

Odgovor bakterija na oksidacijski stres

Radetić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:217:347304>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Ivana Radetić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

ODGOVOR BAKTERIJA NA OKSIDACIJSKI STRES

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2024.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

12. srpnja 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2024.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	8
1.1. Oksidacijski stres	8
1.1.1. Kemija reaktivnih vrsta.....	8
1.1.2. Reaktivne vrste kisika (ROS).....	9
1.1.3. Izvori reaktivnih vrsta kisika.....	10
1.2. Biomolekule podložne oksidacijskom stresu	12
§ 2. ODGOVOR BAKTERIJA NA OKSIDACIJSKI STRES	15
2.1. Antioksidansi	15
2.1.1. Neenzimski antioksidansi	15
2.1.2. Enzimski antioksidansi.....	17
2.2. Popravak proteina.....	18
2.2.1. Cys i Met aminokiselinski ostatci.....	18
2.2.2. Šaperoni	20
2.3. Obrana na razini ekspresije gena	21
2.3.1. OxyR regulon	21
2.3.2. SoxRS regulon.....	21
2.3.3. PerR regulon.....	23
2.4. Mehanizmi popravka DNA i RNA.....	24
2.4.1. DNA.....	24
2.4.2. RNA.....	24
2.5. Utjecaj oksidacijskog stresa na translaciju.....	24
§ 3. ZAKLJUČAK	26
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	27

§ Sažetak

Pojavom kisika u Zemljinoj atmosferi živa su bića postala izložena novoj opasnosti, reaktivnim kisikovim vrstama (ROS), koja narušava cjelovitost organizma i ometa metaboličke puteve. Kao prilagodbu na novi okoliš bakterije su razvile mehanizme obrane od oksidacijskog stresa koji nastoje minimizirati količinu reaktivnih vrsta u stanici. Reaktivne kisikove vrste oštećuju biomembrane, proteine i nukleinske kiseline te ukoliko ne dođe do njihove obnove i uklanjanja ROS, organizmu prijeti smrt. Oksidacijski stres oštećuje enzime važne za proizvodnju energije u stanici pa dolazi do gašenja metaboličkih puteva ukoliko se oštećeni enzimi ne regeneriraju. Oksidacija nukleinskih kiselina dovodi do mutacija i pogrešnog smatanja proteina te njihove agregacije što vodi apoptozi. Iz ovih je razloga važan brz i učinkovit odgovor organizma, a neučinkovitost ili nepostojanje mehanizama obrane bilo bi fatalno za stanice. Zaštita organizma uključuje sve od primarnih crta obrane antioksidansima do složenih mehanizama na razini regulacije gena. U ovom je radu dan pregled same prirode oksidacijskog stresa dok je naglasak stavljen na najvažnije mehanizme zaštite različitih biomolekula kod bakterija.

§ 1. UVOD

1.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres označava stanje organizma u kojem broj oksidansa nadmašuje broj antioksidansa zbog čega mehanizmi obrane od reaktivnih vrsta zakazuju u detoksifikaciji organizma. Helmut Seis prvi koristi ovaj izraz 1985. za opis stresa koji nastaje u organizmu zbog reaktivnih kisikovih vrsta koje remete redoks ravnotežu.¹ Dolazi do nakupljanja slobodnih radikala koji oštećuju makromolekule poput proteina, DNA i lipida koje zatim gube svoje funkcije. Nakupljanje radikala povećava broj mutacija te u konačnici dolazi do stanične smrti ili oštećenja stanica, tkiva i organa.

1.1.1. Kemija reaktivnih vrsta

Slobodni radikali i ostale reaktivne molekule uobičajeni su produkti metabolizma i fizioloških procesa živih organizama. Zbog svoje prirode ove su molekule izrazito reaktivne te njihove brze i nespecifične reakcije sa većinom bioloških molekula predstavljaju opasnost za organizam.

Slobodni radikali su kemijske vrste koje mogu postojati neovisno, a sadrže nespareni elektron koji ih čini vrlo reaktivnim i kratkoživućim vrstama. Kako bi postigli stabilnost radikali reagiraju kao oksidansi, uzimaju elektron pretvarajući drugu vrstu u radikal što pokreće lančanu reakciju koja oštećuje stanicu. Radikali posjeduju konfiguraciju otvorene ljuske (engl. *open shell configuration*) u kojoj molekulske orbitale nisu potpuno popunjene zbog čega imaju termodinamički višu energiju od atoma ili molekula sa konfiguracijom zatvorene ljuske. Primjer molekule s otvorenom konfiguracijom je hidroksilni radikal ($\sigma_{pz}^2 p_x^2 p_y^1$).

Ostale reaktivne vrste poput vodikova peroksida (H_2O_2), hipokloraste kiseline (HOCl), nitritne kiseline (HNO_2), organskih peroksida (ROOH), peroksinirtrita (ONOOH) i sl. nisu slobodni radikali, no lako ulaze u reakcije sa slobodnim radikalima zbog čega predstavljaju opasnost kada govorimo o oksidacijskoj šteti.^{2,3}

1.1.2. Reaktivne vrste kisika (ROS)

Oksidacijska šteta u organizmu najčešće je uzrokovana slobodnim radikalima i reaktivnim molekulama koje nastaju iz molekuskog kisika, a zovemo ih reaktivnim vrstama kisika odnosno *reactive oxygen species* (ROS). Molekulski kisik je biradikal jer ima dva nesparena elektrona koja okupiraju dvije nevezne π^* orbitale zbog čega je kisik glavni izvor reaktivnih vrsta u organizmu. Dvije vrste ROS koje su najbolje proučene jesu superoksid ($O_2^{\cdot-}$) i vodikov peroksid (H_2O_2) koji stalno nastaju unutar stanice kao rezultat aerobnog metabolizma ili egzogeno kao posljedica izlaganja organizma okolini bogatoj oksidacijskim vrstama.

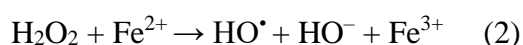
Superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$) je glavni percursor za nastanak ostalih reaktivnih vrsta kisika u organizmu. Nastaje redukcijom tripletnog molekuskog kisika jednim elektronom. Vrijeme poluživota superoksidnog aniona je nekoliko mikrosekundi što je dovoljno za oksidaciju askorbata i tiola te proteina koji sadrže 4Fe-4S klustere. Najvažnija reakcija superoksidnog aniona je reakcija dismutacije³

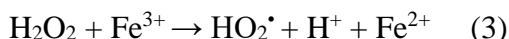


te sposobnost redukcije prijelaznih metala i metalnih kompleksa (Fe^{3+} , Cu^{2+} , citokrom c i kinon).

$O_2^{\cdot-}$ se ponaša kao slaba baza koja protonacijom prelazi u vodikov peroksidni radikal (HO_2^{\cdot}), neutralnu vrstu koja zbog manjih repulzija u odnosu na dvije molekule $O_2^{\cdot-}$ u reakciji (1) brže reagira sa superoksidnim anionom dajući vodikov peroksid. Pri fiziološkom pH većina superoksidnog radikala prisutna je u obliku $O_2^{\cdot-}$ dok samo 0,6% postoji u protoniranom obliku čija se količina povećava opadanjem pH u stanici uslijed oksidativne štete na membrani.^{4,5}

Vodikov peroksid je neutralna molekula zbog čega, za razliku od superoksidnog aniona, može prolaziti kroz biološke membrane. Glavni izvor H_2O_2 je reakcija dismutacije (1) koju katalizira superoksid-dismutaza. Vodikov peroksid je jaki oksidans, no kinetika reakcija s biomolekulama je spora zbog čega se on nakuplja u stanicama te je izvor reaktivnijih oksidansa poput hidroksil radikala (HO^{\cdot} i HO_2^{\cdot}). Reakcije kojom iz vodikovog peroksida nastaju hidroksilni radikali nazivaju se Fenton reakcije. Termin *Fenton reakcije* (H. J. Horstman Fenton, 1894.) odnosi se na reakcije dekompozicije H_2O_2 uz pomoć metalnog centra kao što je Fe^{2+} .





