Upotreba stres proteina u biomonitoringu

Nemet, Mateja

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:975948

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

SEMINARSKI RAD

UPOTREBA STRES PROTEINA U BIOMONITORINGU

APPLICATION OF STRESS-PROTEINS IN BIOMONITORING

Mateja Nemet
Preddiplomski studij biologije (Undergraduate Study of Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Goran Klobučar
Zagreb, 2015.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Biomonitoring 2
3. Toplinski stres 3
4. Stres proteini 4
   4.1. Porodica Hsp100 5
   4.2. Porodica Hsp90 5
   4.3. Porodica Hsp70 6
   4.4. Porodica Hsp60 6
   4.5. Porodica Hsp proteina male molekularne mase (sHsp) 6
5. Stres proteini u biomonitoringu 7
6. Zaključak 10
7. Sažetak 10
8. Summary 11
9. Literatura 12

1. Uvod

Potencijalno toksične tvari svakodnevno dospijevaju u okoliš antropogenom djelatnošću. Vodeni ekosustavi kao važan dio okoliša u kojem živimo ujedno su i najosjetljiviji ekosustavi jer u konačnici primaju sve kemikalije ispuštene na bilo koji način. Stoga se prema zdravlju vodenih ekosustava najbolje može zaključiti o razni onečišćenja cijelog okoliša.

Opasnost potencijalno toksičnih tvari po živi svijet ne može se odrediti samo na temelju kemijskih pokazatelja zbog toga što nam oni ne daju informaciju o biološkoj raspoloživosti kemikalija,odnosno o obliku koji je dostupan biološkim sustavima. Nadalje potencijalno štetne tvari u okolišu su gotovo uvijek prisutne u smjesama, pa njihovo toksično djelovanje ovisi o sastavu smjese i tipu interakcije između kemikalija koja može biti sinergijska, antagonistička, potencirajuća ili aditivna. Uz to njihova je koncentracija promjenjiva jer se radi o turbulentnom mediju te osim toga na koncentraciju utječe i frekvencija ispuštanja tvari, pa rezultati kemijskih analiza mogu dovesti do pogrešne slike o stupnju onečišćenja. Upravo su zbog toga uz kemijske analize, biološke analize postale neizostavne u procjeni negativnog djelovanja čovjeka na okoliš.

Biološke analize podrazumijevaju sve analize/mjerenja koja ukazuju na interakciju između biološkog sustava i potencijalno štetnog kemijskog fizikalnog ili biološkog djelovanja. One daju informaciju o stvarnom djelovanju onečišćenja na biološku sastavnicu pružajući kumulativnu informaciju o duljem vremenskom razdoblju i daju odziv proporcionalan biološki dostupnoj količini onečišćivala, no često ne daju dovoljno informacija o uzroku promjena, to jest vrsti onečišćenja koja je dovela do utvrđene promjene.

