potaknuti ili različitim stresnim stanjima ili može biti programirana. U slučaju kad je mitofagija potaknuta stresom, aktivira se put PINK1 (prema engl. *PTEN-induced kinase 1*)/PARKIN, dok za vrijeme programiranog uklanjanja mitochondrija, glavnu ulogu imaju receptori mitofagije: BNIP3L/NIX (prema engl. *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-*

interacting protein 3-like) (Novak i sur., 2010), BNIP3 (prema engl. *Bcl-2 interacting protein 3*) (Zhu i sur., 2013), FUNDC1 (prema engl. *FUN14 domain-containing protein 1*) (Liu i sur., 2012), BCL2L13 (prema engl. *Bcl2-like 13*) (Murakawa i sur., 2015), kardiolipin (Zurine i sur., 2016), Prohibitin 2 (Wei i sur., 2017), FKBP8 (prema engl. *FK506 binding protein 8*) (Bhujabal i sur., 2017) i AMBRA1 (prema engl. *activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1*) (Rita i sur., 2019).

PINK1/PARKIN-posredovana mitofagija ovisi o poliubikvitinizaciji mitohondrijskih proteina što potiče inicijaciju i daljnju progresiju mitofagije. Nasuprot tome, receptorom programirana mitofagija uključuje direktnu interakciju mitofagijskih receptora, koji se nalaze na membranama mitohondrija s autofagosomima. Iako je put PINK1/PARKIN najbolje opisan, programirana mitofagija igra ključnu ulogu u razvoju i specijalizaciji pojedinih stanica.

Uklanjanje oštećenih mitohondrija kroz autofagiju nužno je za održavanje mnogih staničnih funkcija. Budući da oštećeni mitohondriji stvaraju velike količine reaktivnih kisikovih spojeva što za posljedicu ima oksidativno oštećenje nukleinskih kiselina, proteina i lipida ili direktno izazivaju apoptozu, ključno je konstantno nadgledati mitohondrijsku kvalitetu. Mitofagija igra ključnu ulogu u terminalnoj diferencijaciji crvenih krvnih stanica (Mortensen i sur., 2010) i T-stanica (Bronietzki i sur., 2015), u neurodegenerativnim bolestima (Nixon, 2013), kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest, u ishemiji (Yang i sur., 2019) i ozljedama tkiva uzrokovanih lijekovima (Carew i sur., 2003). Shodno tome, farmakološke ili prehrambene intervencije koje održavaju homeostazu mitofagije i olakšavaju uklanjanje nepovratno oštećenih mitohondrija, mogle bi poslužiti kao potencijalne terapije kod nekoliko kroničnih bolesti (Doblado i sur., 2021).

Istraživanjima su dokazana tri mehanizma uklanjanja mitohondrija autofagijom: bazalna mitofagija, mitofagija potaknuta oštećenim mitohondrijima te mitofagija posredovana receptorom (Novak, 2012).

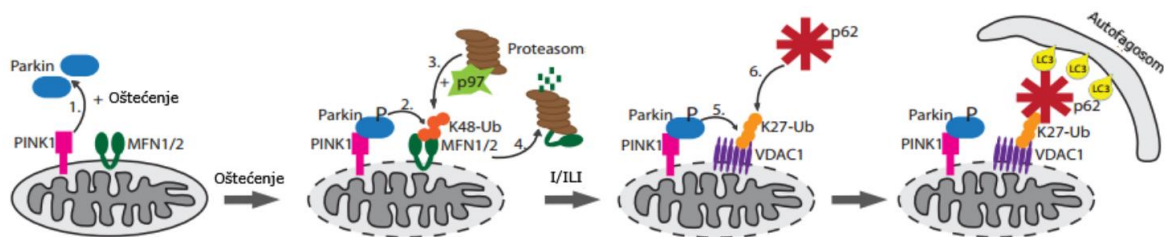
1.2.1. Bazalna mitofagija

Bazalna mitofagija je proces koji selektivno uklanja i reciklira mitohondrije tijekom staničnog razvoja i mitohondrijskog održavanja u stanici. Sun i sur. (2015) i McWilliams i sur. (2016) dokazali su uz pomoć dva transgenična mišja modela da se razina bazalne mitofagije u stanici razlikuje u različitim vrstama stanica ovisno o njihovoj energetskej potrebi (Sun i sur., 2015). Srce, bubrezi i živčane stanice, uključujući dopaminergične neurone, imaju visoku razinu bazalne mitofagije, a timus nisku (Sun i sur., 2015). Znanstvenici su dokazali kako u svim tkivima osim otočića gušterače, gubitak proteina PINK1 nije utjecao na bazalnu mitofagiju te tako otkrili da se bazalna mitofagija sisavaca događa neovisno o proteinu PINK1 (McWilliams i sur., 2018). Detaljni mehanizmi odgovorni za bazalnu mitofagiju su još uvijek nejasni.

1.2.2. PINK1/Parkin-ovisna mitofagija

Nakupljanje velikih količina reaktivnih kisikovih radikala, uslijed oksidativne fosforilacije, uzrokuje oštećenja mitohondrijske DNA i proteina, što dovodi do povećanja propusnosti i depolarizacije mitohondrijske membrane, zbog čega je neophodno njihovo uklanjanje. Uslijed oštećenja mitohondrija na vanjskoj mitohondrijskoj membrani nakuplja se serin/treonin kinaza PINK1 čija je razina na mitohondrijima obično niska. U fiziološkim uvjetima, tijekom homeostaze, N-terminalni kraj PINK1 se prenosi preko vanjske do unutrašnje mitohondrijske membrane gdje se konačno smješta tako da njegova kinazna domena strši u citosol. Ovdje ga peptidaza PARL, vezana za unutrašnju mitohondrijsku membranu, cijepa. Tako pocijepani PINK1 se oslobađa u citosol te biva razgrađen ubikvitin-proteasomalnim sustavom. Kod zdravih, funkcionalnih mitohondrija ovaj ciklus unosa i razgradnje PINK1, održava PINK1 na vrlo niskim, gotovo neprimjetnim razinama. Međutim, depolarizacijom mitohondrijske membrane, inhibicijom transportnog lanca elektrona, genetskim ili ekološkim čimbenicima, kao što su nakupljanje krivo smotanih proteina ili upala, obrada PINK1 PARL-om je spriječena, što rezultira prekomjernim nakupljanjem PINK1 na vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Sposobnost kinaze PINK1 da se brzo nakuplja i aktivira na vanjskoj mitohondrijskoj membrani omogućuje joj da djeluje kao senzor mitohondrijskih oštećenja. Nakupljena kinaza PINK1 je autofosforilirana i aktivirana, te fosforilira sam ubikvitin na serinu 65, koji mobilizira

E3 ubikvitin ligazu PARKIN iz citosola na vanjsku mitohondrijsku membranu (Kazlauskaitė i sur., 2014). Aktivirani PARKIN zatim pokreće ubikvitinizaciju mitohondrijskih proteina, a time i mitofagiju (Narendera i sur., 2008; Chan i sur., 2011; Matsuda i sur., 2016). Neke od identificiranih meta ligaze PARKIN smještene su na vanjskoj mitohondrijskoj membrani i uključuju MFN1 i MFN2, VDAC1 (prema engl. *Voltage dependent anion channel protein 1*) i MIRO (prema engl. *Mitochondrial Rho GTPase*) (Ni i sur., 2014). Samom mehanizmu indukcije mitofagije, koja je potaknuta oštećenjem, prethodi fizija mitohondrija, kako bi se normalno izduženi mitohondriji pretvorili u oblik pogodan za pakiranje u autofagosome (Twig i sur., 2009). PARKIN ubikvitinira nekoliko proteina koji se nalaze na vanjskoj mitohondrijskoj membrani, uključujući mitofuzine, stvarajući tako na njima poliubikvitinske lance koji će biti signal za protein p97 koji će dovesti proteasom do ubikvitiniranih mitofuzina i tako potaknuti njihovu razgradnju u proteasomu (Slika 3). Uklanjanje mitofuzina nužno je za pravilnu indukciju mitofagije i selektivno uklanjanje oštećenih mitohondrija jer mitohondriji kojima nedostaje mitofuzin nisu u stanju spojiti se sa zdravim mitohondrijima kao mehanizmom mitohondrijskog popravka oštećenja (Liu i sur., 2009). U isto vrijeme, PARKIN može poliubikvitinirati protein VDAC1 koji je smješten na vanjskoj mitohondrijskoj membrani, stvarajući tako K27 povezane ubikvitinske lance koji potiču autofagiju privlačeći receptor autofagije p62. p62 prepoznaje poliubikvitinirani mitohondrij, te se veže na ubikvitin domenom UBA (prema engl. *Ubiquitin-associated domain*) s jedne strane, a domenom LIR s druge na proteine LC3/GABARAP na autofagosomu dovodeći do stvaranja mosta između mitohondrija i novonastalog autofosoma (Pankiv i sur., 2007). Važno je napomenuti da je aktivacija p62 potrebna za mitofagiju izazvanu PINK1/PARKIN putem, ali mitofagija se može pojaviti čak i u odsutnosti p62 na mitohondrijama (Okatsu i sur., 2010; Narendera i sur., 2010).



Slika 3. Mitofagija potaknuta oštećenjem. (1) Aktivirana PINK1 veže E3 ligazu Parkin i dovodi je do mitohondrija. (2) Parkin ubikvitinira mitofuzine (MFN1 i MFN2) i time potiče njihovu razgradnju proteasomom (3) kojeg p97 dovodi do mitohondrija. (4) Razgradnja mitofuzina inhibira fuziju mitohondrija i aktivira mitofagiju. (5) U isto vrijeme Parkin ubikvitinira VDAC1 koji se nalazi na vanjskoj mitohondrijskoj membrani stvarajući K27 povezane Ub-lance koji potiču autofagiju privlačeći receptor autofagije p62 (6). Vezanjem receptora autofagije p62 na VDAC1 i preko LIR domene za Atg8/LC3/GABARAP proteine na autofagosomu označava početak autofagije. Preuzeto iz Novak, 2012.

1.2.3. Mitofagija posredovana receptorom

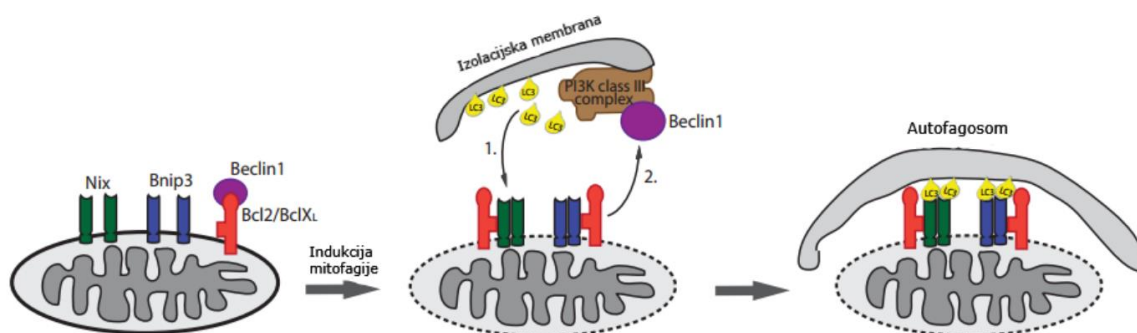
Iako mitofagija prvenstveno djeluje kao mehanizam kontrole kvalitete mitohondrija uočena je i važna uloga u diferencijaciji specijaliziranih tipova stanica kao što su krvne stanice, stanice leće oka i druge (Mortensen i sur., 2010; Costello i sur., 2013). Uklanjanje mitohondrija tijekom diferencijacije specijaliziranih stanica neophodno je za ispravan razvoj pojedinih organa ili tkiva. Do sada, najbolje opisan primjer mitofagije posredovane receptorom je uklanjanje mitohondrija tijekom terminalne eritropoeze kod sisavaca, kada su retikulociti podvrgnuti intenzivnom unutarstaničnom preuređenju kako bi postali zreli eritrociti (Gronowicz i sur., 1984, Svetina i sur., 2004). Eritrociti nisu jedine stanice koje uklanjaju mitohondrije tijekom diferencijacije već je programirana mitofagija odgovorna i za neurogenezu ganglijskih stanica retine i proupalnih makrofaga, te igra važnu ulogu u diferencijaciji srčanih progenitorskih stanica (O'Sullivan i sur., 2015; Yuan i sur., 2017; Xu i sur., 2019).

Dva znanstvena tima, tijekom neovisnog istraživanja otkrili su važnost proteina BNIP3L/NIX-a prilikom diferencijacije retikulocita. Značaj proteina BNIP3L/NIX dokazan je kod miševa kojima nedostaje protein BNIP3L/NIX, a kod kojih retikulociti nisu uspjeli ukloniti mitohondrije. Razvoj zrelih eritrocita je bio zaustavljen, iako je mehanizam autofagije

funkcionalan (Schweers i sur., 2007; Sandoval i sur., 2008). U retikulocitima, mitohondriji s uklonjenim proteinom BNIP3L/NIX su se nakupljali oko autofagosoma, ali nisu nikada bili nađeni unutar autofagosomalne vezikule. To je potaknulo dodatna istraživanja uloge proteina BNIP3L/NIX u mitofagiji. Narednim istraživanjem je dokazano da mitohondrijski protein BNIP3L/NIX ima ulogu selektivnog receptora autofagije koji se veže za proteine LC3/GABARAP (Novak i sur., 2010).

Sam mehanizam aktivacije mitofagije posredovane receptorom BNIP3L/NIX još uvijek nije potpuno razjašnjen. Nedavno je pokazano da procesi fosforilacije i dimerizacije reguliraju inicijaciju i napredovanje mitofagije (Marinković i sur., 2021). Nakon indukcije mitofagije, fosforilirani serin 212 BNIP3L/NIX monomera se defosforilira kako bi se stvorili stabilniji BNIP3L/NIX dimeri. Nadalje, tako stvoreni stabilni homodimeri preko LIR domene koja je izložena citoplazmatskom dijelu snažnije vežu autofagosomalne ATG8/LC3/GABARAP proteine. Stoga je potvrđeno da dimerizacija receptora BNIP3L/NIX pojačava interakciju s ATG8/LC3/GABARAP proteinima (Marinković i sur., 2021). Također, budući da je potvrđena interakcija receptora BNIP3L/NIX s BCL2/BCLXL (Imazu i sur., 1999) pretpostavlja se kako je tom interakcijom oslobađa BECLIN1 s BCL2/BCLXL koji tako vezan blokira autofagiju (Slika 4). Tako oslobođeni BECLIN1 aktivira mašineriju autofagije (Bellot i sur, 2009).

Za potpunije razumijevanje uloge mitofagije posredovane receptorom potrebna su daljnja istraživanja koja će otkriti koji su to sve signali koji aktiviraju stanicu na programirano uklanjanje mitohondrija.



Slika 4. Mehanizam mitofagije posredovane receptorom. (1) BNIP3L/NIX i BNIP3 se vežu za proteine **Atg/LC3/ GABARAP**. (2) Vežanjem BNIP3L/NIX i BNIP3 s Bcl-2/Bcl-XL rezultira otpuštanjem Beclin1 što dovodi do nastanka autofosoma. Preuzeto iz Novak, 2012.