Reakcija (3) je znatno sporija od reakcije (2) pa kada govorimo o hidroksilnom radikalima najčešće se radi o HO^\bullet vrsti.³ Željezo (II) nastaje redukcijom iz željeza (III) pomoću superoksidnog aniona, a vodikov peroksid dismutacijom istog iz čega slijedi da ukoliko koncentracija $\text{O}_2^{\bullet -}$ raste, koncentracija HO^\bullet će također rasti.

Hidroksilni radikal predstavlja najveću opasnost za organizam u usporedbi s ranije navedenim vrstama. Zbog visokog standardnog redukcijskog potencijala oksidirati će sve biološki važne molekule (DNA, proteine, lipide), a njegov kratak životni vijek ($\sim 10^{-9}$ s) upućuje na visoku reaktivnost koja je za većinu biomolekula ograničena samo brzinom difuzije.

Ostale reaktivne vrste kisika uključuju peroksilne radikale i singletni kisik. Peroksilni radikali nastaju reakcijom molekuskog kisika i radikala organskog podrijetla, najčešće masnih kiselina. Singletni kisik također preferira reakcije s konjugiranim dvostrukim vezama nezasićenih masnih kiselina pa obje vrste oštećuju biomembrane o čemu će biti riječi u nastavku.^{5,6}

Molekulski kisik se uobičajeno nalazi u tripletnom stanju gdje su dva nesparena elektrona u π^* orbitalama istog spina. Prilikom pobude molekule dolazi do prelaska u $^1\Sigma_g$ singletno stanje u kojem su dva elektrona suprotnog spina u različitim π^* orbitalama. Ova vrsta izrazito brzo prelazi u drugu vrstu sigletnog stanja niže energije, $^1\Delta_g$, u kojem su dva elektrona suprotnog spina sparena, odnosno ova vrsta ima konfiguraciju zatvorene ljuske. Ova vrsta singletnog kisika djeluje kao reaktivna vrsta u organizmima. Visoka energija singletnog stanja i želja za povratkom u tripletno stanje razlog su štetnosti $^1\text{O}_2$. Deaktivacija $^1\text{O}_2$ moguća je predajom energije molekulama poput β -karotena koje dobro stabiliziraju višak energije i ne stvaraju nove oksidanse. Kolizija $^1\text{O}_2$ i β -karotena učestalija je od reakcije $^1\text{O}_2$ i masnih kiselina za 4 do 5 redova veličine zbog čega su i male koncentracije β -karotena dovoljne za gašenje reaktivnosti $^1\text{O}_2$ i spriječavanje oksidacije lipida.

1.1.3. Izvori reaktivnih vrsta kisika

Izvori kemijski reaktivnih vrsta nalaze se u samom organizmu zbog čega govorimo o endogenim izvorima. Egzogeni izvori iz okoline kroz membranu ulaze u stanicu i djeluju kao takvi ili izazivaju pojačanu sintezu ostalih ROS unutar organizma. Glavni izvor ROS kod *E. coli* (*Escherichia coli*) su enzimi koji sudjeluju u aerobnom i anaerobnom procesu staničnog disanja, a kao nusprodukt daju superoksid i vodikov peroksid. Primjeri takvih enzima su

NADH-dehidrogenaze, skupina enzima koji sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji katalizirajući reakciju pretvorbe NADH u NAD⁺ pri čemu je potreban akceptor elektrona. NADH-dehidrogenaze su flavoproteini koji sadrže željezo-sumpor centre koji predstavljaju potencijalna mjesta nastanka ROS.⁷ Enzimi poput lipoamid-dehidrogenaze, fumarat-reduktaze i sukcinat-dehidrogenaze također su izvori ROS jer dijele zajednička obilježja koja im omogućuju da prenose elektrone na molekulski kisik. Radi se o enzimima koji kataliziraju redoks reakcije zbog čega i sadrže kofaktore poput FAD i hema te željezo-sumpor centre koji vode elektrone. Većina ovih enzima uključena je u proces oksidativne fosforilacije zbog čega se nalazi u okolini bogatoj kisikom. Zbog ovih svojstava ne začuđuje da su sporedne reakcije ovih enzima endogeni izvori ROS u bakterijama.

Koncentracija ROS u bakterijama može se povećati egzogenim izvorima. Bakterijska membrana je polupropusna za H₂O₂, a spojevi poput parakvata (letalni herbicid), menadiona i fenazina (industrijski aditivi) ulaze u cikličke redoks reakcije koje doniraju elektrone molekulskom kisiku regenerirajući se te stvarajući oksidacijsku štetu prolaskom kroz bakterijsku membranu.

Glavni izvor superoksidnog aniona u eukariotskim stanicama su mitohondriji i NADPH-oksidaza koja katalizira reakciju



NADPH-oksidazu nalazimo vezanu za membranu endotelnih stanica (stanica epitela koji oblaže unutarnju površinu srca, krvnih i limfnih žila) te u fagocitima – stanicama specijaliziranim za razgradnju mikroorganizama i drugih stanica probavnim enzimima. Kako bakterijska membrana nije propusna za O₂^{•-} dolazi do dismutacije u H₂O₂ koji ulazi u bakterijsku stanicu i izaziva oksidacijski stres.^{4,8,9}

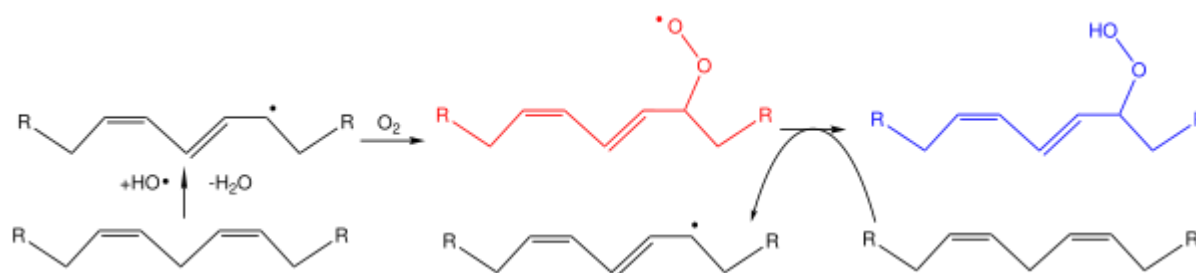
Fotoautotrofni organizmi imaju dodatne izvore ROS koji nastaju u fotosustavu I i II tijekom fotosinteze. Potencijalna mjesta nastanka O₂^{•-} nalaze se u fotosustavu I gdje se O₂ može reducirati prilikom prijenosa elektrona na kompleksu citokroma b₆f koji uključuje nastanak radikala kinona koji reducira kisik. Isto se događa i prilikom prijenosa elektrona s feredoksina na NADP⁺. U fotosustavu II nastaje i singletni kisik o kojem je riječ u poglavlju 1.1.2. Do reakcije dolazi prilikom pobude klorofila svjetlom koji zbog nedostatka akceptora svoju energiju pobude predaje na molekulski kisik (prirodno u tripletnom stanju) pri čemu nastaje singletni kisik.¹⁰

1.2. Biomolekule podložne oksidacijskom stresu

Reaktivne kisikove vrste reagiraju s molekulama u staničnoj membrani, primarno s fosfolipidima koji sadrže nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acid*, *PUFA*). Prisutnost dvostruke veze oslabljuje susjednu C-H vezu metilenske skupine te olakšava odcjepljenje vodika nekom reaktivnom vrstom. Kemijski proces koji na ovaj način degradira membranske lipide, time smanjujući fluidnost membrane, naziva se peroksidacija lipida.