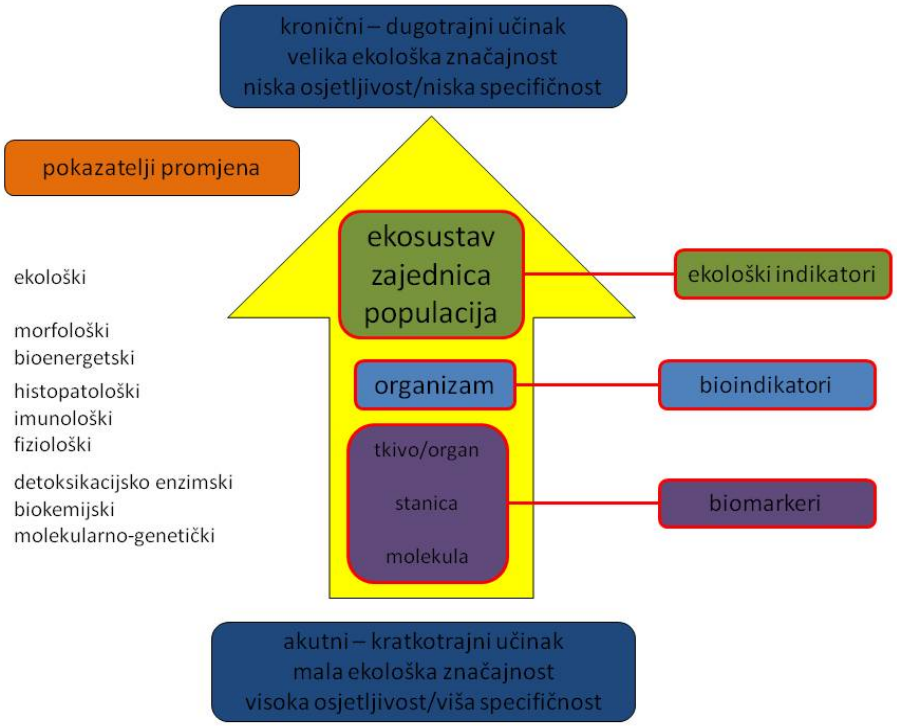
Onečišćenje okoliša često se uočava tek nakon velikih, većinom ireverzibilnih promjena, kao što su promjene u sastavu vrsta ili masovna ugibanja organizama. Kako bi se ti događaji predvidjeli i spriječili, proteklih je godina izraženiji razvoj i uporaba bioloških metoda za procjenu i što ranije otkrivanje promjena u okolišu uzrokovanih onečišćenjem. Sprječavanje gubitka biološke raznolikosti zahtijeva razvoj specifičnih programa za procjenu i praćenje okoliša kako bi se što brže uočile promjene u organizmima uzrokovane djelovanjem toksičnih tvari (Ašperger i sur. 2013).

Od otkrića staničnog odgovora na stres, proteini toplinskog stresa (Hsp) široko se upotrebljavaju u biomonitoringu te je cilj ovog rada je predočiti stres proteine, specifično Hsp,

kao biomarkere, njihovu upotrebu i probleme koji se javljaju kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* kao modelnog organizma.

2. Biomonitoring

Biomonitoring ili biološki nadzor okoliša analizira biološku sastavnicu okoliša i njezine reakcije s ciljem otkrivanja promjena u okolišu nastalih onečišćenjem, a dobivene se informacije upotrebljavaju u nadzoru stanja okoliša i procjeni okolišnog rizika. Djelovanje onečišćivala na organizme u prirodi može se procijenitit na različitim razinama biološke organizacije (**Slika 1.**) (Ašperger i sur. 2013).



Slika 1. Redoslijed pojava promjena po razinama biološke organizacije preuzeto i prilagođeno iz Ašperger i sur. 2013.

Danas se primjenjuju dva pristupa biološkoj detekciji onečišćenja ekosustava te se u tu svrhu koriste ekološki indikatori i bioindikatorske vrste. Ekološki indikatori obuhvaćaju analize kojima se mjere promjene na razini ekosustava uglavnom analize populacija i zajednica. Biološki indikatori (bioindikatori) su vrste čija prisutnost ili odsutnost ukazuje na specifične ekološke uvjete ekosustava koji nastanjuju (Ašperger i sur. 2013).

Biomarker (biološki biljeg) je u širem smislu bilo koja analiza koja ukazuje na interakciju biološkog sustava i potencijalno štetnog kemijskog, fizikalnog ili biološkog

djelovanja, međutim taj naziv većinom obuhvaća promjene na nižim razinama biološke organizacije, odnosno na molekularnoj i staničnoj razini. Sve patološke promjene u organizmu imaju začetak u promjenama procesa na molekularnoj razini te se njihovom analizom promjene uzrokovane onečišćenjem mogu detektirati relativno rano te tako spriječiti veće posljedice na razini populacija kao i na ekosustav u cjelini.