1.2. Receptor BNIP3L/NIX

Protein BNIP3L/NIX je otkriven prije više od dva desetljeća, a prvotno je identificiran kao proapoptotski protein obitelji BCL2 koji mogu izazvati apoptozu ili nekrozu stanica (Matsushima i sur., 1998; Vande i sur., 2000; Diwan i sur., 2009). BNIP3L/NIX je homolog BNIP3 proapoptoskog proteina. Humani BNIP3L/NIX je mali protein građen od 219 aminokiselina. Izuzevši vanjsku mitohondrijsku membranu na kojoj je najčešće lokaliziran, nalazi se i na jezgri i ovojnici, kao i membrani endoplazmatskog retikuluma (Ohi i sur., 1999), a nedavno je opisano da se lokalizira i na membrani peroksisoma (Wilhelm i sur., 2022). BNIP3L/NIX stupa u interakciju s virusnim i staničnim antiapoptotskim proteinima, kao što su adenovirusi E1B-19K i EBV-BHRF1, te BCL2 i BCL-XL (Yasuda i sur., 1999) te tako blokira njihovu antiapoptotsku aktivnost, promičući apoptozu te je upravo kao takav prvotno i opisan. Do prekretnice u području istraživanja proteina BNIP3L/NIX došlo je prilikom otkrivanja da su miševi s izbačenim genom *Bnip3l/Nix* pokazali poremećeno sazrijevanje retikulocita (Schweers i sur., 2007; Sandoval i sur., 2008). Novak i sur. (2010) su pak pokazali da je BNIP3L/NIX receptor mitofagije te utvrdili da je razlog poremećenog sazrijevanja retikulocita u *Bnip3l/Nix*^{-/-} miševa upravo nemogućnost uklanjanja mitohondrija procesom mitofagije. Od tada je mitofagija posredovana BNIP3L/NIX receptorom identificirana i kod prirodnih stanica ubojica, neurona, ganglijskih stanica retine, bubrežnih stanica i nekoliko vrsta tumorskih stanica (O'Sullivan i sur., 2015; Yuan i sur., 2017; Xu i sur., 2019).

Receptor BNIP3L/NIX se sastoji od domene LIR (koja je odgovorna za vezanje ATG8 obitelji proteina) na svom N-terminalnom citoplazmatskom dijelu, BH3 domene i transmembranske domene (TM domene) na C-terminalnom dijelu kojom je umetnut u vanjsku mitohondrijsku membranu (Slika 5). Domenu LIR čini slijed od četiri aminokiseline WVEL koje su ključne za interakciju s proteinima ATG8/LC3/GABARAP, a važnost te regije očituje se u činjenici da uklonjena domena LIR u BNIP3L/NIX onemogućava mitofagiju (Novak i sur., 2010). Za razliku od domene LIR, transmembranska domena ne sudjeluje u interakciji između proteina ATG8 već je važna za lokalizaciju proteina u vanjsku mitohondrijsku membranu, ali i za dimerizaciju receptora (Marinković i sur., 2021). BNIP3L/NIX kao i homolog BNIP3 imaju sposobnost stvaranja stabilnih homodimerskih kompleksa (Chen i sur., 1999; Chinnadurai i sur., 2008). Protein BNIP3L/NIX tako možemo pronaći u dva oblika, monomernom obliku molekulske mase oko 24 kDa i/ili dimernom obliku molekulske mase oko 48 kDa (Chen i sur.,

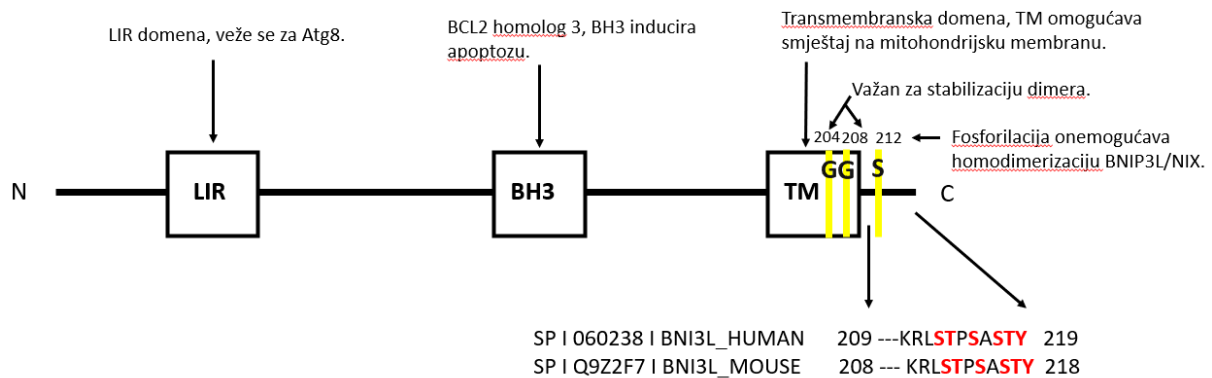
1999; Novak i sur., 2010). Domena BH3 receptora BNIP3L/NIX ga svrstava u proteine BH3-only iz obitelji proapoptotskih BCL2 proteina (Imazu i sur., 1999).

Vežanje BNIP3L/NIX na proteine ATG8/LC3/GABARAP preko domene LIR, nužno je za pravilnu mitofagiju posredovanu receptorima, a fosforilacija aminokiselina serin 34 i serin 35 neposredno ispred LIR-a je vrlo važna za aktivaciju receptora (Rogov i sur., 2017). Fosforilacija domene LIR receptora BNIP3L/NIX nije dovoljna za potpunu aktivaciju i napredovanje mitofagije, stoga je pokazano postojanje i dodatnog mehanizma, poput dimerizacije koji doprinosi učinkovitijem uklanjanju mitohondrija putem djelovanja receptora BNIP3L/NIX (Marinković i sur., 2021). Iako postoje brojni drugi proteini koji mogu potaknuti apoptozu ili mitofagiju učinkovitije od BNIP3L/NIX, sposobnost ovog proteina da učini oboje čini ga posebno zanimljivim za istraživanje odnosa između različitih staničnih sudbina (Zhang i sur., 2009).

1.3. Dimerizacija receptora BNIP3L/NIX

Postoje dva oblika BNIP3L/NIX u stanicama: monomerni i dimerni oblik. Stvarajući stabilne homodimere, BNIP3L/NIX novači autofagosome snažnije od svog monomernog oblika (Marinković i sur., 2021). Dimerizacija se ostvaruje putem transmembranskog pentapeptida GxxxG koji omogućava bočnu interakciju između dvaju transmembranskih alfa heliksa (Sulistijo i sur., 2006). Upravo iz navedenog razloga pokazano je da postoje nužne aminokiseline u transmembranskoj domeni koje su odgovorne za ovu interakciju, pa tako zamjene aminokiselina glicina 204 u alanin i glicina 208 u valin, dovode do ukidanja stvaranja dimera, što rezultira slabijim prepoznavanjem LC3/GABARAP:BNIP3L/NIX i posljedično slabijom aktivacijom mitofagije (Marinković i sur., 2021). Marinković i sur. su ustanovili fiziološki i funkcionalni značaj dimerizacije receptora BNIP3L/NIX analizom C-terminalnog kraja. C-terminalni kraj se sastoji od 11 aminokiselina, smješten je u međumembranskom mitohondrijskom prostoru, te sadrži više od 50% aminokiselina koje mogu biti podvrgnute fosforilaciji (Slika 5). Rezultati istraživanja ukazuju da fosforilacija C-terminalnog kraja receptora BNIP3L/NIX i posljedični gubitak dimerizacije smanjuju indukciju mitofagije posredovane receptorom BNIP3L/NIX. Pokazano je da je za to odgovoran fosforilacijski status serina 212. Konačno, proučavanjem kombiniranog mehanizma fosforilacije domene LIR i dimerizacije receptora BNIP3L/NIX pokazano je da su oba mehanizma potrebna za

učinkovitiju inicijaciju i napredovanje mitofagije posredovane receptorom BNIP3L/NIX (Marinković i sur., 2021).



Slika 5. Shematski prikaz građe proteina BNIP3L/NIX. Domena LIR regija se veže s proteinima ATG8 kako bi izazvala mitofagiju. BH3 potiče apoptozu. Domena TM omogućava smještaj receptora BNIP3L/NIX na vanjskoj mitohondrijskoj membrani. G204 i G208 važni su za stabilizaciju BNIP3L dimera. Defosforilacija S212 potiče homodimerizaciju BNIP3L/NIX.

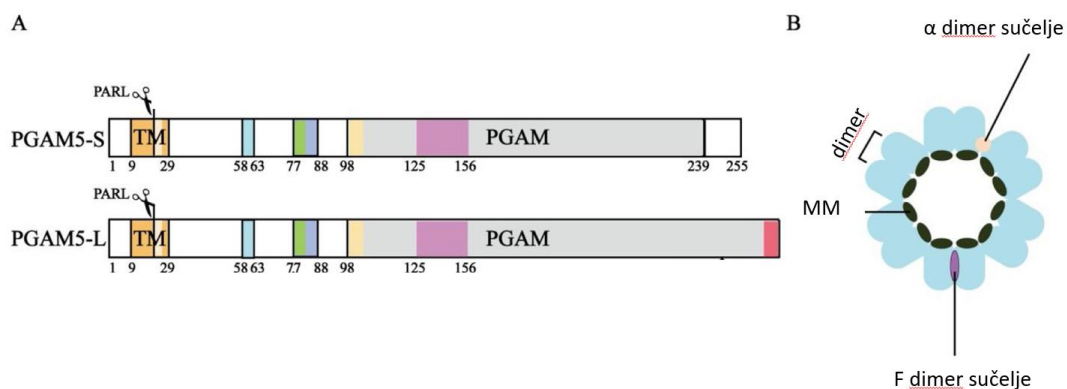
1.4. Fosfataza PGAM5

Poznato je da je fosforilacija serina 212 ključna za gubitak dimerizacije pa su od iznimnog interesa istraživanja koja će odgovoriti na pitanja koje fosfataze i kinaze reguliraju proces dimerizacije. Enzimi koji su lokalizirani na mitohondrijima i koji mogu stupiti u interakciju sa C-terminalnim krajem receptora BNIP3L/NIX izloženog u intermembranski prostor trebaju biti prvi istraženi, stoga se fosfataza PGAM5 nametnula kao idealan kandidat za istraživanje.

Fosfoglicerat mutaza 5 (PGAM5) je mitohondrijska serin (Ser)/treonin (Thr) fosfataza koja se obično nalazi u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani. Pripada proteinskoj porodici PGAM koja se kod ljudi sastoji od 12 proteina, a karakterizira ih očuvana katalitička domena, domena PGAM (Sadatomi i sur., 2013). Za razliku od većine enzima PGAM, koji su fosfotransferaze ili fosfohidrolaze malih metabolita, fosfataza PGAM5 defosforilira proteinske supstrate, ciljajući aminokiselinske ostatke fosforiliranog serina, treonina i histidina (Takeda i sur., 2009; Panda i sur., 2016).

PGAM5 djeluje kao regulator mitohondrijske homeostaze: aktivira mitohondrijsku biogenezu i mitofagiju promovirajući stanični kompenzacijski odgovor kada su mitohondriji blago oštećeni (Cheng i sur., 2021). Složena struktura PGAM5 temelj je njegove funkcionalne raznolikosti. Humani PGAM5 ima dvije izoforme proteina, dužu PGAM5-L i kraću PGAM5-S, koje se proizvode alternativnim spajanjem 3' egzona PGAM5 transkripta. Mitohondrijska fosfataza PGAM5 srodna je obitelji fosfoglicerat mutaza. Na svom N-terminalnom kraju sadrži transmembransku domenu (TM) i regiju za ciljanje u mitohondrije. Aminokiselinski slijed od 9-29 aminokiseline čini transmembransku domenu koja je mjesto cijepanja proteaze PARL (Slika 6, A). Na C-terminalnom dijelu se nalazi domena PGAM, a histidin na poziciji 105 je odgovoran za fosfataznu aktivnost proteina (Takeda i sur., 2009; Wang i sur., 2012). Fosfataza PGAM5 ima više izoformi, a neke izoforme su lokalizirane na mitohondrijima te je poznato da PGAM5 stupa u interakciju s nekoliko proteina mitohondrijske membrane, kao što su DRP1 (Wang i sur., 2012), FUNDC1 (Sugo i sur., 2018), BAX (prema engl. *BCL2-associated X*) (Yamaguchi i sur., 2019) i prohibitin (Yan i sur., 2020).

Fosfataza PGAM5 tvori stabilne dimere svojim C-terminalnim krajem, dok susjedni dimeri tvore dodekamer preko očuvanog multimerizacijskog motiva (MM prema engl. *multimerization motif*) WDXNWD, smještenog na N-terminalnom kraju (Chaikuad i sur., 2017). Funkcija fosfataze PGAM5 regulirana je multimerizacijom (Chaikuad i sur., 2017; Ruiz i sur., 2019). Mutacija domene WDXNWD ometa stvaranje dodekamera PGAM5 i smanjuje aktivnost fosfataze PGAM5 (Wilkins i sur., 2014; Ruiz i sur., 2019). Svaki dodekamerični prsten je sastavljen od 6 PGAM5 dimera (Slika 6, B) (Chaikuad i sur., 2017; Ruiz i sur., 2019). Stvaranje dodekamernog prstena posredovano je međusobnom interakcijom F-dimera s α 3-dimerom. Mutacija F244E uništava F-dimer sučelje, rezultirajući potpunim gubitkom fosfatazne aktivnosti (Cheng i sur., 2021).



Slika 6. Struktura fosfatase PGAM5. (A.) Shematski prikaz ljudske PGAM5-S i PGAM5-L. Proteini koji se vežu za PGAM5-S se vežu i za PGAM5-L. (B.) Planarna struktura PGAM5 dodekamera. MM: multimerizacijski motiv, poznat kao motiv WDXNWD. Preuzeto i prilagođeno iz Cheng, 2021.

PGAM5 stupa u interakciju s receptorom vanjske mitohondrijske membrane FUNDC1 (Sugo i sur., 2018), receptorom unutarnje mitohondrijske membrane prohibitinom 2 (PHB2) (Yan i sur., 2020) te sudjeluje u PINK1/Parkin posredovanoj mitofagiji (Lu i sur., 2014). Fosfatasa PGAM5 se translocira na vanjsku mitohondrijsku membranu, veže i defosforilizira FUNDC1 pospješujući tako interakciju FUNDC1:LC3 (Sugo i sur., 2018). U uvjetima oksidacijskog stresa, depolarizacija mitohondrijske membrane dovodi do cijepanja fosfatase PGAM5, koja stabilizira PINK1 na mitohondrijima omogućavajući kinazi PINK1 novačenje proteina Parkin, potičući tako PINK1/Parkin-posredovanu mitofagiju (Yan i sur., 2020).

Koristeći miševe s uklonjenim genom PGAM5, dokazano je da nedostatak mitofagije posredovane PGAM5 djeluje poticajno na razvoj Parkinsonove bolesti (Lu i sur., 2014). Stoga bi PGAM5 moga biti dobra meta za razvoj novih terapija za različite bolesti koje u svojoj podlozi imaju poremećenu mitofagiju poput Parkinsonove bolesti (Cheng i sur., 2021).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Dokazano je da su fosforilacija i dimerizacija dva mehanizma koja su uključena u mitofagiju posredovanu receptorom BNIP3L/NIX. Brojne su fosfataze i kinaze smještene u mitohondrijima koje stupaju u interakciju s različitim receptorima mitofagije. Cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj fosfataze PGAM5 na regulaciju dimerizacije divljeg tipa receptora BNIP3L/NIX i njegovih mutanti (S212A i S212E).