Mehanizam peroksidacije lipida (slika 1) započinje napadom hidroksilnog radikala koji uzima vodik s acilne pozicije lipida pri čemu nastaje lipidni radikal i voda. Nakon inicijacije slijedi propagacijska faza u kojoj lipidni radikal reagira s molekulskim kisikom dajući peroksilni radikal sposoban generirati novi lipidni radikal uzimanjem vodika s novog nezasićenog lipida. Lančana reakcija se nastavlja, moguće sve dok se nezasićene masne kiseline ne potroše pri čemu dolazi do oštećenja cijele membrane. Lančanoj je reakciji konkurentna reakcija terminacije koja nastupa ukoliko dođe do reakcije dva lipidna odnosno peroksilna radikala pri čemu nastaje peroksid (ROOR). Do terminacije može doći i reakcijom radikala s antioksidansima poput vitamina E, askorbata, glutationa. Peroksidacija lipida ne mora biti inicirana hidroksilnim radikalom već postoje različiti mehanizmi inicijacije (radijacijom, prijelaznim metalima, singletnim kisikom).^{11,12}

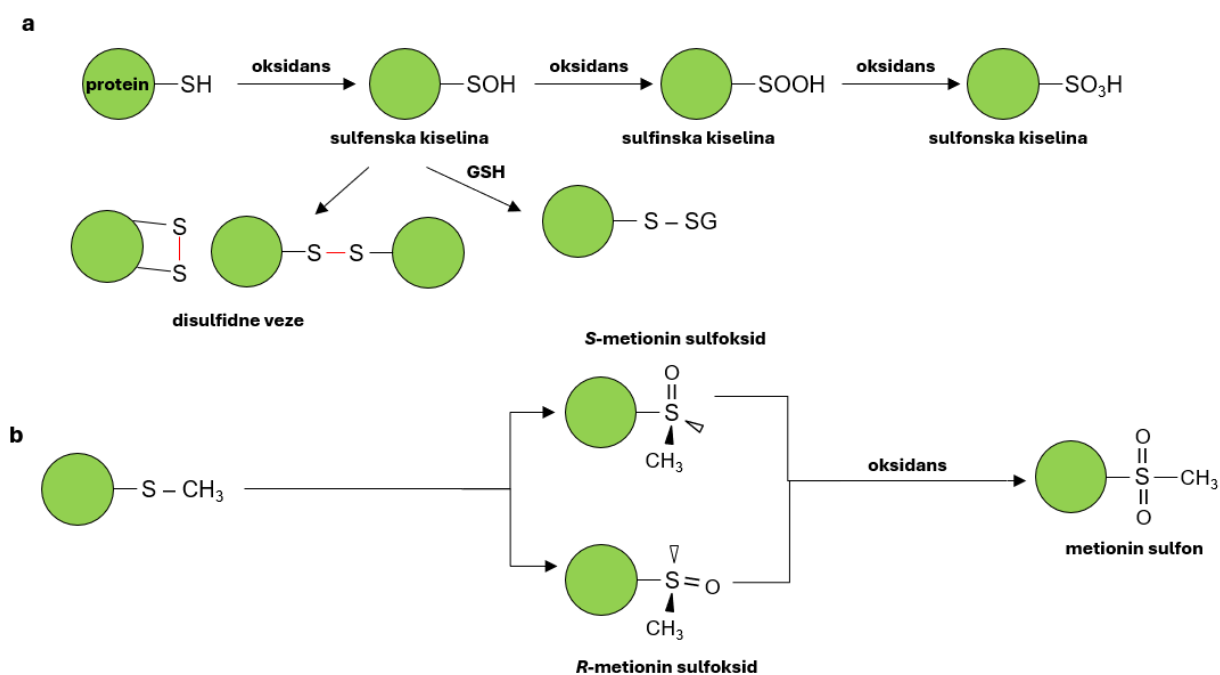
Posljedice peroksidacije lipida jesu morfološke promjene bakterija uslijed nastojanja bakterije da popravi oksidacijsku štetu zbog čega bakterije spiralnog ili štapićastog oblika prelaze u okrugle koke. Ukoliko se oksidacijska šteta na membrani ne popravi dolazi do oštećenja DNA i smrti organizma. Druga fatalna posljedica razaranja membrane je nemogućnost stvaranja ATP-a zbog poremećene ravnoteže protonskog gradijenta.⁹



Slika 1. Peroksidacija lipida – hidroksilni radikal inicira reakciju, dodatak kisika na radikal daje hidroperoksilni radikal (crveno) koji generira novi peroksilni radikal i hidroperoksid (plavo). (https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_peroxidation datum pristupa: 14. srpnja 2024.)

Proteini koji sadrže cisteinske i metioninske aminokiselinske ostatke najviše su podložni oksidaciji. Osim ove dvije aminokiseline oštećenju su podložni i arginin, prolin, histidin i treonin putem karbonilacije. Cisteinski ostaci reagiraju sa svim oblicima reaktivnih vrsta ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , H_2O_2) te kroz niz reakcija (slika 2a) daju sulfensku kiselinu koja posjeduje elektrofilni i nukleofilni karakter te je izrazito reaktivna. Stvara disulfidne veze sa susjednim cisteinskim ostatkom u svojoj ili susjednoj podjedinici proteina što uzrokuje disfunkcionalnost aktivnog mjesta i promjenu konformacije. U prisutstvu jakih oksidansa sulfenska kiselina daljnjom oksidacijom prelazi u sulfonsku kiselinu. Sulfonska kiselina je ireverzibilna modifikacija proteina koja se ne može povratiti redukcijom sa tioredoksinom ili glutathionom.^{9,13}

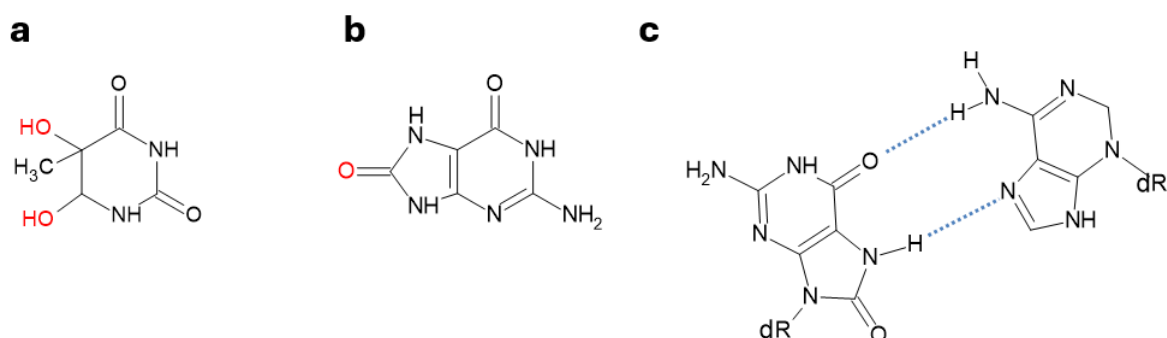
Vodikov peroksid inaktivira proteine (enzime) koji sadrže neredoks metalne centre i 4Fe-4S klustere. Željezo izloženo otapalu u doticaju je sa H_2O_2 te dolazi do oksidacije željeza. Metal disocira i aktivnost enzima se gubi. Ovi enzimi sudjeluju u primarnim ciklusima metabolizma te njihovom inaktivacijom dolazi do nedostatka energije u organizmu i gašenja ostalih procesa.



Slika 2. Oksidacija Cys i Met aminokiselinskih ostataka (izrađeno pomoću *MS Power Point* prema B. Ezraty, A. Gennaris, F. Barras, J. F. Collet, *Nature Reviews Microbiology* **15** (2017) 385-396)

DNA molekule podložne su reakcijama sa ROS putem baza (purini i pirimidini) te deoksiriboznog prstena što uzrokuje jednolančane ili dvolančane lomove. Hidroksilni radikal lako uzima vodik sa C-4 ugljika deoksiriboze što može dovesti do otvaranja prstena. Pirimidini

su podložni oksidaciji na C5-C6 dvostrukoj vezi pri čemu nastaje timin glikol (slika 3a). 8-oksogvanin je najpoznatija modifikacija DNA uzrokovana reaktivnim kisikovim vrstama. Posljedica nastanka 7,8-dihidro-8-oksogvanina (8-oksogvanina) (slika 3b) je pogrešno sparivanje baza odnosno mogućnost nastanka gvanin-adenin baznih parova (slika 3c). Oksidacijska šteta nad DNA ima veliki utjecaj na organizam upravo zbog ovakvih novih mogućnosti sparivanja nukleotida i uzrokovanja mutacija. Mutacije su najčešće u procesu replikacije što kasnije rezultira sintezom proteina smanjene funkcionalnosti.^{9,14}



Slika 3. Strukture timin glikola (a), 8-okso-gvanina (b) i povezivanje 8-okso-gvanina i adenina vodikovim vezama u bazni par (izrađeno pomoću programa *ChemSketch* i *MS Power Point*)

§ 2. ODGOVOR BAKTERIJA NA OKSIDACIJSKI STRES

2.1. Antioksidansi

2.1.1. Neenzimski antioksidansi

Štetnost reaktivnih vrsta kisika proizlazi iz njihove visoke reaktivnosti i mogućnosti pokretanja lančanih reakcija koje brzo i nespecifično uništavaju biomolekule. Proces autooksidacije zahvaća vrste poput masnih kiselina, polisaharida i proteina, a pokreće se spontanom nastankom radikala s ugljičnim centrom pomoću radikalskog inicijatora. Jednom nastali peroksilni radikali pokreću lančanu reakciju, a sam proces je autokatalitički u čemu i jest njegova destruktivnost. Vjerojatnost da dvije molekule radikala ($\text{ROO}\cdot$ ili $\text{R}\cdot$) reagiraju je mala što odgađa korak terminacije i autooksidacija se nastavlja sve dok se ne potroši sav izvor napadnute biomolekule, a dio stanice biva uništen.