Jedna od metoda kojima se mjeri odziv na razini stanica, organela i molekula je i promjena aktivnosti ili količine određenih proteina, a od proteina kao biomarkera se koriste stres proteini (Ašperger i sur. 2013).

3. Toplinski stres

Organizmi su se prilagodili temperaturama rasta od temperature ledišta vode do 113°C. Međutim, kao stresor temperatura predstavlja značajnu prepreku za život. Za sve žive organizme, temperatura malo iznad optimalne temperature za rast predstavlja problem za opstanak. Nizom eksperimenata utvrđeno je da prokarioti i eukarioti dijele zajednički ancestralni mehanizam kao odgovor na toplinski stres te su ti proteini nazvani proteini toplinskog stresa (eng. Heat shock proteins HSP). Iznenađujuća je činjenica da odgovor na toplinski stres potakne povišenje temperature za samo nekoliko stupnjeva čak i kod organizama koji žive u ekstremnim temperaturama. Uzrok se krije u tome da proteini moraju biti konformacijski fleksibini kako bi obavljali funkcije u stanici. Mali porast temperature dovodi do denaturacije i nespecifične agregacije proteina. Mnogi morfološki i fenotipski efekti toplinskog stresa mogu biti objašnjeni agregacijom proteina i narušenom homeostazom proteina u cjelini (Richter i sur. 2010). Može se zaključiti da su razmotani proteini okidač protuodgovora te da stanica zapravo ne prepoznaje povišenje temperature nego da je odgovor na toplinski stres potaknut denaturiranim proteinima koji mogu biti rezultat mnogih stresora kao oksidativnog stresa, teških metala, etanola ili drugih toksičnih supstanci. Toplinski stres osim što denaturira pojedinačne proteine utječe i na ostale stanične komponente. Posebice kod eukariota kao odgovor na stres je uočen defekt u citoskeletu. Umjereni toplinski stres dovodi do reorganizacije aktinskih filamenata u stres vlaknima, dok jači toplinski stres rezultira agregacijom vimentina, dovodeći do kolapsa citoskeleta. Uz navedeno zabilježen je prekid intracelularnog transporta i gubitak ispravne lokacije organela. Nadalje, endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat postaju fragmentirani, a broj mitohondrija i lizosoma opada. Toplinski stres pogađa i jezgru, te utječe na sintezu RNA. U citosolu se formiraju granule koje su sastavljene od velikih RNA-protein struktura. Uz sve navedeno događaju se i promjene u