3. MATERIJALI I METODE

U ovom istraživanju je korišten humani protein BNIP3L/NIX, kao i njegove mutante BNIP3L/NIXS212A i BNIP3L/NIXS212E ukлонirane u plazmidni vektor s oznakom EGFP. Konstrukt EGFP-BNIP3L/NIXS212A je mutanta u kojoj je serin zamijenjen alaninom, ali još uvijek ima mogućnost stvaranja dimera. S druge strane konstrukt EGFP-BNIP3L/NIXS212E je mutanta na kojoj je serin zamijenjen glutaminskom kiselinom te nema mogućnost dimerizacije (Marinković i sur., 2021). Uz divlji tip BNIP3L/NIX proteina i mutante proteina BNIP3L/NIX (S212A, S212E), korištena je i fosfataza PGAM5. Fosfataza PGAM5 fuzionirana je s oznakama His (pET23b/6xHis-PGAM5 (Zhuang i sur., 2013)) i FLAG (Bernkopf i sur., 2018).

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma Aldrich)

Agar (Carl Roth)

Akrlamid (AppliChem)

Albumin govedeg seruma (BSA) (Carl Roth)

Amonijev persulfat (APS) (Sigma Aldrich)

Ampicilin (Carl Roth)

Aprotinin (Sigma Aldrich)

Bakto tripton (Fluka)

Brom fenol plavo (Kemika)

Cinkov klorid (Fluka)

Dimetil sulfoksid (DMSO) (Carl Roth)Ekstrakt kvasca (Fluka)

DNaza (Koncentracija matične otopine 1 mg/mL)

Etanol (Kemika)

Etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Carl Roth)

Fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF) (Carl Roth)

Fenol crveno (Sigma Aldrich)

Fetalni goveđi serum (FBS) (GIBCO)

Glicerol (Kemika)

Glicin (Carl Roth)

Glutation sefarozne kuglice Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Science AB)

GFP-Trap agarozne kuglice (Chromotek)

Imidazol (Sigma Aldrich)

Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) (Carl Roth)

Kalcijev klorid (Kemika)

Kalijev dihidrogenfosfat (Kemika)

Kalijev klorid (Kemika)

Karbonil cijanid 3-klorofenilhidrazon (CCCP) (Sigma Aldrich)

Kloramfenikol (Sigma Aldrich)

Leupeptin (Sigma Aldrich)

Luminol Western blotting luminol reagent (Solution A i Solution B)

Magnezijev klorid (Fermentas)

Medij za uzgoj stanica u kulturi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich)

Metanol (Sigma Aldrich)

Mlijeko u prahu (Carl Roth)

Mowiol (Sigma Aldrich)

N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (Roth)

Natrijev azid (Kemika)

Natrijev dodecil sulfat (SDS) (Carl Roth)

Natrijev fluorid (Fluka)

Natrijev hidrogenfosfat heptahidrat (Kemika)

Natrijev klorid (Kemika)

Natrijev ortovanadat (Sigma Aldrich)

Ni-NTA agarozne kuglice (Qiagen)

Octena kiselina (Kemika)

Paraformaldehid (Sigma Aldrich)

Penicilin-streptomycin (GIBCO)

Ponceau S (Carl Roth)

Proteinski biljeg Protein Marker VI (10-245) prestained (AppliChem)

Saharoza (Kemika)

Tripsin-EDTA (PAA)

Tris (Sigma)

Triton-X-100 (Carl Roth)

Voda oslobođena od nukleaza (Invitrogen)

β -merkptoetanol (Fluka)

3.1.2. Aparati

Aparatura za elektroforezu Mini Protean 3 (Bio-Rad)

Aparatura za izlivanje gelova (Bio-Rad)

Centrifuga 5810 R (Eppendorf)

Centrifuga 5424 R (Eppendorf)

Fluorescencijski mikroskop CKX41 (Olympus)

Fluorescencijski mikroskop BX43 (programski alat: NIS-Elements F 4.60.00 64-bit)
(Olympus)

Inkubator Economy Incubator with fan Size 1 (GALLENKAMP)

Inkubator Heraeus Hera Cell 150 (Thermo Scientific)

Roteks General rotator STR4 (Stuart)

Sonikator SONOPULS HD 2200 (Bandelin)

Spektrofotometar DU 530 Life Science UV/VIS Spectrophotometer (BECKMAN COULTER)

Sustav za prijenos proteina Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)

Termoblok Thermo Shaker Incubator Thriller (PREQLAB)

Uređaj za imunoblot detekciju Chemi Doc XRS (programski alat: Image Lab™ 6.0.1) (Bio Rad)

Vibracijska miješalica BioVortex V1 (BIOSAN)

3.1.3. Puferske otopine

1x pufer za elektroforezu („*running buffer*“) pripremljen iz koncentrirane otopine 10x (250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS u ddH₂O)

1x pufer za prijenos („*transfer buffer*“) pripremljen iz koncentrirane otopine 10x (250 mM Tris, 2 M glicin, 20% v/v metanol u ddH₂O)

Pufer za blokiranje TBS-BSA (5% BSA, 0,1% Na-azid, fenol red u sterilnom 1x TBS-u, pH

7,4 u ddH₂O)

4x Tris-HCl/SDS pufer za sabijanje pH 6.8 (0,5 M Tris, 0,4% SDS u dH₂O)

4x Tris-HCl/SDS pufer za razdvajanje pH 8,8 (1,5 M Tris, 0,4% SDS u dH₂O)

Pufer za ispiranje membrana (1x TBS, 0,05% Tween, pH 7,4 u ddH₂O)

1x PBS napravljen iz 10x koncentrirane otopine (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 2,0 mM KH₂PO₄)

1x TBS pufer pripremljen iz koncentrirane otopine 10X (500 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5 u ddH₂O)

Pufer za lizu animalnih stanica (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 25 mM NaF, 5% glicerol, 1% NP-40 uz dodatak 20 000x DNaze I, 50x MgCl₂ i proteaznih inhibitora: 200x PMSF, 1000x aprotinin, 1000x natrijev ortovanadat i 1000x leupeptin)

Pufer za lizu bakterijskih stanica (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol)

2x pufer za nanošenje uzoraka (Leamml) (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 5,6%

SDS, 0,01% bromfenol plavo u ddH₂O)

HIS pufer za lizu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol)

HIS pufer za ispiranje (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 25 mM imidazol)

3.1.4. Osnovne otopine

5%-tna otopina mlijeka u prahu napravljena u 1x TBS puferu

Coomassie otopina (15% v/v etanol, 17% v/v octena kiselina, 0,25% v/v Coomassie brilliant blue u ddH₂O)

Otopina A (250 mM luminol, 90 mM p-kumarinska kiselina, 1M Tris-HCl, destilirana voda)

Otopina B (30% vodikov peroksid, 1M Tris-HCl, destilirana voda)

Otopina za odbojavanje Coomassie boje (20% v/v metanol, 10% v/v octena kiselina u ddH₂O)

Otopina za blokiranje (3%-tna otopina BSA napravljena u 1x PBS-u)

Otopina za fiksaciju i permeabilizaciju stanica (2%-tna otopine paraformaldehida uz dodatak 0,15% Triton X-100 napravljena u 1x PBS-u)

Ponceau S otopina (10% v/v koncentrirana octena kiselina, 0,5% v/v Ponceau S u ddH₂O)

3.1.5. Bakterijske stanice

Escherichia coli, soj DH5 α

Escherichia coli, soj pLysS BL21 (DE3)

3.1.6. Stanične linije

HEK293 humane embrionalne stanice bubrega (ATCC)

HeLa stanice adenokarcinoma cerviksa maternice (ATCC)

3.1.7. LB hranjive podloge

Za uzgoj bakterija *E. coli*, soj DH5 α koristila sam tekuću (1,0% bakto tripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 0,5% NaCl) i krutu (1,0% bakto tripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 0,5% NaCl, 0,5% agar) steriliziranu hranjivu podlogu LB (engl. *Luria-Bertani broth*). Za selekciju transformiranih bakterija, koristila sam LB podlogu u koju su ovisno o korištenom plazmidu, dodani kanamicin (Roth) konačne koncentracije 25 mg/mL (ako su bakterije transformirane plazmidom pEGFP-C1) i ampicilin (Roth) konačne koncentracije 50 mg/mL (ako je transformacija napravljena pcDNA3,1(-) plazmidom).

Za uzgoj bakterija *E. coli*, soj pLysS BL21 (DE3) transformiranih s plazmidom pET23b s prethodno ukloniranom PGAM5 sekvencom koristila sam tekuću (1,0% bakto tripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 0,5% NaCl) i krutu (1,0% bakto tripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 0,5% NaCl, 0,5% agar) steriliziranu hranjivu podlogu LB (engl. *Luria-Bertani broth*). Za selekciju transformiranih bakterija s plazmidom s PGAM5, koristila sam LB hranjivu podlogu s dodanim kloramfenikolom (koncentracije 25 μ g/mL otopljen u etanolu) i ampicilinom (koncentracije 100 μ g/mL otopljen u vodi).

3.1.8. Mediji za uzgoj stanica

Za uzgoj HeLa i HEK293 stanica u kulturi koristila sam tekuću hranjivu podlogu DMEM (prema engl. *Dulbecco`s modified Eagle`s medium*) (Sigma Aldrich) u koju je dodano 10% FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*) (GIBCO) te 1% penicilina/streptomocina (Sigma Aldrich).

3.1.9. Kompleti za transfekciju

Komplet za transfekciju jetPRIME (Polyplus transfection)

3.1.10. Protutijela

a) Primarna protutijela:

Anti-GFP monoklonalno protutijelo proizvedeno u mišu (Sigma Aldrich)

Anti-FLAG monoklonalno protutijelo proizvedeno u mišu (Sigma Aldrich)

Anti-Tom20 monoklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Santa Cruz Biotech)

b) Sekundarna protutijela:

Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conugate (Bio-Rad)

Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (Koncentracija 0,25 g/L) (Dako)

Alexa Fluor488 donkey anti-mouse IgG (H+L) (Koncentracije 2 mg/mL) (Invitrogen)

Alexa Fluor568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Koncentracije 2 mg/mL) (Invitrogen)

3.1.11. Inhibitori proteaza

Aprotinin (Koncentracija matične otopine 10 mg/mL) (Sigma Aldrich)

Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (Koncentracija matične otopine 200 mM) (Roth)

Leupeptin (Koncentracija matične otopine 1 mg/mL) (Roche)

Natrijev ortovanadat (Koncentracija matične otopine 1 M) (Sigma Aldrich)

3.1.13. Plazmidni vektori

Tablica 1. Plazmidi i njihove karakteristike korišteni u ovom radu

Vektor/Plazmid	Opis	Izvor
pEGFP-C1/BNIP3L/NIX divlji tip	GFP obilježeni humani BNIP3L/NIX	Novak i sur., 2010
pEGFP-C1/BNIP3L/NIX S212A	GFP obilježeni humani BNIP3L/NIX sa mutiranim serinom u alanin	Marinković i sur., 2021
pEGFP-C1/BNIP3L/NIX S212E	GFP obilježeni humani BNIP3L/NIX sa mutiranim serinom u glutaminsku kiselinu	Marinković i sur., 2021
pcDNA3.1(-)/FLAG-PGAM5	FLAG obilježeni PGAM5	Bernkopf i sur., 2018
Plazmid pET23b s ukloniranom PGAM5 senkvencom	za dobivanje His-PGAM5 proteina	Zhuang i sur., 2013

3.2. Metode

3.2.1 Dokazivanje interakcije proteina BNIP3L/NIX s fosfatazom PGAM5 metodom koimunoprecipitacije

Kako bih ispitala utjecaj fosfataze PGAM5 na regulaciju dimerizacije receptora BNIP3L/NIX divljeg tipa koristila sam metodu koimunoprecipitacije. Za dokazivanje potencijalne interakcije između proteina BNIP3L/NIX divljeg tipa i fosfataze PGAM5 napravila sam prekomjernu ekspresiju EGFP-BNIP3L/NIX divljeg tipa i fuzioniranih proteina FLAG-PGAM5 u stanicama HEK293. Koristila sam komercijalno dostupne agarozne kuglice GFP-Trap (Chromotek) koje specifično vežu proteine EGFP. Ukoliko postoji interakcija između proteina, vezivanjem jednog proteina na kuglice precipitira se i drugi protein. Postojanje interakcije provjeravala sam analizom *Western blot*.

3.2.1.1. Transfekcija HEK293 stanica jetPRIME kompletom i tretman CCCP-om

Transfekcija je postupak u kojem ciljano unosimo stranu DNA u eukariotsku stanicu. Postupak prolazne transfekcije napravila sam u duplikatu, na staničnoj liniji HEK293 pomoću jetPRIME kompleta. Za optimalnu transfekciju DNA, preporučuju se stanice koje su 60% do 80% konfluentne u trenutku transfekcije.

Prije transfekcije, na pločicama sa 6 bunarića nasadila sam 20 000 stanica po bunariću u 2 mL DMEM / 10% FBS / 1% penicilin/streptomycin tekuće hranjive podloge. Stanice sam uzgajala u inkubatoru na 37 °C uz 5% CO₂ do postizanja optimalne konfluentnosti za transfekciju. Stanice sam transfecirala plazmidnim DNA vektorom konstruktima s EGFP-BNIP3L/NIX (divlji tip) odnosno FLAG-PGAM5 (divlji tip). Smjesa za transfekciju sadržavala je ukupno 1 µg DNA (po 0,5 µg svakog plazmidnog konstrukta), 2 µL jetPRIME reagensa i 200 µL jetPRIME pufera. Pripremljenu smjesu sam nakon dodavanja u mikroepruvetu nakratko promiješala na vibracijskoj miješalici i centrifugirala, a zatim inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga sam smjesu za transfekciju ravnomjerno nanosila na stanice, kojima sam prethodno promijenila medij za uzgoj. Nakon 24 sata jedan dio stanica tretirala sam s 10 µM CCCP-om, a drugi s DMSO otopinom te inkubirala u inkubatoru na 37 °C, uz 5% CO₂.

3.2.1.2. Izdvajanje proteina iz HEK293 stanica

Kako bi se očuvali proteini u nativnom obliku, postupak izdvajanja proteina provodila sam na ledu u puferu za liziranje animalnih stanica. Prije početka uklonila sam medij iz bunarića te isprala stanice u 1x PBS puferu. Sadržaj svakog bunarića dobro sam resuspendirala te prebacila u mikroeprovete, a stanice su zatim lizirala u 500 µL pufera za lizu 15 minuta na ledu. Nakon inkubacije, sadržaj sam centrifugirala na 7000 x g, 20 minuta, na 4 °C kako bi se netopivi dijelovi stanice, odvojili od topivih staničnih proteina koji ostaju u supernatantu. Ukupno 100 µL otopljenih, izdvojenih proteina iz supernatanata sam izdvojila te denaturirala s 16 µL otopine 6x Leammlu pufera, zagrijavanjem u termobloku na 95 °C, 5 minuta. Denaturirane uzorke sam zajedno s ostatkom staničnog lizata pohranila na -20 °C do daljnjeg korištenja.