Antioksidansi ubrzavaju proces terminacije i tako zaustavljaju lančanu reakciju prije nego li njene posljedice budu štetne za organizam. Antioksidansi su tvari koje se i same lako oksidiraju zbog čega djeluju kao reducensi s primarnim oksidansima (prijelazni metali, hidroksilni radikali, vodikov peroksid) i natječu se za slobodne radikale u lančanim reakcijama.

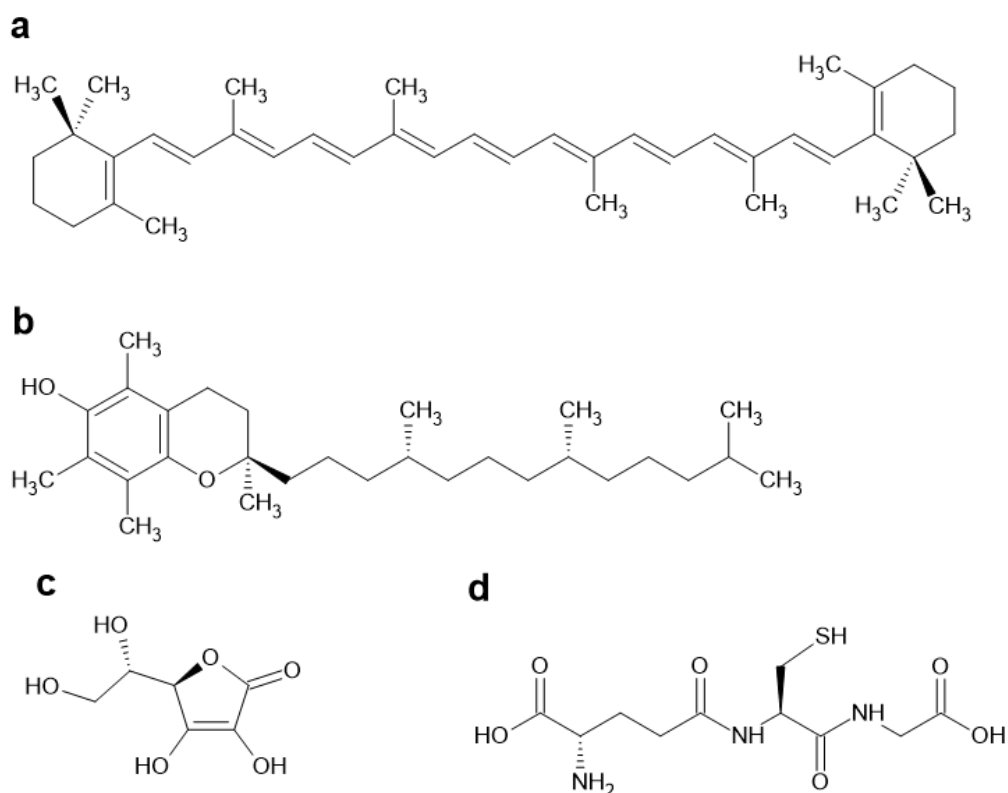
β -karoten (slika 4a) je primjer antioksidansa čiji se mehanizam djelovanja temelji na mogućnosti stvaranja stabilnijih radikala zbog čega se prekida lančana reakcija. Sustav konjugiranih dvostrukih veza ove molekule stabilizira nespareni elektron zbog čega takav radikal nije značajnije reaktivan.

Vitamin E (slika 4b) topljiv je u lipidima, a karakterizira ga brza reakcija s peroksil radikalima zbog čega predstavlja glavni antioksidans za terminaciju peroksidacije lipida i zaštitu membrana.

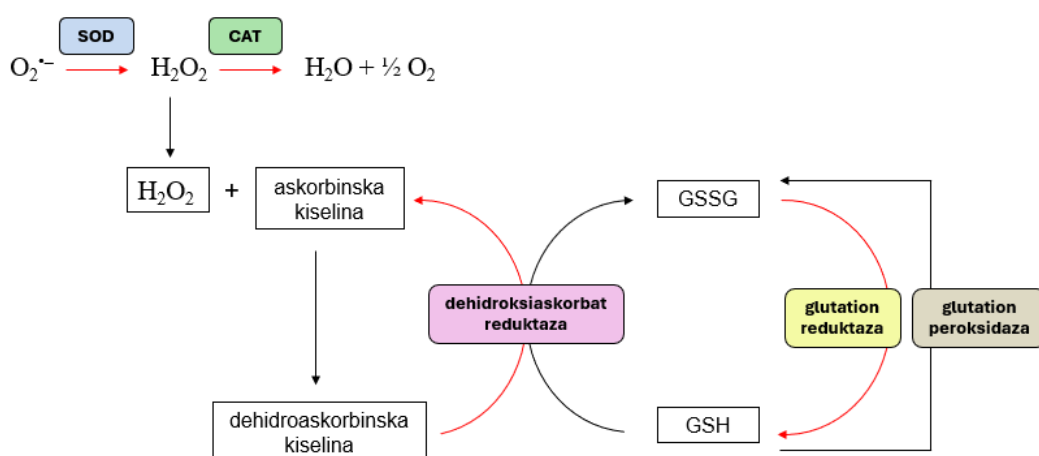
Vitamin C ili askorbat (slika 4c) je snažan antioksidans koji može donirati vodikov atom i stvoriti relativno stabilan askorbilni radikal. Vitamin C djeluje i kao reducens donirajući elektrone pri čemu prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu, a ciklus se zatvara pomoću dehidroaskorbat-reduktaze. Sa slike 5 vidimo da je ovaj enzim ovisan o prisutnosti glutaciona

(GSH) (slika 4d), tiola koji također ima antioksidativno djelovanje. Glutation reducira vodikov peroksid putem glutation-peroksidaze pri čemu nastaje voda i disulfid.

Glutation je važna molekula u zaštiti od oksidacijskog stresa čija je uloga reducensa očuvana u većini bakterija, viših organizama te kod ljudi. -SH skupine glutaciona djeluju kao donori elektrona stvarajući disulfide i sulfonsku kiselinu. Koncentracija reduciranog (GSH) i oksidiranog (GSSG) oblika odnosno njihov omjer važan je u signalizaciji oksidacijskog stresa u stanici.^{9,15}



Slika 4. Strukture β -karotena (a), vitamina E (b), vitamina C (c) i glutationa (d) (izrađeno pomoću programa *ChemSketch*)

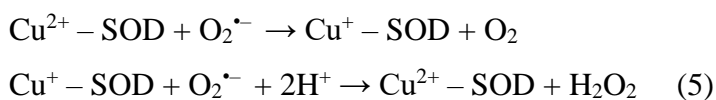


Slika 5. Ciklus antioksidativnog djelovanja askorbinske kiseline i glutationa; crvene strelice označavaju reakcije redukcije, a crvene reakcije oksidacije (izrađeno pomoću programa *MS Power Point* prema P. Liu, X. Wu, B. Gong, G. Lu, J. Li, H. Gao, *Antioxidants* **11** (2022) 2106)

2.1.2. Enzimski antioksidansi

Enzimski antioksidansi predstavljaju prvu crtu zaštite od oksidacijskog stresa, a djeluju na način da inaktiviraju ROS i pretvaraju ih u manje reaktivne vrste. Često su regulirani skupinama gena zvanim regulonima.