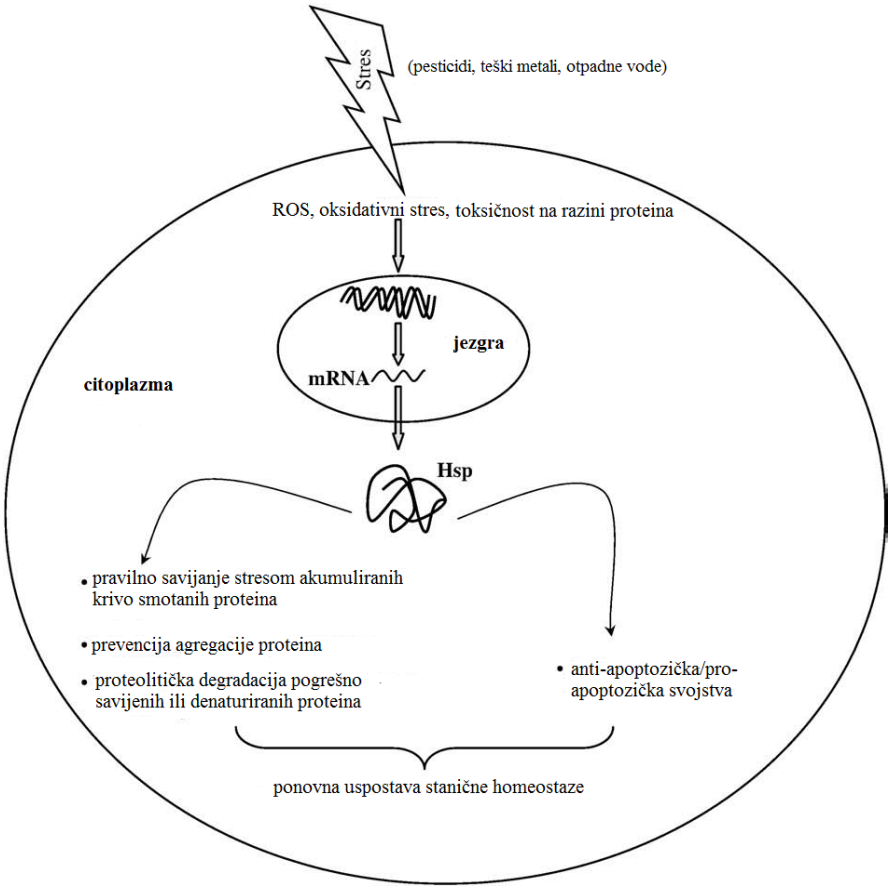
morfologiji stanične membrane, promjena odnosa proteina i lipida i veća fluidnost membrane što dovodi do pada pH u citosolu i promjene u ionskoj homeostazi. Svi ovi efekti dovode do zaustavljanja staničnog ciklusa, stagnacije rasta i proliferacije. Ovisno o duljini i jačini toplinskog stresa akumulacija defekata može rezultirati i smrću stanice. Međutim ako toplinski stres nije letalan može dovesti do tolerancije na ozbiljnije, inače fatalne stresore. Povećana razina sinteze proteina Hsp u umjereno stresnom okruženju je osnova otpornosti jer Hsp proteini inducirani jednim tipom stresa omogučavaju zaštitu od svih ostalih stresora (Richter i sur. 2010).

4. Stres proteini

Stres proteini se mogu podijeliti u tri osnovne skupine: proteini toplinskog stresa (HSP), glukozom regulirani proteini (GRP) i proteini specifični za stres poput metalotioneina i hem oksigenaze) (Ašperger i sur. 2013.).

Među raznim putevima odgovora na stres, odgovor na toplinu je karakteriziran prekidom sinteze većine proteina kako bi se sintetizirala skupina proteina tolinskog stresa. Iako je povećana temperatura uobičajeni pokretač sinteze proteina toplinskog stresa do njihove sinteze može doći zbog drugih stresora poput pesticida, teških metala, otpadnih voda (Gupta i sur. 2010). U stresnim uvjetima novo sintetizirani stres proteini imaju važnu ulogu u održavanju stanične homeostaze **(Slika 2**).

Hsp proteini se dijele u pet velikih porodica prema molekularnoj masi, homologiji aminokiselinskih sekvenci i funkciji : Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, i porodica Hsp proteina male molekularne mase (Gupta i sur. 2010).



Slika 2. Shematski prikaz Hsp indukcije uslijed okolišnih stresora, slika preuzeta i prilagođena iz Gupta i sur. 2010.

4.1. Porodica Hsp100

Proteini koji pripadaju ovoj skupini imaju molekularnu masu između 100 do 104 kDa. Ovi proteini su regulatori proteolize ovisne o energiji za degradaciju oštećenih proteina i kao tzv. molekularni pratitelji (eng. *molecular chaperons*) U stresnim uvijetima zadržavaju funkcionalnu stabilnost ključnih polipeptida, omogućavaju otapanje nefunkcionalnih proteinskih agregata i pomažu u degradiranju nepovratno oštećenih polipeptida (Gupta i sur. 2010).

4.2. Porodica Hsp90

Ova porodica je najučestalija skupina stresnih proteina u eukariotskim stanicama molekularne mase od 82 do 90 kDa. U fiziološkim uvjetima ovi proteini su vezani na

nekoliko intracelularnih proteina uključujući: kalmodulin, aktin, tubulin, kinaze i neke receptorske proteine (Gupta i sur. 2010).