3.2.1.3. GFP-trap koimunoprecipitacija

Za izvođenje metode koimunoprecipitacije koristila sam komercijalno dostupne agarozne kuglice GFP-Trap (Chromotek, Njemačka) kako bi specifično vezale EGFP obilježene BNIP3L/NIX proteine kotransfecirane u stanicama. Prije korištenja, GFP-Trap agarozne kuglice pročistila sam ispiranjem tri puta u 500 µL pufera za lizu animalnih stanica te centrifugirala na 400 x g tijekom 2 minute na 4 °C. Nadalje, 2 µL agaroznih kuglica GFP-Trap sodala sam u 400 µL ukupnog staničnog lizata, a zatim smjesu inkubirala 1 sat uz rotaciju na temperaturi od 4 °C. Uzorke sam nakon inkubacije centrifugirala na 400 x g, 5 minuta na temperaturi od 4 °C. Supernatant sam uklonila, a agarozne kuglice isprala tri puta s 500 µL pufera za lizu animalnih stanica, 5 minuta na 400 x g. Nakon toga višak pufera uklonila sam inzulinskom iglicom, a agarozne kuglice GFP-Trap konačno resuspendirala u 20 µL 2x Leammlu pufera i inkubirala 5 minuta na 95 °C. Uzorke sam do nanošenja na gel pohranila na 4 °C.

3.2.1.4. Elektroforetsko razdvajanje proteina u poliakrilamidnom gelu

Razdvajanje proteina napravila sam upotrebom metode SDS-elektroforeze u poliakrilamidnom gelu, na Mini Protean III aparatu za elektroforezu (Bio-Rad). Koristila sam 10%-tni gel za razdvajanje s 4%-tni poliakrilamidnim gelom za sabijanje kojeg sam prethodno pripremila. Prethodno pripremljene uzorke nanjela sam na poliakrilamidni gel u volumenu od 20 μ L. Razdvajanje proteina provela sam na 60 V kroz gel za sabijanje i 120 V kroz gel za razdvajanje u 1x puferu za elektroforezu. Za određivanje molekulske mase proteina koristila sam proteinski standard *Protein Marker VI (10-245) prestained* (AppliChem).

3.2.1.5. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu

Za prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu koristila sam sustav za prijenos proteina Mini Trans- Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Prijenos proteina napravila sam u 1x puferu za prijenos, 90 minuta uz konstantnu jakost struje od 200 mA. Za provjeru uspješnosti prijenosa proteina na nitroceluloznu membranu, membrane sam nakratko inkubirala u boji Ponceau S koja reverzibilno boji proteine, a zatim isprala u destiliranoj vodi do pojave vidljivih vrpca koje sam dokumentirala skeniranjem.

3.2.1.6. Detekcija proteina na nitroceluloznoj membrani metodom Western blot

Nakon elektroforeze i prijenosa proteina na membranu, ciljane proteine detektirala sam *Western blot* metodom. Nitrocelulozne membrane inkubirala sam preko noći na 4 °C u TBS-BSA puferu za blokiranje. Nakon inkubacije u puferu za blokiranje membrane sam inkubirala u primarnom protutijelu (prethodno razrijeđenom u puferu za blokiranje TBS-BSA), 60 minuta, uz njihanje na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u primarnom protutijelu, membrane sam isprala 4 puta po 10 minuta u 1x TBS 0,05% Tween puferu za ispiranje membrana. Potom sam ih inkubirala 45 minuta u sekundarnom protutijelu i ispirala 4 puta po 10 minuta u puferu za ispiranje. Za kemiluminiscencijsku detekciju proteina na membrani dodala sam otopina luminola i otopina vodikovog peroksida (Otopina A i Otopina B). Membrane sam položila na prozirnu foliju i snimila ChemiDoc XRS+ uređajem te obradila u ImageLab programu.

3.2.2. Proizvodnja i pročišćavanje fuzioniranog proteina His-PGAM5 iz bakterijskih stanica *His-Pull down* metodom

Kako bi se ispitala interakcija fosfataze PGAM5 s receptorom BNIP3L/NIX divljeg tipa i njegovih mutanti (S212A, S212E) koristila sam još jednu metodu, metodu *His-Pull down*. Za ovu svrhu koristila sam fuzionirani protein His-PGAM5 kojeg sam proizvela u bakterijskim stanicama. Ispitivana PGAM5 fosfataza nosi histidinski privjesak veličine ~1 kDa, koji sadrži šest uzastopnih histidinskih ostataka (6X His-tag). Fosfatazu PGAM5 nakon proizvodnje u bakterijskim stanicama sam vezala na agarozne kuglice Ni-NTA, koje sadrže imobilizirane niklove ione na koje se specifično vežu histidinski privjesci.

3.2.2.1 Indukcija ekspresije fuzioniranog proteina His-PGAM5 u bakterijskim stanicama

Za proizvodnju 6xHis-PGAM5 fuzioniranih proteina vezanih na agarozne kuglice Ni-NTA, najprije je potrebno transformirati bakterije *E. coli*, soja pLysS BL21 (DE3) plazmidom pET23b s prethodno ukloniranom sekvencom za PGAM5, pET23b/6xHis-PGAM5 (Zhuang i sur., 2013). Transformaciju bakterija *Escherichia coli*, soja pLysS BL21 (DE3) napravila sam metodom toplinskog šoka ili „heat shock“. Pripremljeni alikvot kompetentnih bakterijskih stanica *Escherichia coli*, soja pLysS BL21 (DE3) otopila sam na ledu, a potom sam 100 μ L bakterija pomiješala s 100 ng plazmida pET23b/6xHis-PGAM5 i inkubirala 20 minuta na ledu. Nakon toga sam bakterije zajedno s plazmidnom DNA podvrgnula toplinskom tretmanu: 2 minute na temperaturi od 42 °C. Nakon toplinskog šoka, bakterije sam regenerirala u 1 mL svježe LB tekuće hranjive podloge na 37 °C, 1 sat na 450 okretaja/minuti. Nakon inkubacije, centrifugirala sam stanice 5 min na 1500 x g. Većina supernatanta sam uklonila, a bakterijski talog resuspendirala u preostalom ostatku tekućeg dijela. Bakterijsku suspenziju sam nacijepila na pripremljene krute selektivne hranjive LB podloge s odgovarajućim selekcijskim antibiotikom, tj. ampicilinom i kloramfenikolom te inkubirala u inkubatoru na 37 °C preko noći. S krute podloge inokulirala sam po jednu transformiranu bakterijsku koloniju u 25 mL tekuće LB hranjive podloge, uz dodatak ampicilina i kloramfenikola, a zatim inkubirala u inkubatoru preko noći na temperaturi od 37 °C, uz konstantnu aeraciju od 220 okretaja/minuti. Nakon prekonocne inkubacije, bakterijsku kulturu sam inokulirala u 200 mL tekuće hranjive podloge

LB, uz već spomenute antibiotike pri temperaturi od 37 °C i 220 okretaja/minuti, nakon čega sam pratila rast bakterija do postizanja optičke gustoće $OD_{600}=0,4-0,6$. Praćenje sam napravila uz pomoć spektrofotometra mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 600 nm. Prije provedene indukcije, uzela sam 100 μ L uzorka za testiranje ekspresije proteina His-PGAM5. Kako bih potaknula proizvodnju fuzioniranih proteina te odredila uvjete koji su najbolji za indukciju ekspresije, nakon postizanja odgovarajuće optičke gustoće, bakterijama sam dodala IPTG (izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid) konačne koncentracije 0,5 mM pri različitim temperaturama i rotaciji. Jedan dio bakterijske kulture (100 mL) ostavila sam preko noći na 16 °C, a drugi 4 sata na 37 °C, uz konstantno miješanje od 220 okretaja/minuti. Za provjeru uspješnosti proizvodnje proteina His-PGAM5 u bakterijskim stanicama, prije i poslije indukcije IPTG-om, uzela sam alikvoti od 200 μ l bakterijske kulture i centrifugirala 5 minuta na 1500 x g i 4 °C. Talog sam resuspendirala u 20 μ L 6x pufera za nanošenje uzorka (Leamml), uz dodatak 2-merkaptoetanolu te inkubirala 5 minuta na 95 °C u termobloku. Provjeru dobivenih rezultata za procjenu optimalnih uvjeta indukcije napravila sam na 10%-tnom poliakrilamidnom gelu. Nakon završetka elektroforeze, gel sam inkubirala u otopini Coomassie, a višak boje uklonila nakon prekonoćne inkubacije u otopini za odbojavanje.

3.2.2.2. Izdvajanje fuzioniranog HIS-PGAM5 proteina iz lizata bakterijskih stanica

Nakon završene proizvodnje proteina His-PGAM5 u bakterijskim stanicama, bakterijsku suspenziju sam centrifugirala (2000 x g, 20 minuta pri 4 °C). Supernatant sam uklonila, a talog sam na ledu resuspendirala u 10 mL pufera za liziranje bakterijskih stanica te inkubirala na ledu 1 sat. Uzorak sam sonicirala 2 minute koristeći sonikator SONOPULS HD 2200 (Bandelin) pri uvjetima sonikacije 1 sekunda puls i 1 sekunda pauze. Zatim sam dodala 50 µL 20% Triton X-100. Uzorak bakterijskog lizata inkubirala sam 30 minuta na ledu, a nakon toga centrifugirala još 30 minuta na 8000 x g, na 4 °C.

3.2.2.3. Vezanje i pročišćavanje His-PGAM5 fuzioniranog proteina

Fuzionirani proteini His-PGAM5 vezani su na agarozne kuglice Ni-NTA (Qiagen) kako bi se pročistili iz ukupnog bakterijskog lizata. Prije samog eksperimenta, agarozne kuglice Ni-NTA sam 3 puta isprala u 3 mL 1x PBS pufera (centrifugiranja izvršena pri 400 x g, 3 minute na 4 °C). U bakterijski lizat iz prethodnog dijela postupka dodala sam 200 µL ispranih agaroznih kuglica Ni-NTA koji sam potom inkubirala 60 minuta na temperaturi od 4 °C, uz konstantnu rotaciju na uređaju General rotator STR4 (Stuart). Agarozne kuglice s vezanim proteinima His-PGAM5 pročistila sam puferom za ispiranje (u kojem je dodan 25 mM imidazol), serijom centrifugiranja po 3 minute na 370 x g pri temperaturi od 4 °C. Seriju ispiranja i centrifugiranja ponovila sam 3 puta. Nakon posljednjeg centrifugiranja, supernatant sam pažljivo uklonila inzulinskom špricom, a pročišćene agarozne kuglice Ni-NTA s proteinima His-PGAM5 resuspendirala u 20 µL pufera za ispiranje (bez imidazola) i skladištene na 4 °C do primjene.

3.2.2.4. Provjera uspješnosti pročišćavanja fuzioniranog proteina His-PGAM5

Kako bih provjerila uspješnost pročišćavanja proteina His-PGAM5 iz ukupnog bakterijskog lizata te odredila volumen koji će biti prikladan za *pull-down* eksperiment, pročišćene kuglice sam analizirala elektroforezom u 10% poliakrilamidnom gelu. Testirala sam volumene od 2, 5 i 10 µL agaroznih kuglica Ni-NTA s vezanim proteinom His-PGAM5 koje

sam pomiješala s jednakim volumenom 2x Leammli pufera i inkubirala 5 minuta na 95 °C. Elektroforezu sam provela na aparaturi Mini Protean III (Bio-Rad), a koristila sam proteinski standard Protein Marker VI (10-245) (AppliChem). Razdvajanje proteina napravila sam na 80 V kroz gel za sabijanje i 120 V kroz gel za razdvajanje, u 1x puferu za elektroforezu. Nakon završetka elektroforeze, gelovi sam inkubirala u otopini Coomassie, a odbojavanje viška boje napravila preko noći uz njihanje, u otopini za odbojavanje. Na temelju dobivenih rezultata odredila sam optimalan volumen agaroznih kuglica Ni-NTA His-PGAM5 optimalan za daljnje korištenje u eksperimentu *pull-down*.

3.2.3. Dokazivanje interakcija proteina BNIP3L/NIX i fosfataze PGAM5 metodom *His-Pull down*

Kako bi se dokazale međusobne interakcije proteina EGFP-BNIP3L/NIX i njegovih mutanti (S212A i S212E) s fosfatazom PGAM5 u *in vitro* uvjetima koristila sam metodu *His Pull-down* nakon koje je slijedila detekcija metodom *Western blot*. U tu svrhu prekomjerno sam izrazila proteine EGFP-BNIP3L/NIX (divlji tip, mutante S212A i S212E) u stanicama HEK293 te koristila prethodno pročišćene agarozne kuglice Ni-NTA s imobiliziranom fosfatazom His-PGAM5. Postupak prolazne transfekcije u HEK293 stanicama napravila sam u triplikatu, a stanice sam transfecirala, kako je opisano u poglavlju 3.2.1.1. Proteini sam zatim izdvojila kako je opisano u poglavlju 3.2.1.2. Ukupni stanični lizat koristila sam u *His Pull-down* eksperimentu. Eksperiment sam napravila u tri biološka i tehnička replikata, a rezultate statistički obradila u Excelu koristeći T test.

3.2.3.1. Detekcija interakcije proteina BNIP3L/NIX i fosfataze His-PGAM5 metodom *His-Pull down*

Točno 20 μ L prethodno pripremljenih agaroznih kuglica His-PGAM5 Ni-NTA pomiješala sam s 100 μ L staničnog lizata koji prekomjerno izražava navedene fuzijske proteine EGFP-BNIP3L/NIX divljeg tipa i mutante S212A i S212E. Smjesu sam inkubirala u inkubatoru preko noći, na temperaturi od 4 °C, uz konstantnu vrtnju. Nakon završetka inkubacije, agarozne kuglice sam centrifugirala 3 minute na 2000 x g, na 4 °C. Nakon centrifugiranja supernatant sam odvojila, a talog ispirala kako bih uklonila nespecifično vezane proteine iz staničnog lizata. Postupak ispiranja napravila sam u serijama od 5 ponavljanja centrifugiranja (3 minute, 400 x g, 4 °C), odsisavanja supernatanta vaakum pumpom te resuspendiranja kuglica u 500 μ L pufera za lizu stanica. Prilikom zadnjeg uklanjanja supernatanta, koristila sam inzulinsku špricu kojom je moguće potpuno uklanjanje supernatanta. U svaku tubicu s uzorcima dodala sam po 20 μ L 2x Laemmli pufera, a zatim inkubirala u termobloku 5 minuta na 95 °C. Uzorke sam pohranila na 4 °C do nanošenja na poliakrilamidni gel. Nakon razdvajanja elektroforezom, proteine sam uz pomoć već spomenute aparature prenijela na nitroceluloznu membranu (kako sam već prethodno opisala) te vizualizirala metodom *Western blot*.

3.2.4. Statistička analiza podataka

Za statističku analizu podataka koristila sam programski alat Excel. Student T-test koristila sam za usporedbu vjerojatnosti statističke značajnosti kad sam uspoređivala jačinu vezanja fosfataze PGAM5 za monomerni i dimerni oblik proteina BNIP3L/NIX i njegovih mutanti (S212A i S212E) u His-PGAM5 *pull down* analizi (n=3). Sve vrijednosti izrazila sam kao srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju (SD) dobivenu iz tri neovisna biološka i tehnička triplikata, s granicom statističke značajnosti od $P = < 0,05$.

3.2.5 Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije fosfataze PGAM5

Kako bih pokazala da li se fosfataza PGAM5 nalazi na mitohondrijima u mojim eksperimentalnim uvjetima, koristila sam protein vanjske mitohondrijske membrane TOMM20 kao mitohondrijski biljeg u imunofluorescencijskoj detekciji pomoću fluorescentnog mikroskopa.