Superoksid-dismutaza (SOD) je enzim koji katalizira reakciju dismutacije (1), a prisutan je u gotovo svim živim bićima. Iako je superoksidni anion kratkoživuća i nestabilna vrsta koja spontano disproporcionira vjerojatnost reakcije dvije molekule $O_2^{\bullet-}$ pri malim koncentracijama produkuje vrijeme poluživota ove vrste i na 14 h (pri $c(O_2^{\bullet-}) = 10^{-11}$ mol/L). Stoga je potrebna enzimska dismutacija superoksida koja je 10^{10} puta brža od spontane dismutacije. Enzimski katalizirana reakcija je prvog reda za razliku od spontane dismutacije te je ograničena jedino brzinom difuzije.¹⁶ Superoksid-dismutaze su metaloenzimi koji koriste redoks-aktivni metalni centar za disproporcionaciju dvije molekule superoksida u kisik i vodikov peroksid koji se kasnije uklanja katalazom i peroksidazama. Ovisno o mjestu djelovanja u stanici te o vrsti organizma razlikujemo superoksid-dismutaze prema vrsti metalnog centra. Kod *E. Coli* pronalazimo SOD sa manganskim (SodA) i željeznim (SodB) centrom u citosolu te Cu/Zn superoksid-dismutaze (SodC) u međumembranskom prostoru. Katalizirana reakcija je sljedeća:



SodC smanjuje oksidativnu štetu na membrani uklanjajući $O_2^{\cdot-}$ koji se zadržava u međumembranskom prostoru zbog svoje nepermeabilnosti dok SodA i SodB uklanjaju $O_2^{\cdot-}$ iz endogenih izvora. Aktivnost superoksid-dismutaza u organizmima je neophodna jer čak i količina $O_2^{\cdot-}$ manja od 1 nmol/L inaktivira akotinazu, enzim ciklusa limunske kiseline.^{9,17}

Katalaza je enzim koji slijedi reakciju superoksid-dismutaze pretvarajući vodikov peroksid u manje reaktivan kisik i vodu. Sadrži četiri hem skupine koje omogućuju reakciju sa vodikovim peroksidom putem složenog mehanizma.¹⁸ Katalaza ima izrazito visok obrtni broj pa može pretvoriti milijune molekula H_2O_2 u vodu i kisik u sekundi.

Peroksidaze čini velika skupina enzima koja također oksidira vodikov peroksid, no za razliku od katalaze ne oksidiraju dvije molekule H_2O_2 već jednu, a kao izvor vodika u drugom koraku koriste razne anorganske i organske supstrate (askorbat, citokrom c, glutation).

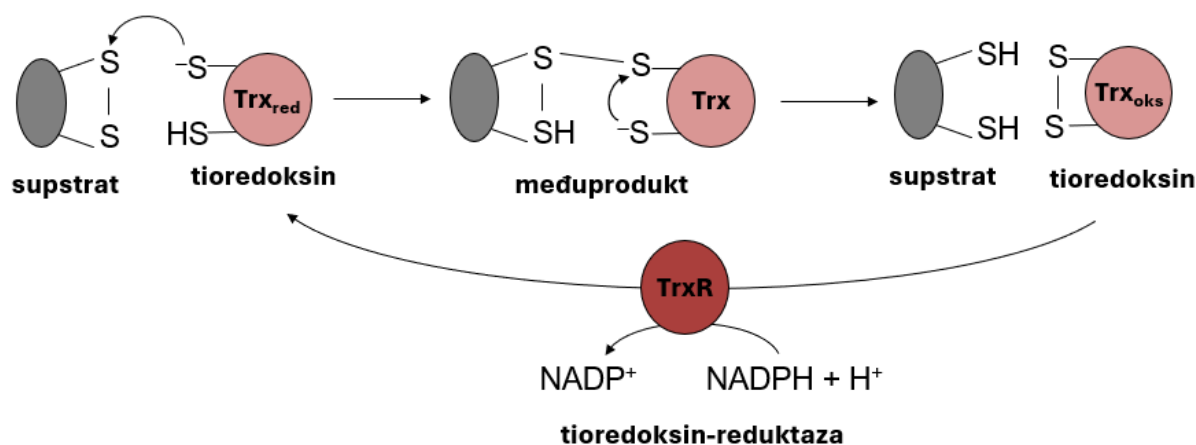
Bakterijska glutation-transferaza (GST) deaktivira reaktivne vrste kisika katalizirajući redoks reakciju glutationa i ROS. Monomer GST veže reaktivnu vrstu kisika i reducirani glutation (GSH). Reakcijom dva monomera nastaje disulfidna veza između dvije molekule glutationa i enzim prelazi u aktivnu dimernu strukturu. ROS zatim može donirati elektron reduciranom glutationu (GSSG) zatvarajući ciklus i spriječavajući oksidativnu štetu. Eukarioti posjeduju enzim glutation-peroksidazu koji na sličan način uklanja vodikov peroksid iz organizma, a ciklus zatvara glutation-reduktaza prisutna i kod prokariota. Prisutnost glutation-peroksidaze kod prokariota nije dobro istražena te nema dokaza o prisutnosti ovog enzima, a mogući razlog je upravo aktivnost GST.^{19,20}

2.2. Popravak proteina

2.2.1. Cys i Met aminokiselinski ostatci

Cisteinski i metioninski aminokiselinski ostaci na proteinima podložni su oksidaciji reaktivnim kisikovim vrstama reakcijama prikazanim na slici 2. Redukcija ovih ostataka vrši se enzimima tioredoksinom i glutationom prisutnim u citoplazmi *E. Coli* i većine živih bića. Mutanti koji ne proizvode ove enzime ne mogu se dijeliti i lakše umiru pod utjecajem oksidacijskog stresa.

Tioredoksin (Trx) sadrži amino-terminalni Cys koji inicira redukciju oksidiranog proteina pri čemu nastaje međuprodukt (slika 6). U sljedećem koraku deprotonira se drugi Cys pri čemu se otpušta regenerirani protein sa tiolnom skupinom i oksidirani Trx. Tioredoksin-reduktaza vraća enzim u početno stanje. Ekspresija gena za Trx2 regulirana je OxyR regulonom.

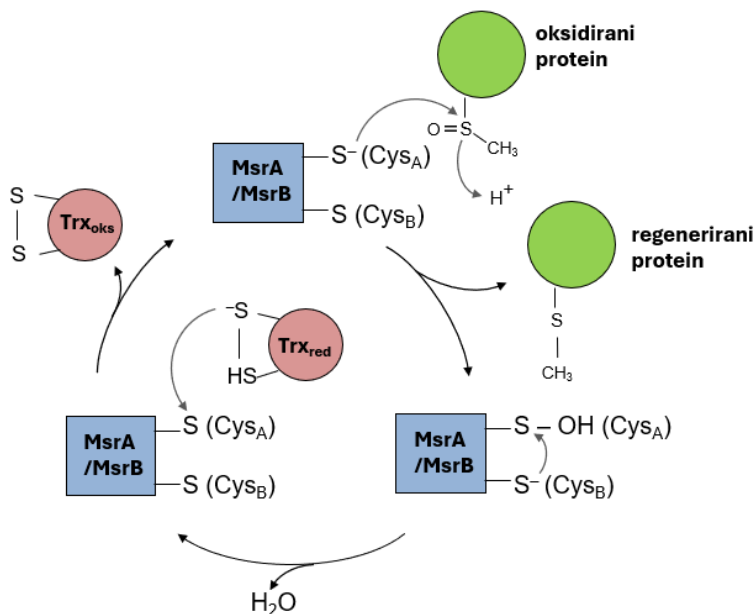


Slika 6. Popravak oksidiranih aminokiselinskih ostataka tioredoksinom (izrađeno pomoću *MS Power Point* prema B. Ezraty, A. Gennaris, F. Barras, J. F. Collet, *Nature Reviews Microbiology* **15** (2017) 385-396)

Glutaredoksini Grx1, Grx2, Grx3 prisutni u *E. Coli* djeluju na isti način kao i tioredoksin (slika 6b) koristeći glutation pri regeneraciji. Grx4 sudjeluje u popravku Fe-S klustera.