4.3. Porodica Hsp70

Hsp70 porodica predstavlja visoko evolucijski očuvanu klasu proteina molekularne mase između 68 do 75 kDa koju posjeduju svi organizmi od najprimitivnijih bakterija do čovjeka. Kao najučestalije inducirana porodica proteina nije ograničena samo na citosol već je učestala i u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu te se konstitutivno kao i regulirano eksprimira. Aktivnost Hsp70 proteina je regulirana molekulama pratiteljima ko-faktorima – faktorima zamjene nukleotida. Hsp70 sustav ima važnu ulogu ne samo u stresnim uvjetima nego i u normalnom okruženju jer stabiliziraju nesmetanu konformaciju proteina prije nego se obradi u citoplazmi ili/i translocira u endoplazmatski retikulum i mitohondrije. Nadalje, oni omogućavaju otapanje netopljivih agregata i preslagivanje polipeptida (Gupta i sur. 2010).

4.4. Porodica Hsp60

Proteini ove porodice imaju molekularnu masu između 58 do 65 kDa i važnu ulogu u zamotavanju polipeptida i njihovoj translokaciji. Hsp60 proteini su zabilježeni u bakterijama, kloroplastima i mitohondrijima a geni koji kodiraju ove proteine se nalaze u jezgrinom genomu. 60 kDa i 10 kDa jedinice se povezuju u makromolekularnu tvorevinu nalik kavezu u čijoj hidrofobnoj unutrašnjosti ima dovoljno prostora za otkrivanje hidrofobnih dijelova na površini denaturiranih proteina. Kompleks je povezan sa ATPazom koja hidrolizira ATP i osigurava energiju za kontrolirano otpuštanje specifičnih hidrofobnih regija denaturiranih proteina te olakšava vraćanje u nativnu tercijarnu strukturu (Gupta i sur. 2010).

4.5. Porodica Hsp proteina male molekularne mase (sHsp)

Ova porodica uključuje proteine molekularne mase od 15-30 kDa. Pronađeni su kod archea, bakterija, biljaka i životinja. Ovi proteini imaju zajedničku alfa-kristalin domenu koja sadrži 80-100 aminokiselinskih ostataka u C-terminalnoj regiji. Dok je većina sHsp snažno inducibilna, neki su i konstitutivno eksprimirani. Utvrđeno je da, kao i drugi proteini

toplinskog šoka, mali proteini toplinskog šoka funkcioniraju kao šaperoni, sprečavaju nepoželjne interakcije između proteina i pomažu u ponovnom nabiranju denaturiranog proteina. Osim toga, ovi proteini mogu proći reverzibilnu fosforilaciju i mogu biti uključeni u prijenos signala (Gupta i sur. 2010).

5. Stres proteini u biomonitoringu

Među prethodno opisanim proteinima najpoznatija i najbolje istražena grupa proteina uključena u stanični odgovor na stres je porodica Hsp70. U normalnim uvijetima u stanici čimbenik toplinskog šoka (eng. heat-shock factor HSF) nalazi se vezan za stresni protein Hsc70 (eng. heat shock cognate) konstitutivni oblik i inducibilni oblik Hsp70 iz Hsp70 porodice. U stresnim uvijetima povećava se razina denaturiranih proteina te navedeni kompleks disocira, a kako je HSF transkripcijski faktor koji regulira transkripciju stresnih gena oslobođen on odlazi u jezgru te se veže na element toplinskog šoka (eng. Heat shock element HSE) i inicira transkripciju Hsp70 gena (Richter i sur. 2010).