3.2.5.1 Transfekcija stanica HeLa za imunofluorescencijsku detekciju lokalizacije fosfataze PGAM5 i tretman CCCP-om

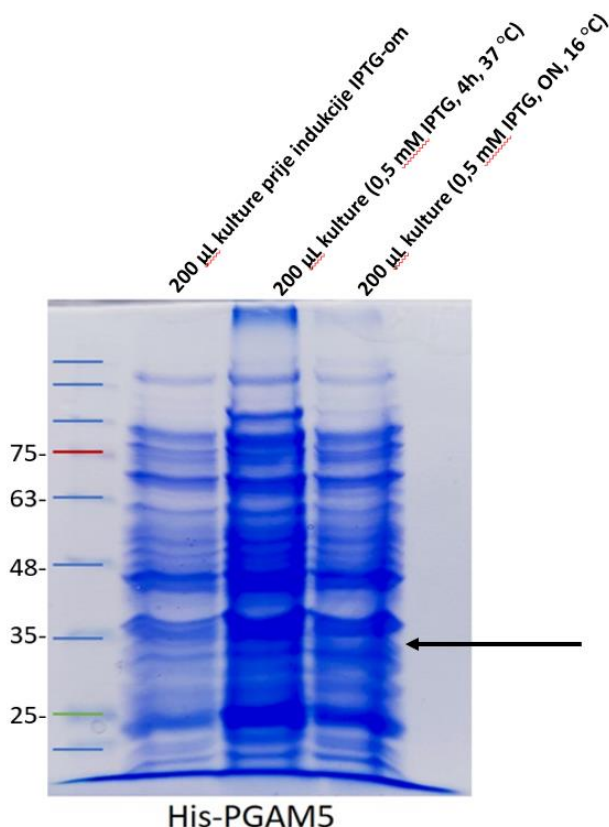
Za detekciju lokalizacije proteina PGAM5 i TOMM20 koristila sam stanice u koje sam prethodno ubacila plazmidnu DNA s sekvencom za protein FLAG-PGAM5 te sam uz pomoć protutijela vizualizirala endogeni protein TOMM20. Na autoklavirane staklene pokrovnice, promjera 18 mm, u ploči za uzgoj stanica nasadila sam HeLa stanice u 2 mL medija DMEM / 10% FBS / 1% penicilin/streptomycin. Stanice sam inkubirala preko noći u inkubatoru na 37 °C uz 5% CO₂, do postizanja optimalne konfluentnosti za transfekciju od oko 60%. Pomoću jetPRIME kompleta napravila sam transfekciju, čiji sam postupak opisala u poglavlju 3.2.1.1. Transfekcijsku smjesu pripremila sam prema uputama proizvođača. Nakon inkubacije, transfecirane stanice sam tretirala s 10 μ M CCCP, depolarizatorom mitohondrijske membrane, kako bi se potakla mitofagija (postupak sam opisala u poglavlju 3.2.1.1.). Tretmani su trajali 2 sata i 6 sati, na temperaturi od 37 °C, uz 5% CO₂. Napravila sam i kontrola u koju sam umjesto CCCP dodala DMSO. Nakon tretmana, stanice sam isprala u 1 mL 1x PBS-a te fiksirala i permeabilizirala 20 minuta u 500 μ L otopini koja sadrži 2% paraformaldehida, 1% saharoze i 0,15% Triton X-100. Pokrovnice sam zatim isprala tri puta u 500 μ L 1x PBS-a te inkubirala u

otopini za blokiranje (3%-tnoj otopini BSA), preko noći na 4 °C. Nakon prekonoćne inkubacije u otopini za blokiranje, stanice sam inkubirala u primarnom protutijelu. Stanice s prekomjerno eksprimiranim proteinom FLAG-PGAM5 sam inkubirala u monoklinalnom anti-FLAG protutijelu proizvedenom u mišu, te anti-TOMM20 monoklinalnom protutijelu proizvedenom u kuniću, 1 sat na njihalici, a potom isprala 5 puta po 10 minuta s 500 µL 1x PBS. Nakon ispiranja stanice sam inkubirala 30 minuta na njihalici u otopini sekundarnih protutijela konjugiranih s fluorokromima (Goat-anti-rabbit Alexa Fluor 568, Invitrogen i Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488, Invitrogen), otopljenih u otopini za blokiranje te konačno isprala 5 puta po 10 minuta u 1x PBS-u. Sekundarna protutijela su konjugirana fluorokromima Alexa488 (Invitrogen) čija je maksimalna emisija pri 488 nm (zeleni spektar) i Alexa568 (Invitrogen) s maksimalnom emisijom pri 568 nm (crveni spektar). Za vizualizaciju jezgara koristila sam fluorescentnu boja DAPI (0,5 µg/mL). Stanice sam u DAPI boji inkubirala 15 sekundi, a zatim isprala 5 puta u 1x PBS-u i ostavila na zraku da se osuše. Potpuno osušene pokrovnice sam uklopila u Mowiol otopinu (Sigma Aldrich). Imunofluorescencijsku detekciju sam napravila fluorescentnim mikroskopom BX43 (Olympus).

4. REZULTATI

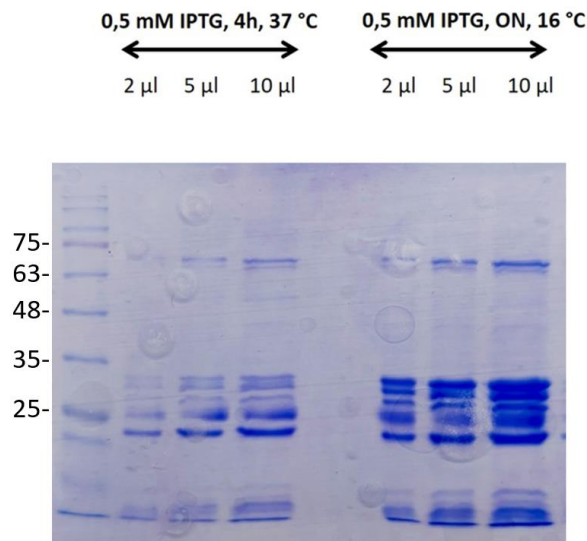
4.1 Provjera indukcije i pročišćavanja fuzioniranog proteina His-PGAM5

Pri prvoj proizvodnji proteina u bakterijskim stanicama potrebno je prvo ispitati i odrediti idealne uvjete indukcije, kao što su koncentracija IPTG-a, duljina i temperatura inkubacije. Proizvodnja proteina nakon dodatka IPTG-a je rađena pri temperaturi od 37 °C, 4 sata i pri temperaturi od 16 °C preko noći. Za provjeru uspješnosti indukcije proteina His-PGAM5 iz bakterijskog lizata, napravljena je denaturirajuća elektroforeza u 10% poliakrilamidnom gelu (Slika 7). Proteinska vrpca na 33 kDa koja odgovara veličini proteina His-PGAM5 vidljiva je u uzorku koji je bio izložen 0,5 mM IPTG-u 4 h, na 37 °C, kao i uzorku koji je bio izložen 0,5 mM IPTG-u preko noći pri 16 °C. Na temelju toga što je proteinska vrpca na odgovarajućoj veličini u uzorku s IPTG mnogo jače izražena nego u uzorcima bez IPTG-a, zaključeno je da je ekspresija proteina His-PGAM5 uspješna.



Slika 7. Provjera indukcije proteina His-PGAM5 na 10% poliakrilamidnom gelu. Protein His-PGAM5 vidljiv je na proteinskoj vrpci na 33kDa što odgovara njegovoj veličini (strelica).

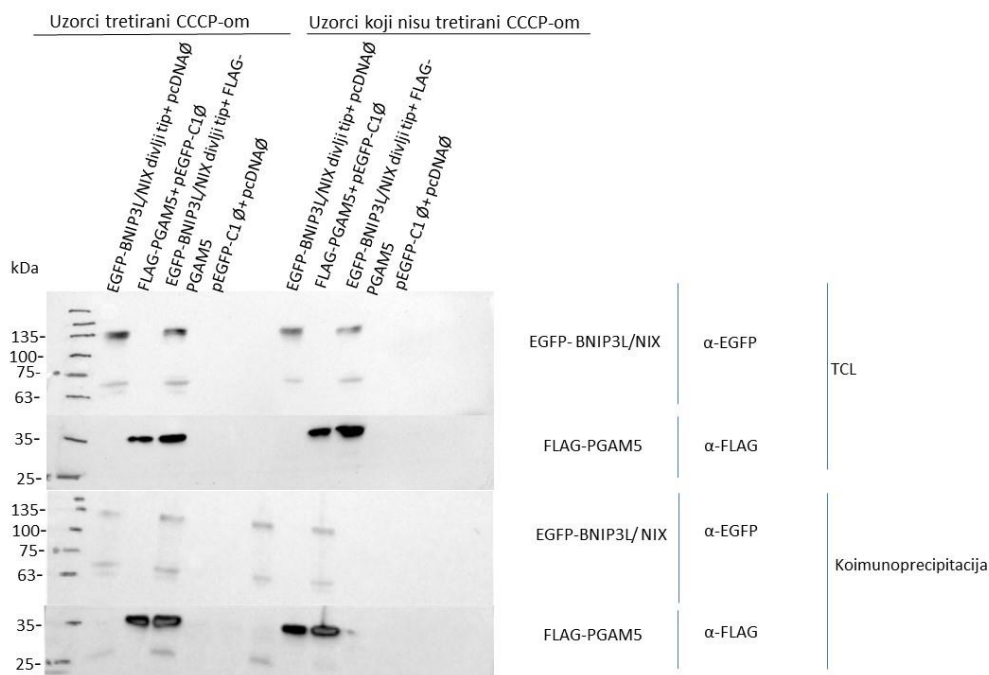
Kako bi se odredio optimalan volumen kuglica potrebnih za His *pull-down* eksperiment analizirano je 2 μ L, 5 μ L i 10 μ L pročišćenih His-PGAM5 agaroznih kuglica Ni-NTA (Slika 8). Za optimalan volumen kuglica za eksperiment His *Pull-down* određen je volumen od 10 μ L.



Slika 8. Provjera pročišćavanja proteina His-PGAM5 na Ni-NTA agaroznim kuglicama.

4.2 Utvrđivanje ekspresije proteina EGFP-BNIP3L/NIX i FLAG-PGAM5 te provjera njihove interakcije metodom koimunoprecipitacije

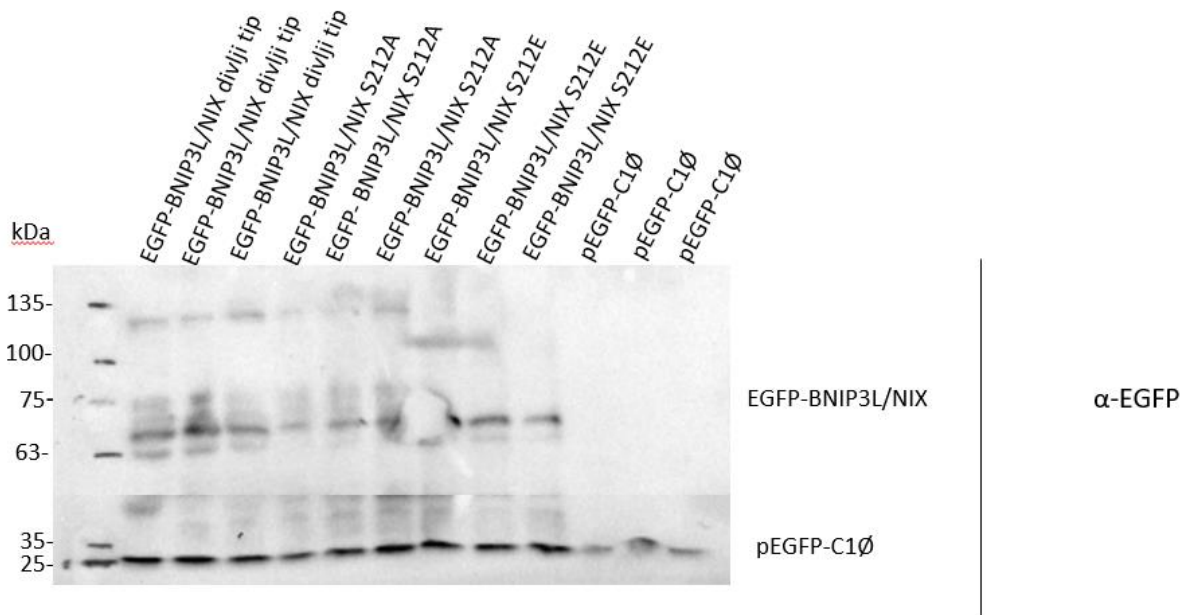
Rezultati *Western blot* analize ekspresije EGFP-BNIP3L/NIX i FLAG-PGAM5 proteina pokazuju uspješnost transfekcije koja je prethodila eksperimentu koimunoprecipitacije. Potvrđena je ekspresija u svakom uzorku, gdje je izražen fuzionirani EGFP-BNIP3L/NIX (detekcija anti EGFP protutijelima; Slika 9, panel 1), kao i ekspresija FLAG-PGAM5 (detekcija anti-FLAG protutijelima; Slika 9, panel 2). Konstrukti EGFP-BNIP3L/NIX divljeg tipa (WT) detektirani su i u monomernom (oko 70 kDa) i dimernom (oko 130 kDa) obliku. Potvrđena je uspješnost vezanja EGFP-BNIP3L/NIX proteina na GFP-Trap agarozne kuglice (Slika 9, panel 3). Analizom rezultata koimunoprecipitacije, signal koji se javio u liniji u kojoj je kontransfekcija EGFP-BNIP3L/NIX i FLAG-PGAM5 potvrđuje interakciju proteina BNIP3L/NIX s fosfatazom PGAM5 (Slika 9, panel 4), no postoji signal i u liniji FLAG-PGAM5 i praznog plazmida pEGFP-C1Ø.



Slika 9. Detekcija ekspresije i interakcije EGFP-BNIP3L/NIX divljeg tipa s proteinom FLAG-PGAM5 Western blot imunodetekcijom. Prvi panel prikazuje potvrđenu ekspresiju proteina EGFP-BNIP3L/NIX u monomernom i dimernom obliku u ukupnom staničnom lizatu, TCL (prema engl. *total cell lysate*) s primarnim protutijelom na anti-EGFP, dok drugi panel prikazuje protein FLAG-PGAM5 detektiran primarnim protutijelom anti-FLAG. Rezultat koimunoprecipitacije je prikazan na trećem panelu, gdje su prikazani proteini EGFP-BNIP3L/NIX vezani na GFP-Trap agarozne kuglice, detektirani u monomernom i dimernom obliku. Četvrti panel prikazuje interakciju proteina BNIP3L/NIX i PGAM5.