Redukciju metioninskih ostataka obavlja metionin-sulfoksid-reduktaza (Msr). MsrA reducira isključivo *S* stereoizomer (Met-*S*-O) dok MsrB reducira *R* stereoizomer (Met-*R*-O) pri čemu obje koriste sličan mehanizam (slika 7). Supstrat Msr je oksidirani metioninski ostatak Met-O koji prima proton od cisteinskog ostatka dajući sulfensku kiselinu (Cys_A – SOH) i regenerirani protein. Drugi cisteinski ostatak, Cys_B, zatim stvara disulfidnu vezu sa Cys_A uz otpuštanje molekule vode. Tioredoksin zatim regenerira Msr.

Ovakvi jednostavni mehanizmi popravka objašnjavaju prisutnost Met ostataka na površini proteina, npr. glutamin-sintetaze, koji djeluju kao prva crta obrane tijekom oksidacijskog stresa štiteći ostale važne aminokiselinske ostatke enzima od oksidacije.²¹



Slika 7. Redukcija metioninskih ostataka metionin-sulfoksid-reduktazom (Msr) (izrađeno pomoću *MS Power Point* prema B. Ezraty, A. Gennaris, F. Barras, J. F. Collet, *Nature Reviews Microbiology* **15** (2017) 385-396)

2.2.2. Šaperoni

Šaperoni su posebna vrsta proteina koji pomažu u smatanju i razmatanju proteina kako bi oni zauzeli pravilnu tercijsku strukturu. Šaperoni također imaju i važnu ulogu sprječavanja nepovratne agregacije pogrešno smotanih proteina. Tijekom oksidacijskog stresa dolazi do razmatanja proteina zbog oksidacije, njihove agregacije i na kraju smrti stanice. Za razliku od šaperona koji djeluju u normalnim okolnostima šaperoni aktivni za vrijeme stresa nisu ovisni o ATP-u. Razlog tome je smanjena razina ATP-a zbog inaktivacije enzima ključnih u metabolizmu ATP-a reaktivnim kisikovim vrstama.

Najpoznatiji šaperon neovisan o ATP-u je Hsp33 (engl. *heat shock protein*) koji ima funkciju „holdaze“ – proteina koji se veže na pogrešno smotani protein sprječavajući njegovu agregaciju. Mehanizam aktivacije Hsp33 uključuje četiri cisteinska ostatka koja u normalnim okolnostima koordiniraju ion cinka. Pod utjecajem oksidansa, od kojih najveći učinak ima hipoklorasta kiselina HClO, dolazi do nastanka disulfidnih veza te cisteinski ostatci ne mogu vezati cink pa on disocira što uzrokuje konformacijsku promjenu. Dolazi do izlaganja hidrofobnih dijelova proteina koji vežu pogrešno smotane proteine. Otpuštanje pogrešno smotanih proteina također je složeno regulirano. Redukcija disulfidnih veza tioredoksinom ili glutaredoksinom nije

dovoljna za inaktivaciju Hsp33. Potrebno je djelovanje DnaK sustava ovisnog o ATP-u koji potiče ponovno smatanje proteina i povratak u nativnu strukturu. Na ovaj način proteini osigurani od preranog otpuštanja u okolinu.^{22,23}

2.3. Obrana na razini ekspresije gena

Osim obrane od oksidacijskog stresa putem antioksidansa bakterije su razvile i mehanizme obrane na razini ekspresije gena. Kao odgovor na različite stresore aktiviraju se različiti reguloni. Reguloni su skupine gena ili operona koje su kontrolirane kao cjelina istim transkripcijskim faktorom. Na ovaj način bakterije mogu aktivirati gene odgovorne za smanjenje oksidativne štete te usporiti translaciju ostalih proteina.

2.3.1. *OxyR regulon*

OxyR regulon kontroliran je OxyR transkripcijskim faktorom osjetljivim na koncentraciju vodikova peroksida. Uslijed oksidacije s H₂O₂ dolazi do nastanka disulfidne veze između Cys¹⁹⁹ i Cys²⁰⁸ aminokiselinskih ostataka u OxyR proteinu i on prelazi u aktivnu formu. Nastanak disulfidne veze je reverzibilan te njena redukcija vraća protein u inaktivni oblik. Do inaktivacije OxyR dolazi u slučaju velikog GSH:GSSG omjera koji označava normalizaciju koncentracije H₂O₂. Reakciju redukcije disulfidne veze katalizira glutaredoksin (Grx1), enzim čiju ekspresiju izaziva sam OxyR koji na ovaj način inaktivira sam sebe pri malim koncentracijama H₂O₂. OxyR protein se veže na promotore za regulaciju više od 20 gena uključujući gene za katalaze, glutation-reduktaze, Grx1, alkil hidroperoksid-reduktaze i tioredoksin.^{13, 24}

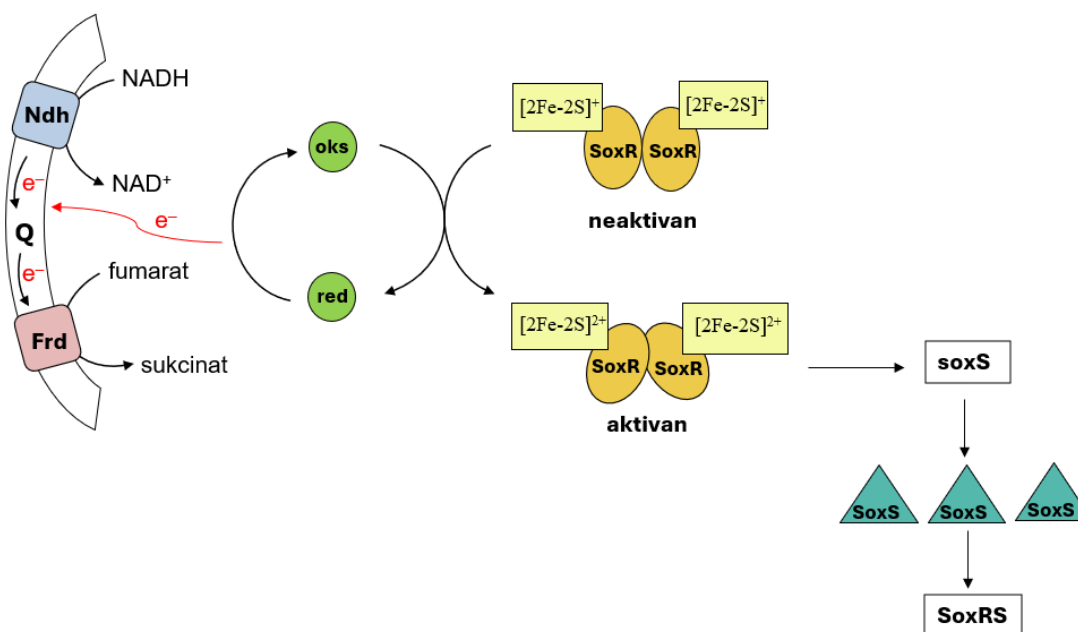
2.3.2. *SoxRS regulon*

SoxR transkripcijski faktor regulira transkripciju *soxS* gena odgovornog za sintezu SoxS proteina, transkripcijskog faktora koji aktivira više od sto gena pod kontrolom SoxRS regulona (slika 8). Iako SoxR primarno reagira na povećanu razinu oksidansa on nije direktan aktivator gena SoxRS.¹³ SoxRS inducira superoksid-dismutazu zbog čega se mislilo da je O₂^{•-} glavni aktivator SoxR te da je primarna uloga SoxRS obrana od superoksida.²⁵ Novija istraživanja pokazuju da O₂^{•-} nema utjecaja na aktivnost SoxR već se njegova aktivacija zbiva oksidacijom od strane redoks-aktivnih tvari prisutnih u bakterijama koje ih sintetiziraju samostalno ili su njima izložene u okolišu. Redoks-aktivne tvari poput parakvata, fenazina i kinona imaju ulogu

signalnih molekula, modulatora i toksina koji putem redoks ciklusa otkidaju elektrone s flavina i metalnih centara enzima stvarajući ROS.²⁶

SoxR koristi 2Fe-2S kluster kao senzor za oksidativni stres. Kada se kluster nalazi u svom reduciranom obliku ($[2Fe-2S]^+$) inaktivan je dok oksidirani oblik ($[2Fe-2S]^{2+}$) inducira transkripciju *soxS*. Oksidacija klustera događa se putem različitih redoks-aktivnih tvari što objašnjava izloženost klustera na površini proteina gdje je oksidacija neselektivna. Reducirani oblici redoks-aktivnih tvari oksidiraju se predajom elektrona na kinone zbog čega je regulon ovisan o respiraciji ili prisutnosti tvari poput fericijanida koje mogu oksidirati redoks-aktivne tvari i na taj ih način obnoviti (slika 8).