Efikasni biomarkeri moraju ispuniti određene kriterije, moraju biti mjerljivi, univerzalni u proučavanoj grupi, subletalni i pouzdani za interpretaciju. Proteini porodice Hsp70 su sveprisutni i evolucijski očuvani u skoro svim organizmima te se njihovi geni lako izoliraju i identificiraju u genomu. Osjetljivi su na velik broj raznovrsnih stresora te će većina poznatih/testiranih stresora u nekoj mjeri inducirati njihovu aktivaciju. Više su osjetljivi na stres nego neki drugi markeri poput inhibicije rasta, mjerenja letalne doze. Nadalje imaju jedinstvenu prilagodljivost što se tiče ranga aktivnosti u usporedbi s ostalim stres proteinima te ih je u većini slučajeva najlakše detektirati (Morris i sur. 2012).

Od otkrića Hsp70 i identifikacije njihove ulogu u odgovoru na stanični stres, mnoga istraživanja koriste njihovu diferencijalnu ekspresiju kao pokazatelj stresa. Tijekom tog razdoblja, tehnološki napredak je drastično promijenio naše shvaćanje porodice Hsp70. Kao na primjer, sada možemo detaljnije istražiti kako pojedini proteini mijenjaju strukturni oblik kako bi uspješno obavili zadatke unutar stanice (Morris i sur. 2012) te se postavlja pitanje zanemaruje li se kompleksnost pojedinih članova Hsp proteina i jesu li pretpostavke o njihovoj diferencijalnoj ekspresiji krive, odnosno vrlo pojednostavljene.

Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* uobičajno raprostranjena u obalnom području Mediterana i Atlantika kao modelni organizam često se koristi u biomonitoringu za procjenu toksičnog efekta onečišćenja (Banni i sur. 2015). Dagnje su posebno korisne u ovom kontekstu zbog toga što su filtratori, naseljavaju regije diferencijalnog zagađenja, akumuliraju

ksenobitike i sesilne su. U prirodnom okruženju sezonski ciklus snažno utječe na fiziologiju beskralježnjaka (rast, reprodukciju, imunost) tako da promjene u okolišnim čimbenicima koji su rezultat sezonske promjene mogu snažno utjecati na njihovu normalnu metaboličku aktivnost (Banni et al. 2015.).

Iako su istraživanja kroz dugi vremenski period dala relativno osnovne podatke poput stope rasta, sastava hranjivih tvari, reprodukcije i specifične genske strukture te je to dovelo do poboljšanja u razumijevanju kako jedinke odgovaraju na specifične okolišne uvijete. Cilj je poboljšati razumijevanje utjecaja višestrukih okolišnih parametara na fiziološka svojstva dagnji kroz duže vrijeme. Korištenje pristupa baziranog na genomici dovelo je do otkrivanja fundamentalnih metaboličkih procesa dok je transkriptomika, simultano mjerenje tisuća mRNA u uzorku, povećala razumijevanje mnogih važnih fizioloških procesa u morskom ekosustavu (Banni i sur. 2015).

Hsp u dagnji su korišteni u brojnim istraživanjima no korištenjem novih tehnologija istraživanja su podignuta na višu razinu.