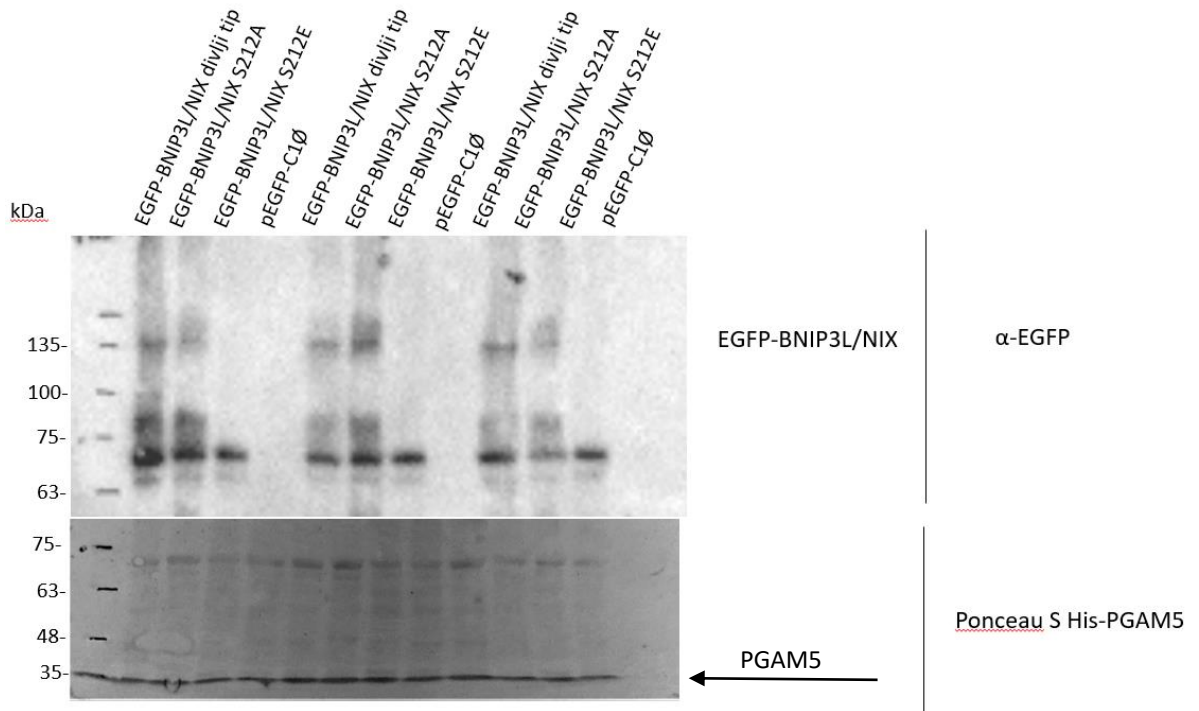
4.3 Utvrđivanje ekspresije proteina EGFP-BNIP3L/NIX i njegovih mutanti S212A i S212E te provjera interakcije s fuzioniranim proteinima His-PGAM5 metodom *Pull down*

Rezultati *Western* imunodetekcije ekspresije proteina EGFP-BNIP3L/NIX i njegovih mutanti (S212A i S212E) pokazuju uspješnost izvedenog eksperimenta gdje je u svakom uzorku gdje je izražen EGFP-BNIP3L/NIX divljeg tipa i njegove mutante EGFP-BNIP3L/NIXS212A i EGFP-BNIP3L/NIXS212E potvrđena njegova ekspresija (detekcija anti-GFP protutijelima) (Slika 10, gornji panel). Konstrukti EGFP-BNIP3L/NIX divljeg tipa i mutante S212A javljaju se i u monomernom (70 kDa) i dimernom obliku (130 kDa), dok se mutanta BNIP3L/NIXS212E detektira samo kao monomer. Prazni plazmid pEGFP-C1Ø koji izražava samo protein EGFP velik je oko 35 kDa (Slika 10, donji panel).



Slika 10. Provjera ekspresije konstrukata *Western blot* analizom. Gornji panel prikazuje detekciju ekspresije proteina EGFP-BNIP3L/NIX, EGFP-BNIP3L/NIXS212A i EGFP-BNIP3L/NIXS212E u ukupnom staničnom lizatu primarnim protutijelom na EGFP, napravljenu u triplikatu. Donji panel prikazuje prazni plazmid pEGFP-C1Ø koji izražava samo protein EGFP velik je oko 35 kDa.

Prema rezultatima analize *Western blot* vidljivo je da u uzorcima inkubiranim s His-PGAM5 agaroznim kuglicama Ni-NTA postoji interakcija s proteinom EGFP-BNIP3L/NIX divljeg tipa, te mutantama EGFP-BNIP3L/NIXS212A i EGFP-BNIP3L/NIXS212E (Slika 11, gornji panel). Rezultat bojanja membrane Ponceau S bojom potvrđuju kako su uzorci pravilno i u jednakoj količini korišteni u eksperimentu (Slika 11, donji panel).

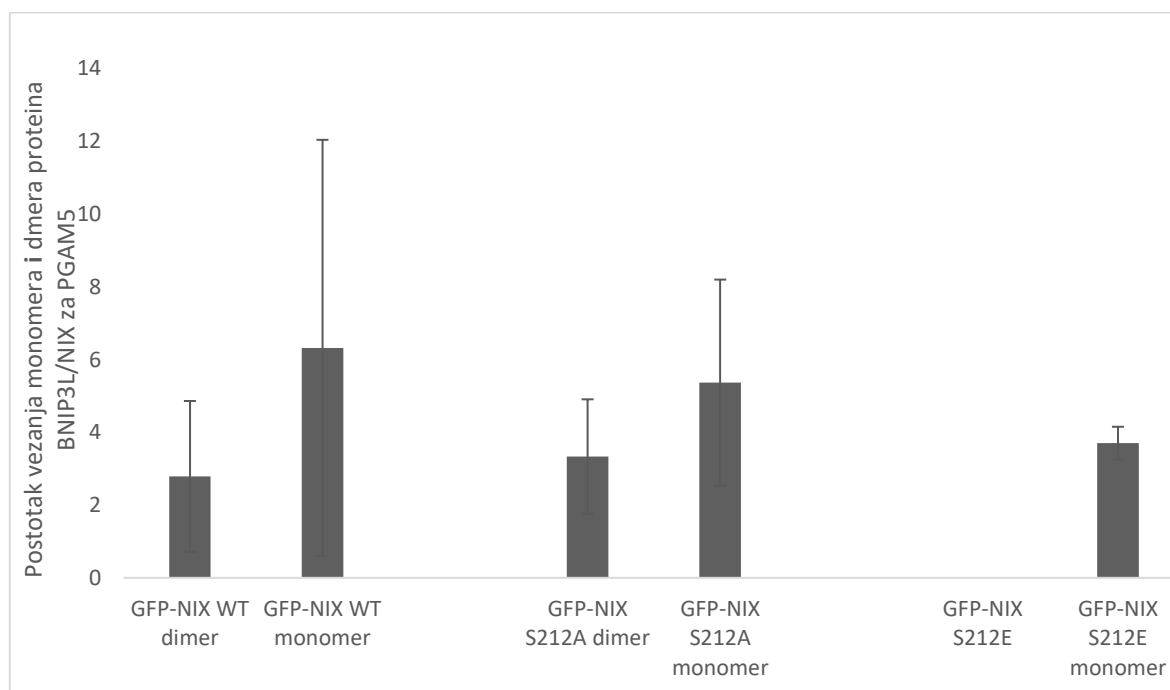


Slika 11. *Western blot* imunodetekcija interakcije proteina EGFP-BNIP3L/NIX i /His-PGAM5, EGFP-BNIP3L/NIXS212A i His-PGAM5 i EGFP-BNIP3L/NIXS212E i His-PGAM5 u lizatu HEK293 stanica i bojenje bojom Ponceau S, napravljena u triplikatu. Gornji panel prikazuje *Western blot* imunodetekciju nakon inkubacije s primarnim protutijelom na EGFP. Donji panel predstavlja membranu obojenu Ponceau S nakon inkubacije uzorka s His-PGAM5.

4.4. Analiza rezultata metode *Pull down* vezanja proteina BNIP3L/NIX i fosfataze PGAM5

Dokazano je da defosforilacija serina 212 na C-terminalnom dijelu omogućava stvaranje stabilnog homodimera receptora BNIP3L/NIX, pospješujući time intezitet mitofagije. His-PGAM5 *pull down* metodom je ispitana interakcija receptora BNIP3L/NIX divljeg tipa i njegovih mutanti (S212A i S212E). Analizom podataka, ustanovljeno je da rezultati nisu statistički značajni ($P = > 0,05$), ali se vidi razlika u tendenciji vezanja dimernog i monomernog oblika receptora prema fosfatazi PGAM5.

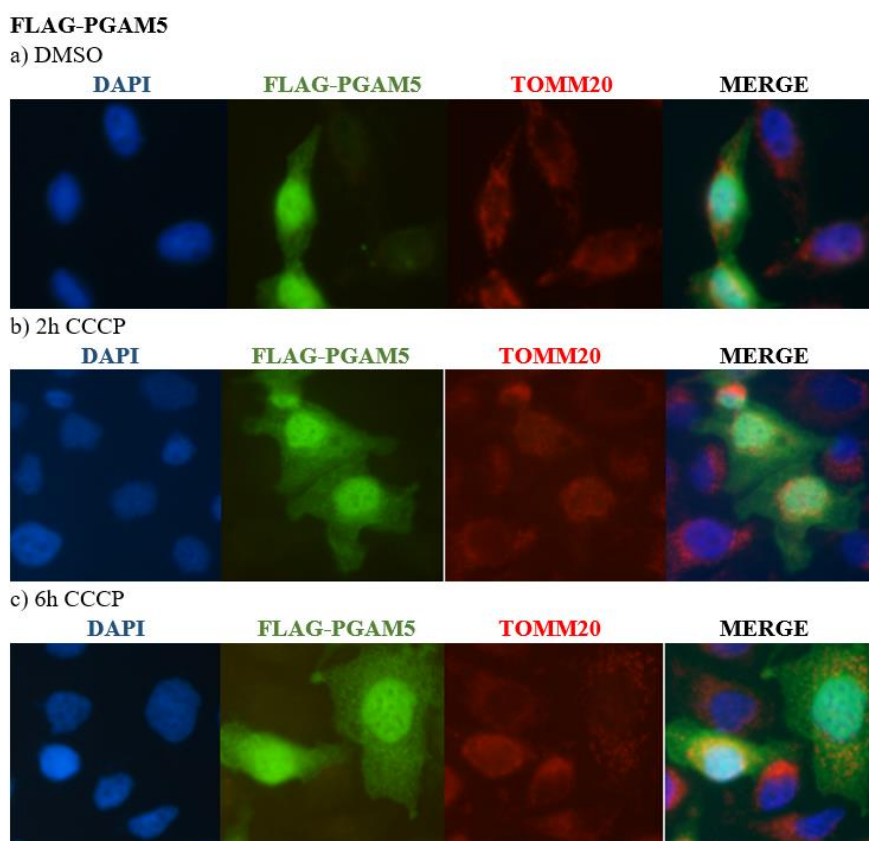
Usporedbom učinkovitosti vezanja fosfataze PGAM5 između dimernog i monomernog oblika receptora BNIP3L/NIX, trend kod divljeg tipa BNIP3L/NIX i BNIP3L/NIX S212A mutante ide u korist monomera (Slika 12). I divlji tip i mutanta BNIP3L/NIX S212A pokazuju veću tendenciju vezanja PGAM5 fosfataze na monomerni u odnosu na dimerni oblik. BNIP3L/NIX S212E mutanta se javlja samo u monomernom obliku pa stoga nema mogućnosti usporedbe jačine vezanja između monomernog i dimernog oblika.



Slika 12. Prikaz analize vezanja fosfataze PGAM5 između monomernog i dimernog oblika BNIP3L/NIX proteina divljeg tipa (WT) i njegovih mutanti BNIP3L/NIX S212A i BNIP3L/NIX S212E. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD tri neovisna biološka i tehnička replikata. Statistička analiza provedena je u Excelu korištenjem T testa. Statistička značajnost: $*P = > 0,05$; $n=3$.

4.5. Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije fosfataze PGAM5

U svrhu proučavanja interakcije receptora BNIP3L/NIX i fosfataze PGAM5, nužno je provjeriti pravilnu lokalizaciju fosfataze PGAM5 na mitohondrijima. Fosfataza FLAG-PGAM5 je prekomjerno izražena u stanicama HeLa, a lokalizacija je određena prema lokalizaciji proteina vanjske mitohondrijske membrane TOMM20. Detektiranje lokalizacije napravljeno je u normalnim uvjetima, bez dodatka CCCP-a kao i u uvjetima inducirane mitofagije, s CCCP-om u trajanju od 2 i 6 sati. Analizom rezultata je potvrđena djelomična kolokalizacija fosfataze PGAM5 na mitohondrije u uvjetima kada se stanice tretiraju CCCP-om 6 sati (Slika 13, c).



Slika 13. Imunofluorescencijska detekcija lokalizacije FLAG-PGAM5 i endogenog proteina TOMM20 nakon tretmana CCCP-om otopljenim u DMSO (nešto u tom stilu). Jezgre su obojene DAPI bojom (plavo), protein FLAG-PGAM5 je predstavljen zelenom bojom, a endogeni protein TOMM20 crvenom. Lokalizacija FLAG-PGAM5 i TOMM20 prikazuje se žutim obojenjem. MERGE-preklopljeno.

5. RASPRAVA

Protein vanjske mitohondrijske membrane BNIP3L/NIX djeluje kao receptor mitofagije. Do sada je otkriveno nekoliko važnih mehanizama za aktivaciju selektivnog mitofagijskog receptora BNIP3L/NIX kao i posljedično jaču indukciju i intezitet same mitofagije. Uz fosforilaciju domene LIR i dimerizaciju receptora uz pomoć transmembranske domene, otkriveno je da fosforilacija aminokiseline serin 212 rezultira gubitkom dimerizacije, a time i posljedično smanjenim intezitetom mitofagije, odnosno aktivacije receptora BNIP3L/NIX (Marinković i sur., 2021). Marinković i sur. (2021) su procijenili fiziološki i funkcionalni značaj dimerizacije receptora BNIP3L/NIX analizom C-terminalnog kraja. C-terminalni kraj se sastoji od 11 aminokiselina, lokalizira se u međumembranski mitohondrijski prostor, te sadrži više od 50% aminokiselina koje mogu biti podvrgnute fosforilaciji. Rezultati istraživanja pokazali su da fosforilacija C-terminalnog kraja receptora BNIP3L/NIX i posljedični gubitak dimerizacije smanjuju indukciju mitofagije posredovane receptorom BNIP3L/NIX (Marinković i sur., 2021).

Pretpostavlja se da bi potencijalna fosfataza koja uklanja serin na poziciji 212 bi trebala moći doći do C-terminalnog dijela BNIP3L/NIX receptora koji je izložen u međumembranski prostor pa se kao jedna od potencijalnih fosfataza nametnula upravo PGAM5. Ovaj diplomski rad je nastavak istraživanja Marinković i sur., stoga je cilj ovog istraživanja utvrditi stupa li fosfataza PGAM5 u interakciju s receptorom BNIP3L/NIX i njegovim mutantama S212A i S212E. Ovim istraživanjem je metodom koimunoprecipitacije i *His-Pull down* ispitana potencijalna interakcija proteina BNIP3L/NIX i njegovih mutanti (S212A i S212E) s fosfatazom PGAM5, a statističkom analizom rezultata *pull down* metode dodatno je analizirana jačina vezanja fosfataze PGAM5 za monomerni i dimerni oblik proteina BNIP3L/NIX i njegovih mutanti. Metodom imunofluorescencijske mikroskopije dodatno je istraženo da li u uvjetima inducirane mitofagije fosfataza PGAM5 dolazi na mitohondrije.