Zaštita organizma pomoću SoxRS regulona je primarno obrana od superoksida indukcijom superoksid-dismutaze. Međutim, nezanemariv dio gena SoxRS štiti organizam od samih redoks-aktivnih tvari ekspresijom gena za membranske porine koji otežavaju njihov prolazak kroz membranu ili sintezom proteina koji ih kemijski modificiraju. Redoks aktivne tvari mogu nanijeti štetu organizmu i trošenjem zaliha NADPH. Uočeno je naime da SoxRS inducira glukozu-6-fosfat-dehidrogenazu i feredoksin-NADP⁺-oksidoreduktazu, enzime koji stvaraju NADPH.²⁶



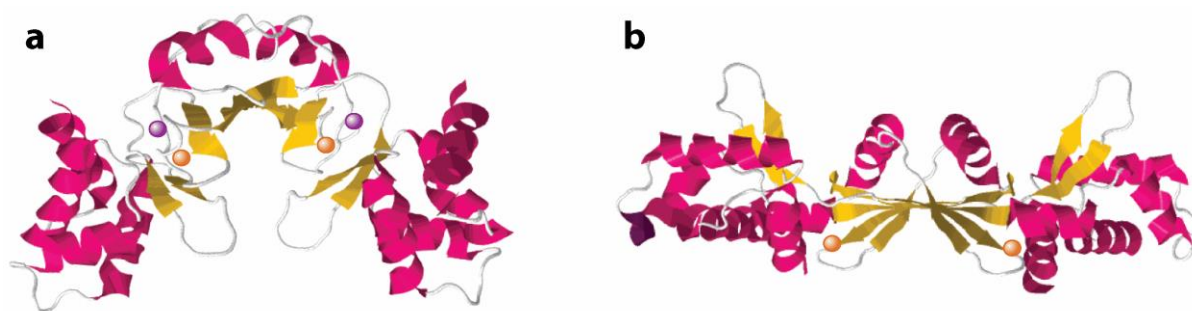
Slika 8. Model aktivacije SoxRS pomoću redoks aktivnih tvari (zeleno); Ndh – NADH-dehidrogenaza; Frd – fumarat-reduktaza (enzim suprotan sukcinat-dehidrogenazi); (izrađeno pomoću *MS Power Point* prema M. Gu, J. A. Imlay, *Molecular Microbiology* **79** (2011) 1136-1150)

2.3.3. *PerR regulon*

PerR regulira slične gene kao i OxyR i također je osjetljiv na H₂O₂, no za razliku od OxyR koji je pozitivan regulator, PerR djeluje kao represor gena odgovornih za obranu organizma od H₂O₂. PerR represor je vezan na DNA dok organizam nije izložen oksidacijskoj šteti. Nakon oksidacije sa H₂O₂ PerR protein mijenja konformaciju zbog čega ne može vezati DNA te dolazi do transkripcije gena korisnih za borbu protiv oksidacijske štete.

Mehanizam inaktivacije PerR uključuje metalni centar, najčešće željezo (II) ili mangan (II) u aktivnom mjestu, nužan za vezanje DNA i odgovoran za oksidaciju histidinskih ostataka. Fe²⁺ stvara hidroksilni radikal Fenton reakcijom (2) koji oksidira His37 ili His91 dajući 2-okso-histidin koji ne može vezati metal. To uzrokuje konformacijsku promjenu i DNA-vezne domene zauzimaju planarnu strukturu koja ne može vezati DNA molekulu (slika 9). Modifikacija 2-okso-histidinom je ireverzibilna i PerR protein se mora degradirati.

PerR regulira sintezu samog sebe zbog čega je njegova koncentracija veća tijekom oksidacijskog stresa. Osim H₂O₂ količinu aktivnog PerR proteina povećava i visoka koncentracija Fe²⁺ koji kompetira Mn²⁺ ionu za vezanje u aktivno mjesto. Samo protein koji veže željezov ion može generirati hidroksilni radikal te spriječiti oksidacijsku štetu dok je PerR s manganom u aktivnom mjestu lišen ove aktivnosti.¹³



Slika 9. Struktura PerR proteina u konformaciji koja može vezati DNA (a) te planarnoj konformaciji (b) zbog koje PerR disocira s DNA molekule (ljubičasto – Mn; narančasto – Zn). (J. A. Imlay, *Annu. Rev. Microbiol* **69** (2015) 93-108)

2.4. Mehanizmi popravka DNA i RNA

2.4.1. DNA

Base excision repair (BER) je glavni mehanizam popravka DNA oštećene oksidacijom. Uklanjanje 8-oksogvanina nužno je kako bi se spriječila mutagenost uzrokovana nekanonskim sparivanjem nukleotida. Mehanizam BER pokreće DNA-glikozidaza (MutM) koja prepoznaje 8-okso-dG:C bazne parove i cijepa glikozidnu vezu stvarajući AP regiju (engl. *apurinic/aprimidinic site*). AP endonukleaza zatim presječe DNA lanac koji sadrži AP regiju te se taj segment DNA zatim uklanja. DNA-polimeraza I dodaje nove nukleotide i DNA-ligaza poveže novosintetizirani segment s ostatkom lanca.²⁷

Drugi mehanizam popravka oksidirane DNA je *nucleotide excision repair* (NER) važan za popravak većih pogrešaka na DNA koje uzrokuju promjene strukture dvostruke zavojnice. NER je nužan za opstanak svih živih bića, no sporedan u obrani od oksidacijskog stresa. Multifunkcionalni enzim hidrolizira dvije fosfodiesterske veze, jednu sa svake strane oštećenog mjesta. Tako kod *E. Coli* nastaje fragment od 12 ili 13 nukleotida koji disocira, a DNA-polimeraza i DNA-ligaza popunjavaju prazninu.²⁸

2.4.2. RNA

Mehanizmi poput BER ili NER nisu pronađeni za popravak RNA, no poznata su dva proteina, MutT i polinukleotid-fosforilaza (PNP-aza) koji prepoznaju i degradiraju oksidiranu RNA. MutT hidrolizira 8-okso-dGDP i 8-okso-GTP spriječavajući tako njihovu ugradnju u DNA i RNA i izazivanje mutacija. PNP-aza je enzim koji prepoznaje oksidirane i neoksidirane RNA te s većim afinitetom veže RNA s 8-oksogvaninom. Djeluje kao 3'-5' egzoribonukleaza koja degradira RNA.³⁰

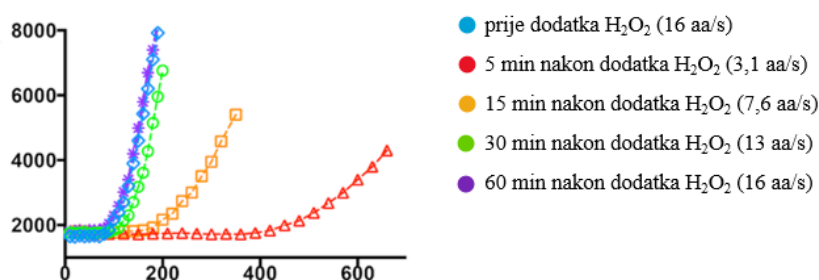
2.5. Utjecaj oksidacijskog stresa na translaciju

Translacijska regulacija je znatno brža od transkripcijske zbog čega služi kao brza adaptacija organizama na promjene.²⁹

Utjecaj oksidacijskog stresa na RNA veći je u odnosu na DNA strukture RNA (jednolančana i manje zaštićena proteinima), veće koncentracije ribonukleotida nego deribonukleotida u stanici te nedostatka mehanizama popravka (BER i NER). Količina 8-okso-gvanina u lancima veća je kod RNA nego kod DNA uslijed izlaganja vodikovom peroksidu.^{8, 30}

Oksidacija rRNA oštećuje ostatke unutar 23S podjedinice važne za interakciju s tRNA pri translaciji. Slično tome oksidacija najviše pogađa područje antikodona u tRNA što objašnjava pogreške pri procesu dekodiranja i aminoaciliranja. Prisutnost 8-okso-gvanina na mRNA aktivira njezinu *syn* konformaciju koja preferira sparivanje s tRNA koja nosi adenin, a ne citozin zbog čega dolazi do zastoja ribosoma na mRNA. Posljedice ovih modifikacija su usporavanje nastanka peptidne veze pri translaciji odnosno usporavanje elongacije.