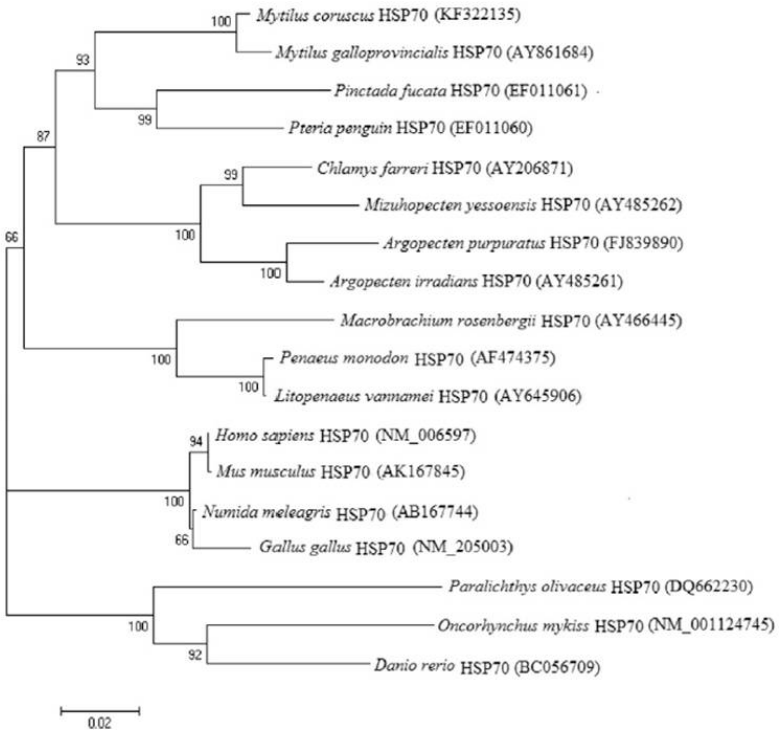
Banni i sur. su u prirodnoj populaciji dagnji istražili ekspresiju gena u gonadama i probavnoj žlijezdi u oba spola tijekom godine kako bi ustanovili utječu li sezonske promjene okoliša na njihovu fiziologiju. Upotrebom transkriptomike kroz godišnji ciklus između ostaloga je u lipnju zabilježena povećana ekspresija Hsp90 koja poslije pada no Banni i sur. zaključuju da se ništa ne može pretpostaviti bez daljnje istrage. Za akutni toplinski stres su ustanovili povišenje ekspresije seta od trinaest gena uključenih u različite metaboličke procese, među njima i Hsp90. Ti podaci odražavaju aktivaciju metaboličke aktivnosti u probavnoj žlijezdi što je uobičajeno jer se omogučava akumulacija energije za reproduktivne faze u hladnijim mjesecima i trebaju biti uzeti u obzir prilikom provedbi istraživanja. Uz to razlike na razini biosinteze kod suprotnih spolova posebice kod muških dagnji kod kojih u fazama razvoja gonada prevladavala ekspresija hitinaze ukazuju na potrebu determinacije spola pri ekotoksikološkim istraživanjima (Banni i sur. 2015).

Hsp proteini su korišteni kao biomarkeri prilikom izlaganja dagnji različitim kemikalijama. Primjerice Messina i sur. su istržili efekt natrijevog dodecil sulfata (SDS) na dagnje kroz 18 dana. Rezultati su pokazali da SDS uzrokuje povećanje Hsp70 u analiziranim tkivima škrgama, hepatopankreasu i plaštu te je time potvrđen učinak SDS koji se očituje u poremećaju sekundarne i tercijarne strukture proteina (Messina i sur. 2014).

Na temelju mRNA ekspresije u dagnjama Banni i sur. su istražili efekt oksitetraciklina pri različitim temperaturama. Zabilježili su značajnu modifikaciju mRNA ekspresije nekoliko Hsp gena. Tako je zabilježena povećana mRNA ekspresija Hsp27 pri 16°C. Međutim snažno

povećanje je zabilježeno i kod kontrolne skupine pri 24°C koja nije tretirana oksitetraciklinom dok je pri istoj temperaturi, ali kod tretiranih dagnji smanjena mRNA za Hsp27 te se može zaključiti negativna interakcija između stresora na Hsp27 odgovor kod dagnje (Banni i sur. 2015).

BLAST program analizom Hsp70 sekvence je pokazao da je sekvenca *M. coruscus* homologna vrstama *M. galloprovincialis* (95%), *Perna viridis* (83%) i *Meretrix meretrix* (80%). Nadalje, za uspostavljanje molekularne filogenetičke pozicije Hsp70 konstruirano je neukorijenjeno filogenetsko stablo prema Hsp70 te se prikazani odnos poklapa sa tradicionalnom taksonomijom **(Slika 3.)** (Liu i sur. 2014).