Za istraživanje je korišten humani protein BNIP3L/NIX prethodno ukloniran u plazmidni vektor s EGFP oznakom (Novak i sur. 2010) kako bi bila moguća vizualna provjera uspješnosti transfekcije, a odabrana fosfataza PGAM5 je fuzionirana s oznakom FLAG. Prethodno opisanim metodama proučavana je interakcija FLAG-PGAM5 s konstruktom proteina EGFP-BNIP3L/NIX. Prema rezultatima koimunoprecipitacije fosfataze PGAM5 (FLAG-PGAM5) s proteinom BNIP3L/NIX (EGFP-BNIP3L/-NIX) vidljiva je proteinska

interakcija. Iz ukupnog staničnog lizata vidljiv je protein BNIP3L/NIX i FLAG-PGAM5 čime je potvrđena uspješnost provedene transfekcije (Slika 9, prvi i drugi panel). Analizom Western blota, vidljivo je da su dobiveni rezultati jednaki i za uzorke ukupnog staničnog lizata i za uzorke inkubirane s agaroznim kuglicama GFP-Trap čime je potvrđeno kako se fuzionirani protein EGFP-BNIP3L/NIX nalazi u jednakim oblicima u oba uzorka (Slika 9, prvi i treći panel). Signal FLAG-PGAM5 je vidljiv nakon inkubacije s agaroznim kuglicama GFP-Trap, što je moguća posljedica zaostalog taloga nastalog zbog nedovoljno dobro napravljene stanične lize ili nedovoljnog ispiranja uzorka u procesu precipitacije (Slika 9, panel 4). Zaključno, metodom koimunoprecipitacije je dokazano da protein BNIP3L/NIX stupa u interakciju s fosfatazom PGAM5 (Slika 9, panel 3). Također, pokazano je i da dimerizacijske mutante proteina BNIP3L/NIX (S212A i S212E) vežu PGAM5 (Slika 11, gonji panel).

Fosfataza PGAM5 (His-PGAM5) je zatim izražena u bakterijskim stanicama, vezana za agarozne kuglice Ni-NTA u svrhu njenog pročišćavanja, te testirana s konstruktima proteina BNIP3L/NIX (EGFP-BNIP3L/NIX) divljeg tipa i njegovim mutantama S212A i S212E. Uspješnost transfekcije stanica konstruktima EGFP-BNIP3L/NIX u uzorcima ukupnog staničnog lizata potvrđena je analizom Western blota (Slika 10. gornji i donji panel). Proteini BNIP3L/NIX i BNIP3L/NIXS212A su detektirani prema očekivanom u monomernom i dimernom obliku, a protein BNIP3L/NIXS212E u monomernom (Marinković i sur., 2021). Slijedom toga pravilnost izvođenja *His-Pull down* metode potvrđena je bojanjem membrane Ponceau S bojom (Slika 11. donji panel) gdje se potvrđuje ravnomjerno dodavanje His-PGAM5 agaroznih kuglica Ni-NTA. Iz rezultata analize Western blot metode *His-Pull down* jasno se vidi kako su testirani proteini u međusobnoj interakciji (Slika 11. gornji panel). Rezultati metode *His-Pull down* pokazuju signale proteina EGFP-BNIP3L/NIX u svim njegovim oblicima što potvrđuje kako je protein BNIP3L/NIX u interakciji s fosfatazom PGAM5 s obzirom da su iz ukupnog staničnog lizata izdvojeni zajedno. Dobiveni rezultati pokazuju kako je fosfataza PGAM5 u interakciji i s monomernim i dimernim oblikom proteina BNIP3L/NIX. Monomerni oblik pronalazimo na oko 70 kDa, a dimerni na oko 130 kDa.

Nadalje, rezultati dobiveni kvantifikacijom *His-Pull down* analize nisu statistički značajni, ali pokazano je da monomerni oblik proteina BNIP3L/NIX divljeg tipa i mutante S212A pokazuje tendenciju jačeg vezanja fosfataze PGAM5 od dimernog oblika (Slika 12). Ovakav rezultat je očekivan budući da je postavljena izvorna hipoteza da fosfataza PGAM5 prepoznaje monomerni oblik BNIP3L/NIX proteina, skida fosfat kako bi se nefosforilirani protein mogao dimerizirati. Mutanta S212E se pojavljuje samo kao monomerni oblik, te kod

nje nema mogućnosti usporedbe jačine vezanja fosfataze PGAM5 između monomernog i dimernog oblika. Za navedene uzorke je standardna devijacija velika, stoga bi povećanjem broja ponovljenih eksperimenata mogli ovu tendenciju povećati da bude statistički značajna.

Imunofluorescencijskom mikroskopijom testirana je stanična lokalizacija fosfataze PGAM5. TOMM20 je protein vanjske mitohondrijske membrane te se kao takav koristi kao biljeg mitohondrija. Budući da je cilj ovog rada ispitati potencijalnu ulogu, odnosno interakciju fosfataze PGAM5 i receptora BNIP3L/NIX, vrlo je važno ustanoviti da li se promatrana fosfataza PGAM5 uopće nalazi na mitohondrijima u uvjetima inducirane mitofagije. Kolokalizacija proteina PGAM5 i TOMM20 određena je preklapanjem kanala Alexa488 (za FLAG-PGAM5) i Alexa 568 (za TOMM20). Korištene su dvije pseudoboje, zelena za FLAG-PGAM5 i crvena boja za TOMM20, pa ukoliko se oba proteina nalaze na istom mjestu u stanici preklapanjem kanala dobije se žuto obojenje. Kolokalizacija ovih dvaju proteina promatrana je u normalnim uvjetima, bez prisutnosti induktora mitofagije, kemikalije CCCP i u uvjetima inducirane mitofagije djelovanjem depolarizatora mitohondrijske membrane, CCCP-a, nakon dva i šest sati. U uvjetima bez indukcije mitofagije, mitohondriji su cjevastog oblika i tvore dinamičnu mitohondrijsku mrežu. Djelovanjem CCCP-a gubi se mitohondrijska dinamika i mitohondriji se fragmentiraju (Karbowski i Youle, 2003). Duljinom trajanja tretmana povećava se stupanj fragmentiranosti mitohondrija. U uvjetima inducirane mitofagije (6 sati), mitohondrijska lokalizacija fosfataze PGAM5 se djelomično mijenja budući da je jedan manji dio fosfataze FLAG-PGAM5 vidljiv na fragmentiranim mitohondrijima (Slika 13c). Dobiveni rezultati ukazuju da u induciranim uvjetima mitofagije postoji na promjenu lokalizacije proteina PGAM5 iz citosola na mitohondrije. Stoga je zaključeno da fosfataza PGAM5 pokazuje djelomičnu kolokalizaciju s proteinom TOMM20 nakon 6 sati izloženosti CCCP-u (Slika 13, c) MERGE) (Slika 13).

S obzirom da je ranije istraživanje pokazalo kako fosforilacija aminokiseline serin 212 dovodi do gubitka dimerizacije proteina BNIP3L/NIX i smanjenog inteziteta mitofagije (Marinković i sur., 2021) rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju kako bi fosfataza PGAM5 uistinu mogla biti fosfataza koja defosforilira serin 212 proteina BNIP3L/NIX omogućavajući dimerizaciju proteina BNIP3L/NIX i posljedično snažnijeg prepoznavanja proteina ATG8/LC3/GABARAP i BNIP3L/NIX i većeg inteziteta mitofagije posredovane receptorom BNIP3L/NIX.

U ovom diplomskom radu interakcija receptora BNIP3L/NIX i fosfataze PGAM5 testirana je koristeći tri konstrukta proteina BNIP3L/NIX te je fosfataza u interakciji sa svakim od njih. U daljnjim istraživanjima, slijedom navedenog, kako bi se zaista utvrdilo da je fosfataza PGAM5 odgovorna za defosforilaciju proteina BNIP3L/NIX, osim dodatne potvrde interakcije, potrebno je napraviti analizu kojom bi se izmjerila aktivnost pročišćene fosfataze i njezin učinak na defosforilaciju proteina BNIP3L/NIX *in vitro*. Zaključno, za potvrdu fiziološke uloge fosfataze PGAM5 na defosforilaciju proteina BNIP3L/NIX potrebno je u *in vivo* uvjetima dokazati djelotvornost fosfataze na aktivnost proteina BNIP3L/NIX mjerenjem aktivacije i progresije mitofagije.

Važno je istaknuti da se uloga fosfataze PGAM5 tek nedavno počela istraživati, a nametnula se kao novi regulator mitohondrijske homeostaze. Fosfataza PGAM5 je uključena u regulaciju mitohondrijske fizije (Wang i sur., 2015), apoptoze (Yang i sur., 2017; Hashino i sur., 2022), biogeneze (Bernkopf i sur., 2018), i stupa u interakciju sa brojnim receptorima mitofagije, receptorom vanjske mitohondrijske membrane FUNDC1 (Chen i sur., 2014) i receptorom unutrašnje mitohondrijske membrane, Prohibitin 2 (Yan i sur., 2020). Također, uključena je i u regulaciju PINK1/PARKIN-posredovane mitofagije (Lu i sur., 2014). Otkrivanje fosfataze PGAM5 i njenih proteinskih partnera trebalo bi omogućiti točniju procjenu oštećenja mitohondrija i metodu za dijagnostiku i liječenje bolesti. Fosfataza PGAM5 može predstavljati potencijalni terapijski cilj za moždani udar, infarkt miokarda i brojne druge bolesti uzrokovane oksidativnim oštećenjem i nekroptozom (Lu i sur., 2016).

6. ZAKLJUČAK

- Fosfataza PGAM5 stupa u interakciju s divljim tipom proteina BNIP3L/NIX i njegovim mutantama BNIP3L/NIX S212A i BNIP3L/NIX S212E. Monomerni oblik proteina BNIP3L/NIX divljeg tipa i mutanta BNIP3L/NIX S212A pokazuju tendenciju jačeg vezanja fosfataze PGAM5 za razliku od svog dimernog oblika.
- Pokazana je djelomična kolokalizacija fosfataze PGAM5 s proteinom TOMM20 u uvjetima inducirane mitofagije, tj. nakon 6 sati izloženosti CCCP-u.

7. LITERATURA

Antón, Z., Landajueta, A., Hervás, J. H., Montes, L. R., Hernández-Tiedra, S., Velasco, G., Goñi, F. M., & Alonso, A. (2016). Human Atg8-cardiolipin interactions in mitophagy: Specific properties of LC3B, GABARAPL2 and GABARAP. *Autophagy*, *12*(12), 2386–2403. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1240856>

Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., & Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, *182*(4), 685–701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>

Barnwal, B., Karlberg, H., Mirazimi, A., & Tan, Y. J. (2016). The Non-structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(2), 582–592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.667436>

Battu, S., Afroz, S., Giddaluru, J., Naz, S., Huang, W., Khumukcham, S. S., Khan, R. A., Bhat, S. Y., Qureshi, I. A., Manavathi, B., Khan, A. A., August, A., Hasnain, S. E., & Khan, N. (2018). Amino acid starvation sensing dampens IL-1 β production by activating riboclustering and autophagy. *PLoS Biology*, *16*(4), e2005317. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005317>

Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(10), 2570–2581. <https://doi.org/10.1128/MCB.00166-09>

Bernkopf, D. B., Jalal, K., Brückner, M., Knaup, K. X., Gentzel, M., Schambony, A., & Behrens, J. (2018). Pgam5 released from damaged mitochondria induces mitochondrial biogenesis via Wnt signaling. *The Journal of Cell Biology*, *217*(4), 1383–1394. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708191>

Bhujabal, Z., Birgisdottir, Å. B., Sjøttem, E., Brenne, H. B., Øvervatn, A., Habisov, S., Kirkin, V., Lamark, T., & Johansen, T. (2017). FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO Reports*, *18*(6), 947–961. <https://doi.org/10.15252/embr.201643147>

Bronietzki, A. W., Schuster, M., & Schmitz, I. (2015). Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunology and Cell Biology*, *93*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.81>

Carew, J. S., Zhou, Y., Albitar, M., Carew, J. D., Keating, M. J., & Huang, P. (2003). Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. *Leukemia*, *17*(8), 1437–1447. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403043>

Chaikuad, A., Filippakopoulos, P., Marcisin, S. R., Picaud, S., Schröder, M., Sekine, S., Ichijo, H., Engen, J. R., Takeda, K., & Knapp, S. (2017). Structures of PGAM5 Provide Insight into Active Site Plasticity and Multimeric Assembly. *Structure (London, England: 1993)*, *25*(7), 1089–1099.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.05.020>

Chan, N. C., Salazar, A. M., Pham, A. H., Sweredoski, M. J., Kolawa, N. J., Graham, R. L., Hess, S., & Chan, D. C. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human Molecular Genetics*, *20*(9), 1726–1737. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr048>

Chen, G., Cizeau, J., Vande Velde, C., Park, J. H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D., & Greenberg, A. (1999). Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(1), 7–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.7>

Chen, G., Han, Z., Feng, D., Chen, Y., Chen, L., Wu, H., Huang, L., Zhou, C., Cai, X., Fu, C., Duan, L., Wang, X., Liu, L., Liu, X., Shen, Y., Zhu, Y., & Chen, Q. (2014). A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Molecular Cell*, *54*(3), 362–377. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.034>

Cheng, M., Lin, N., Dong, D., Ma, J., Su, J., & Sun, L. (2021). PGAM5: A crucial role in mitochondrial dynamics and programmed cell death. *European Journal of Cell Biology*, *100*(1), 151144. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151144>

Chinnadurai, G., Vijayalingam, S., & Gibson, S. B. (2008). BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene*, *27 Suppl 1*, S114–S127. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.49>

Costello, M. J., Brennan, L. A., Basu, S., Chauss, D., Mohamed, A., Gilliland, K. O., Johnsen, S., Menko, S., & Kantorow, M. (2013). Autophagy and mitophagy participate in ocular lens organelle degradation. *Experimental Eye Research*, *116*, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.08.017>

Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, *150*(1), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>

Di Rita, A., Peschiaroli, A., D Acunzo, P., Strobbe, D., Hu, Z., Gruber, J., Nygaard, M., Lambreghe, M., Melino, G., Papaleo, E., Dengjel, J., El Alaoui, S., Campanella, M., Dötsch, V., Rogov, V. V., Strappazzon, F., & Cecconi, F. (2018). HUWE1 E3 ligase promotes PINK1/PARKIN-independent mitophagy by regulating AMBRA1 activation via IKK α . *Nature Communications*, *9*(1), 3755. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05722-3>

Ding, W. X., Li, M., Chen, X., Ni, H. M., Lin, C. W., Gao, W., Lu, B., Stolz, D. B., Clemens, D. L., & Yin, X. M. (2010). Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology*, *139*(5), 1740–1752. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.07.041>

Diwan, A., Matkovich, S. J., Yuan, Q., Zhao, W., Yatani, A., Brown, J. H., Molkenin, J. D., Kranias, E. G., & Dorn, G. W., 2nd (2009). Endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in NIX-mediated murine cell death. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(1), 203–212. <https://doi.org/10.1172/JCI36445>

Doblado, L., Lueck, C., Rey, C., Samhan-Arias, A. K., Prieto, I., Stacchiotti, A., & Monsalve, M. (2021). Mitophagy in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(8), 3903. <https://doi.org/10.3390/ijms22083903>

Füllgrabe, J., Ghislat, G., Cho, D. H., & Rubinsztein, D. C. (2016). Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, *129*(16), 3059–3066. <https://doi.org/10.1242/jcs.188920>

Gronowicz, G., Swift, H., & Steck, T. L. (1984). Maturation of the reticulocyte in vitro. *Journal of Cell Science*, *71*, 177–197. <https://doi.org/10.1242/jcs.71.1.177>

Hall, A. R., Burke, N., Dongworth, R. K., & Hausenloy, D. J. (2014). Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology*, *171*(8), 1890–1906. <https://doi.org/10.1111/bph.12516>

Huang, F., Wang, B. R., & Wang, Y. G. (2018). Role of autophagy in tumorigenesis, metastasis, targeted therapy and drug resistance of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, *24*(41), 4643–4651. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i41.4643>

Imazu, T., Shimizu, S., Tagami, S., Matsushima, M., Nakamura, Y., Miki, T., Okuyama, A., & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene*, *18*(32), 4523–4529. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202722>

Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., & Kominami, E. (2006). Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(7), 4035–4041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512283200>

Karbowski, M., & Youle, R. J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, *10*(8), 870–880. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401260>

Kazlauskaitė, A., Kondapalli, C., Gourlay, R., Campbell, D. G., Ritorto, M. S., Hofmann, K., Alessi, D. R., Knebel, A., Trost, M., & Muqit, M. M. (2014). Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *The Biochemical Journal*, *460*(1), 127–139. <https://doi.org/10.1042/BJ20140334>

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr, Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., & Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, *5*(4), 539–545. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00296-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00296-x)

Komatsu, M. et al. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* *131*, 1149–1163.