Na slici 10 prikazana je ovisnost brzine translacije o koncentraciji H₂O₂ kojoj je izložena *E. Coli*. Pri koncentracijama H₂O₂ manjim od 6 mmol/L dolazi do povratka normalne brzine transkripcije nakon što se povrti redoks ravnoteža. Usporavanje elongacije smanjuje količinu sintetiziranih proteina koji bi se pod oksidacijskim stresom mogli pogrešno smotati i agregirati što bi dovelo do stanične smrti. Na ovaj se način također smanjuje vjerojatnost ugradnje krivih aminokiselina i sinteze mutiranih proteina. Usporavanje translacije uzrokovano je padom količine tRNA zbog njene degradacije u stanici tijekom stresa.^{29, 31}



Slika 10. Translacija LacZ operona za sintezu β-galaktozidaze pri različitim koncentracijama H₂O₂. U normalnim uvjetima (plavo) brzina elongacije je oko 16 aminokiselina po sekundi (aa/s) dok je brzina pri koncentraciji H₂O₂ od 1,5 mmol/L samo 3 aa/s. (prilagođeno prema M. Zhu, X. Dai, *Nucleic Acids Research* **47** (2019) 7593-7604.

§ 3. ZAKLJUČAK

Oksidacijski stres je neizbježna posljedica staničnog disanja i egzogenih izvora reaktivnih kisikovih vrsta te predstavlja opasnost za organizam zbog destruktivnosti prema biomolekulama. Zahvaljujući mehanizmima obrane i popravka oksidacijske štete organizmi uspješno egzistiraju u aerobnoj okolini.

Oksidacijski stres je glavni endogeni izvor promjena na DNA pa u slučaju zakazivanja mehanizama obrane oksidacijski stres vidimo kao važan izvor korisnih mutacija. Razumijevanje oksidacijskog stresa važno je za razvoj antibiotika. Istraživanja pokazuju da sojevi s jačim odgovorom na oksidacijski stres pokazuju sporiju adaptaciju i slabiju otpornost na antibiotike što je posljedica manjeg broja mutacija.³²

Iako smo se u ovom radu bavili bakterijskim mehanizmima obrane veliki dio njih podudara se s eukariotskim mehanizmima (katalaze, SOD, mehanizmi popravka DNA). Razumijevanje sličnih mehanizama važno je za razvoj lijekova protiv bolesti uzrokovanih oksidacijskom štetom (tumori, Alzheimerova i Parkinsonova bolest). Poznato je da ROS pokreće i održava rast tumorskih stanica potičući njihovu proliferaciju i otpornost na lijekove. Tumorske stanice imaju osjetljivije senzore na količinu ROS zbog čega je olakšana manipulacija nad njihovom redoks ravnotežom. Liječenje tumora antioksidansima pokazalo se uspješnim jer smanjuje razinu ROS. S druge strane tretiranje tumorskih stanica većom količinom ROS koja remeti njihovu homeostazu također se pokazala učinkovitom.^{8, 33}

Zbog stalne adaptacije bakterija na tretmane antibioticima važna je konzistentnost u istraživanjima oksidacijskog stresa. Proučavanje oksidacijskog stresa kod prokariota ključno je zbog jasnijeg razumijevanja sličnih mehanizama kod ljudi te primjene u liječenju bolesti koje predstavljaju najveće izazove medicine modernog svijeta.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. H. Sies, E. Cadenas, M. C. R. Symons, G. Scott, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **311** (1985) 617–631
2. A. Phaniendra, D. B. Jestadi, L. Periyasamy, *Indian J. Clin. Biochem.* 30 (2015) 11-26.
3. Frederick A. Villamena, *Molecular basis of oxidative stress: Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2013, str. 1-38.
4. S. B. Farr, T. Kogoma, *Microbiological Reviews* 4 (1991) 561-585.
5. K. Jomova, R. Raptova, R. Alomar, *Arch Toxicol* 97 (2023) 2499-2574.
6. Sami Ahmad, *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*, Chapman & Hall, New York, 1995, str. 4-45.
7. https://en.wikipedia.org/wiki/NADH_dehydrogenase (datum pristupa 12. srpnja 2024.)
8. M. Fasnacht, N. Polacek, *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (2021)
9. S. R. Addorisio, R. M. Shteynberg, M. S. Dasilva, J. M. Mixon, K. Mucciarone, L. Vu, K. L. Arsenault, V. Briand, S. Parker, S. L. Smith, C. E. Vise, C. Pina, L. T. Laranjo, *Fine focus*, **8** (2022) 36-46.
10. C. H. Foyer, G. Hanke, *The Plant Journal* **111**(3) (2022) 642-661.
11. M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris, *Lipid Peroxidation*, InTech, Rijeka, Croatia, 2012, str. 4-9.
12. A. W. Girotti, *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* **1** (1985) 87-95.
13. Frederick A. Villamena, *Molecular basis of oxidative stress: Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2013, str. 179-184.
14. C. A. Juan, J. M. Perez de la Lastra, F. J. Plou, E. Perez-Lebena, *International Journal of Molecular Sciences* **22**(9) (2021) .
15. Sami Ahmad, *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*, Chapman & Hall, New York, 1995, str. 210-225.
16. Sami Ahmad, *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*, Chapman & Hall, New York, 1995, str. 240-242.
17. C. N. Broxton, V. C. Culotta, *Plos Pathogens* **12**(1) (2016).
18. F. Yuan, S. Yin, L. Xiang, H. Wang, Z. Li, K. Fan, G. Pan, *Frontiers in Microbiology* **12** (2021).
19. Sami Ahmad, *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*, Chapman & Hall, New York, 1995, str. 252.

20. https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_glutathione_transferase (datum pristupa 13. srpnja 2024.)
21. B. Ezraty, A. Gennaris, F. Barras, J. F. Collet, *Nature Reviews Microbiology* **15** (2017) 385-396.
22. C. Kumsta, U. Jakob, *Biochemistry* **48** (2009) 4666-4676.
23. D. Reichmann, W. Voth, U. Jakob, *Molecular Cell* **69** (2018) 203-213.
24. M. Zheng, F. Aslund, G. Storz, *Science* **279** (1998) 1717-1721.
25. S. I. Liochev, L. Benov, D. Touati, I. Fridovich, *Cell biology and metabolism* **274** (1999) 9479-9481.
26. M. Gu, J. A. Imlay, *Molecular Microbiology* **79** (2011) 1136-1150.
27. K. J. Wozniak, L. A. Simmons, *Nature Reviews Microbiology* **20** (2022) 465-477.
28. David L. Nelson, Michael M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York (2017) 1006-1015.
29. J. Zhong, C. Xiao, W. Gu, G. Du, X. Sun, Q. J. He, G. Zhang, *Plos Genetics* **11** (2015)
30. A. F. Seixas, A. P. Quendera, J. P. Sousa, A. F. Silva, C. M. Arraiano, J. M. Andarde, *Frontiers in Genetics* **12** (2022)
31. M. Zhu, X. Dai, *Nucleic Acids Research* **47** (2019) 7593-7604.
32. J. Carvajal-Garcia, A. N. Samadpour, A. J. Hernander Viera, H. Merrikh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **120**(27) (2023)
33. H. Nakamura, K. Takada, *Cancer Science* **112** (2021) 3945-3952.