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., & Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature cell biology*, *10*(5), 602–610. <https://doi.org/10.1038/ncb1723>

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, *87*(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>

Kudchodkar, S. B., & Levine, B. (2009). Viruses and autophagy. *Reviews in Medical Virology*, *19*(6), 359–378. <https://doi.org/10.1002/rmv.630>

Lemasters J. J. (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Research*, 8(1), 3–5. <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.3>

Levine B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*, 120(2), 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.005>

Lilienbaum A. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4(1), 1–26.

Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., Chen, Q. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 14(2), 177–185. <https://doi.org/10.1038/ncb2422>

Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O., & Hajnóczky, G. (2009). Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *The EMBO Journal*, 28(20), 3074–3089. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.255>

Lu, W., Karuppagounder, S. S., Springer, D. A., Allen, M. D., Zheng, L., Chao, B., Zhang, Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Lenardo, M. (2014). Genetic deficiency of the mitochondrial protein PGAM5 causes a Parkinson's-like movement disorder. *Nature Communications*, 5, 4930. <https://doi.org/10.1038/ncomms5930>

Lu, W., Sun, J., Yoon, J. S., Zhang, Y., Zheng, L., Murphy, E., Mattson, M. P., & Lenardo, M. J. (2016). Mitochondrial Protein PGAM5 Regulates Mitophagic Protection against Cell Necroptosis. *PloS one*, 11(1), e0147792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147792>

MacIntosh, G. C., & Bassham, D. C. (2011). The connection between ribophagy, autophagy and ribosomal RNA decay. *Autophagy*, 7(6), 662–663. <https://doi.org/10.4161/auto.7.6.15447>

Mandhair, H. K., Novak, U., & Radpour, R. (2021). Epigenetic regulation of autophagy: A key modification in cancer cells and cancer stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 13(6), 542–567. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i6.542>

Marinković, M., Šprung, M., & Novak, I. (2021). Dimerization of mitophagy receptor BNIP3L/NIX is essential for recruitment of autophagic machinery. *Autophagy*, 17(5), 1232–1243. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1755120>

Matsuda N. (2016). Phospho-ubiquitin: upending the PINK-Parkin-ubiquitin cascade. *Journal of Biochemistry*, 159(4), 379–385. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv125>

Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., & Nukina, N. (2011). Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Molecular Cell*, 44(2), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.039>

Matsushima, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Suzumori, K., & Nakamura, Y. (1998). Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 21(3), 230–235.

Mazure, N. M., & Pouyssegur, J. (2009). Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy*, 5(6), 868–869. <https://doi.org/10.4161/auto.9042>

McWilliams, T. G., Prescott, A. R., Allen, G. F., Tamjar, J., Munson, M. J., Thomson, C., Muqit, M. M., & Ganley, I. G. (2016). mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 214(3), 333–345. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603039>

McWilliams, T. G., Prescott, A. R., Montava-Garriga, L., Ball, G., Singh, F., Barini, E., Muqit, M., Brooks, S. P., & Ganley, I. G. (2018). Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. *Cell Metabolism*, 27(2), 439–449.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.008>

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395(6700), 395–398. <https://doi.org/10.1038/26506>

Mortensen, M., Ferguson, D. J., Edelman, M., Kessler, B., Morten, K. J., Komatsu, M., & Simon, A. K. (2010). Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), 832–837. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913170107>

Murakawa, T., Yamaguchi, O., Hashimoto, A., Hikoso, S., Takeda, T., Oka, T., Yasui, H., Ueda, H., Akazawa, Y., Nakayama, H., Taneike, M., Misaka, T., Omiya, S., Shah, A. M., Yamamoto, A., Nishida, K., Ohsumi, Y., Okamoto, K., Sakata, Y., & Otsu, K. (2015). Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and

mitochondrial fragmentation. *Nature Communications*, 6, 7527.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8527>

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 10(7), 458–467. <https://doi.org/10.1038/nrm2708>

Narendra, D., Kane, L. A., Hauser, D. N., Fearnley, I. M., & Youle, R. J. (2010). p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy*, 6(8), 1090–1106.
<https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13426>

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 183(5), 795–803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>

Ni, H. M., Williams, J. A., & Ding, W. X. (2015). Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biology*, 4, 6–13.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.11.006>

Nixon R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 19(8), 983–997. <https://doi.org/10.1038/nm.3232>

Noda, T., & Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 3963–3966.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3963>

Novak I. (2012). Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(5), 794–802. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4407>

Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., Reichert, A. S., Terzic, J., Dötsch, V., Ney, P. A., & Dikic, I. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Reports*, 11(1), 45–51. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.256>

Ohi, N., Tokunaga, A., Tsunoda, H., Nakano, K., Haraguchi, K., Oda, K., Motoyama, N., & Nakajima, T. (1999). A novel adenovirus E1B19K-binding protein B5 inhibits apoptosis induced by Nip3 by forming a heterodimer through the C-terminal hydrophobic region. *Cell Death and Differentiation*, 6(4), 314–325. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400493>

Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y. S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2010). p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 15(8), 887–900. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01426.x>

O'Sullivan, T. E., Johnson, L. R., Kang, H. H., & Sun, J. C. (2015). BNIP3- and BNIP3L-Mediated Mitophagy Promotes the Generation of Natural Killer Cell Memory. *Immunity*, 43(2), 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.012>

Panda, S., Srivastava, S., Li, Z., Vaeth, M., Fuhs, S. R., Hunter, T., & Skolnik, E. Y. (2016). Identification of PGAM5 as a Mammalian Protein Histidine Phosphatase that Plays a Central Role to Negatively Regulate CD4(+) T Cells. *Molecular Cell*, 63(3), 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.021>

Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., & Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24131–24145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>

Ranieri, M., Brajkovic, S., Riboldi, G., Ronchi, D., Rizzo, F., Bresolin, N., Corti, S., & Comi, G. P. (2013). Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurology Research International*, 2013, 293893. <https://doi.org/10.1155/2013/293893>

Rogov, V. V., Suzuki, H., Marinković, M., Lang, V., Kato, R., Kawasaki, M., Buljubašić, M., Šprung, M., Rogova, N., Wakatsuki, S., Hamacher-Brady, A., Dötsch, V., Dikic, I., Brady, N. R., & Novak, I. (2017). Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins. *Scientific Reports*, 7(1), 1131. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01258-6>

Ruiz, K., Thaker, T.M., Agnew, C. *et al.* Functional role of PGAM5 multimeric assemblies and their polymerization into filaments. *Nature Communications* 10, 531 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08393-w>

Sadatomi, D., Tanimura, S., Ozaki, K., & Takeda, K. (2013). Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4596–4612. <https://doi.org/10.3390/ijms14034596>

Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S. K., Schumacher, A., Prchal, J. T., Chen, M., & Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*, 454(7201), 232–235. <https://doi.org/10.1038/nature07006>

Schweers, R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., Kundu, M., Opferman, J. T., Cleveland, J. L., Miller, J. L., & Ney, P. A. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(49), 19500–19505. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708818104>

Sharma, V., Verma, S., Seranova, E., Sarkar, S., & Kumar, D. (2018). Selective Autophagy and Xenophagy in Infection and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*, 147. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00147>

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., & Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, *458*(7242), 1131–1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>

Sulistijo, E. S., & MacKenzie, K. R. (2006). Sequence dependence of BNIP3 transmembrane domain dimerization implicates side-chain hydrogen bonding and a tandem GxxxG motif in specific helix-helix interactions. *Journal of Molecular Biology*, *364*(5), 974–990. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.065>

Sun, N., Yun, J., Liu, J., Malide, D., Liu, C., Rovira, I. I., Holmström, K. M., Fergusson, M. M., Yoo, Y. H., Combs, C. A., & Finkel, T. (2015). Measuring In Vivo Mitophagy. *Molecular Cell*, *60*(4), 685–696. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.009>

Svetina S, Kuzman D, Waugh RE, Zihlerl P and Žekš B (2004) The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry* *62*, 107–113

Takeda, K., Komuro, Y., Hayakawa, T., Oguchi, H., Ishida, Y., Murakami, S., Noguchi, T., Kinoshita, H., Sekine, Y., Iemura, S., Natsume, T., & Ichijo, H. (2009). Mitochondrial phosphoglycerate mutase 5 uses alternate catalytic activity as a protein serine/threonine phosphatase to activate ASK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(30), 12301–12305. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901823106>

Takuya Hashino, Hisanori Matsubara, Jinghong Xu, Reiji Tanaka, Eiichi Kusagawa, Yuto Ueda, Hideki Yoshida, Takao Kataoka, PGAM5 interacts with Bcl-rambo and regulates apoptosis and mitophagy, *Experimental Cell Research*, *420* (1), 2022,113342,ISSN 0014-4827, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113342>.

Tasset, I., & Cuervo, A. M. (2016). Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *The FEBS Journal*, 283(13), 2403–2413. <https://doi.org/10.1111/febs.13677>

Tavera-Mendoza, L. E., Westerling, T., Libby, E., Marusyk, A., Cato, L., Cassani, R., Cameron, L. A., Ficarro, S. B., Marto, J. A., Klawitter, J., & Brown, M. (2017). Vitamin D receptor regulates autophagy in the normal mammary gland and in luminal breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(11), E2186–E2194. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615015114>

Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., & Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO Journal*, 27(2), 433–446. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>

Vande Velde, C., Cizeau, J., Dubik, D., Alimonti, J., Brown, T., Israels, S., Hakem, R., & Greenberg, A. H. (2000). BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular and Cellular Biology*, 20(15), 5454–5468. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.15.5454-5468.2000>

Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F., & Wang, X. (2012). The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*, 148(1-2), 228–243. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.030>

Wei, Y., Chiang, W. C., Sumpter, R., Jr, Mishra, P., & Levine, B. (2017). Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell*, 168(1-2), 224–238.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.042>

Westermann B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 11(12), 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>

Wilhelm, L. P., Zapata-Muñoz, J., Villarejo-Zori, B., Pellegrin, S., Freire, C. M., Toyé, A. M., Boya, P., & Ganley, I. G. (2022). BNIP3L/NIX regulates both mitophagy and pexophagy. *The EMBO Journal*, 41(24), e111115. <https://doi.org/10.15252/emboj.2022111115>

Wilkins, J. M., McConnell, C., Tipton, P. A., & Hannink, M. (2014). A conserved motif mediates both multimer formation and allosteric activation of phosphoglycerate mutase 5. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(36), 25137–25148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.565549>

Xu, D., Chen, P., Wang, B., Wang, Y., Miao, N., Yin, F., Cheng, Q., Zhou, Z., Xie, H., Zhou, L., Liu, J., Wang, X., Zent, R., Lu, L., & Zhang, W. (2019). NIX-mediated mitophagy protects against proteinuria-induced tubular cell apoptosis and renal injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *316*(2), F382–F395. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00360.2018>

Yamaguchi, A., Ishikawa, H., Furuoka, M., Yokozeki, M., Matsuda, N., Tanimura, S., & Takeda, K. (2019). Cleaved PGAM5 is released from mitochondria depending on proteasome-mediated rupture of the outer mitochondrial membrane during mitophagy. *Journal of Biochemistry*, *165*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy077>

Yan, C., Gong, L., Chen, L., Xu, M., Abou-Hamdan, H., Tang, M., Désaubry, L., & Song, Z. (2020). PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis. *Autophagy*, *16*(3), 419–434. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1628520>

Yang, C., Liu, X., Yang, F., Zhang, W., Chen, Z., Yan, D., You, Q., & Wu, X. (2017). Mitochondrial phosphatase PGAM5 regulates Keap1-mediated Bcl-xL degradation and controls cardiomyocyte apoptosis driven by myocardial ischemia/reperfusion injury. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, *53*(3), 248–257. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0105-2>

Yang, M., Linn, B. S., Zhang, Y., & Ren, J. (2019). Mitophagy and mitochondrial integrity in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, *1865*(9), 2293–2302. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.05.007>

Yang, Y., Klionsky, D.J. Autophagy and disease: unanswered questions. *Cell Death Differ* *27*, 858–871 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0480-9>

Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, *12*(9), 814–822. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-814>

Yasuda, M., Han, J. W., Dionne, C. A., Boyd, J. M., & Chinnadurai, G. (1999). BNIP3alpha: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. *Cancer Research*, *59*(3), 533–537.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 30299–30304. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607007200>

Yuan, Y., Zheng, Y., Zhang, X., Chen, Y., Wu, X., Wu, J., Shen, Z., Jiang, L., Wang, L., Yang, W., Luo, J., Qin, Z., Hu, W., & Chen, Z. (2017). BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against ischemic brain injury independent of PARK2. *Autophagy*, *13*(10), 1754–1766. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1357792>

Zhang, J., Loyd, M. R., Randall, M. S., Waddell, M. B., Kriwacki, R. W., & Ney, P. A. (2012). A short linear motif in BNIP3L (NIX) mediates mitochondrial clearance in reticulocytes. *Autophagy*, *8*(9), 1325–1332. <https://doi.org/10.4161/auto.20764>

Zhang, J., Ney, P. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* **16**, 939–946 (2009). <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.1>

Zhu, Y., Massen, S., Terenzio, M., Lang, V., Chen-Lindner, S., Eils, R., Novak, I., Dikic, I., Hamacher-Brady, A., & Brady, N. R. (2013). Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(2), 1099–1113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399345>

8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Klara Ivanišević

Datum i mjesto rođenja: 28. 02. 1997., Split

Obrazovanje:

2020. - 2022. **Sveučilišni diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija**

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2019. - 2020. **University of Vienna, master program Immunobiology**

2015. - 2019. **Sveučilišni preddiplomski studij Biologija i kemija**

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Splitu

2011. - 2015. **Jezično informatička gimnazija Leonardo da Vinci, Split**

Iskustvo:

2022. - Izrada diplomskog rada u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Katedra za imunologiju i medicinsku genetiku (Pull- down metoda, koimunoprecipitacija, imunofluorescencija, Western blot, izolacija plazmidne DNA, transformacija bakterija “heat shock” metodom)

2021. - Stručna praksa pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Ane Galov (izolacija i purifikacija plazmida, sakupljanje kolonija, molekularno kloniranje, izolacija DNA iz tkiva, mjerenje koncentracije DNA)

2021. - Potvrda o osposobljenosti za rad s pokusnim životinjama

2019. - Stručna praksa na Medilsu, pod mentorstvom dr. Francois Xavier Pelaya (PCR, nasađivanje i sakupljanje kolonija)

2019. - Istraživanje eteričnih ulja, PMF

Dodatno:

2022. - Immunoprecipitation Workshop - All about IP, Proteintech Group

2019. - IELTS, C1 razina

2019. - Festival znanosti u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet

2018. - Festival znanosti u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet

2017. - Split Summer School- course: Bacterial spoilage in production plants- teachers Matthias Noll, Ana Maravić, Ivica Šamanić, Željana Fredotović