Slika 3. Filogenetsko stablo prikazuje odnos *M. coruscus* na temelju Hsp70 u odnosu na druge vrste (preuzeto i prilagođeno iz Liu i sur. 2014).

.

Liu i sur. su istražili ekspresiju Hsp70 na više stresora. Analizom ekspresije gena Hsp70 nakon infekcije dagnje sa *Vibrio alginolyticus* i *V. harveyi* je potvrđena uključenost Hsp70 u obrani organizma od patogene infekcije naime zabilježena je povećana vremenski ovisna transkripcija Hsp70 (Liu i sur. 2014).

Prilikom izlaganja dagnji teškim metalima i organskim ugljikohidratima promjena ekspresije mRNA Hsp70 dovodi do zaključka da Hsp70 geni iz hemolimfe *M. coruscus* bi mogli biti biomarkeri za teške metale i gorivo (Liu i sur. 2014).

6. Zaključak

Na fudamentalnoj razini povećana ekspresija Hsp70 označava prisutnost proteina čija je nativna funkcionalna konformacija izmijenjena uslijed stresa. Kada se Hsp70 koristi kao biomarker pretpostavlja se da je pomak u konformaciji proteina rezultat stresa i da je razina ekspresije Hsp70 u bilo kojem trenutku povezana sa razinom razmotanih proteina prema tome razini stresa. Međutim postalo je jasno da ekspresija Hsp nije toliko jednoznačna i da se prilikom korištenja Hsp kao biomarkera treba uzeti u obzir puno više faktora nego što se do sad uzimalo kao na primjer sezonske varijacije i razlike između spolova. Nadalje nije još u potpunosti razotkrivena pozadina staničnih signalnih puteva koja može dovesti do ekspresije istih gena te je time zakomplicirano predviđanje mehanizama učinaka toksikanata koja se baziraju na ekspresiji gena stres proteina. Međutim dostupnost novih tehnologija i analitičkih pristupa će dovesti do boljeg razumijevanja utjecaja brojnih okolišnih parametara na fiziologiju organizama kao i na odgovor na stres između stanica, tikva i u konačnici čitavog organizma.

7. Sažetak

U zadnje vrijeme je izražena potreba za učestalijim nadzorom okoliša. U svrhu biomonitoringa traže se najpogodniji biomarkeri. Jedni od njih su proteini toplinskog stresa (eng. Heat shock proteini HSP). Hsp posebice porodica Hsp70 su sveprisutni i evolucijski očuvani proteini u skoro svim organizmima te se njihovi geni lako izoliraju i identificiraju u genomu. Njihova povećana ekspresija označava prisutnost denaturiranih proteina čija je konformacija promijenjena uslijed stresa te se je to dugi period pripisivalo onečišćenju. Danas se rade istraživanja koja pokazuju da povećana ekspresija Hsp70 proteina ne mora nužno značiti prisutstvo toksične tvari te da je potrebno bolje razumijevanje kompleksnosti Hsp odgovora na stres, a ujedno i bolje poznavanje fiziologije izabranog modelnog organizma.

8. Summary

Recently there has been a need for more frequent supervision of the environment. For the purpose of biomonitoring there is a constant search for the most suitable biomarkers. One of those are Heat shock proteins (HSP). HSP, especially Hsp70 family are ubiquitous proteins that are evolutionarily conserved in almost all organisms, their genes are easy to isolate and identify in the genome. They react to non-functional proteins with increased up-regulation. For a long period that was associated with cellular stress response due to environmental pollution. Today, researches have showed that up-regulation of Hsp70 proteins does not necessarily have to be triggered by the presence of toxic substances and that there is a need for better understanding of complexity of the HSP response to stress, and moreover for better understanding of the physiology of the selected model organism.

9. Literatura

Ašperger D., Babić S., Bolanča T., Darbra R. M., Ferina S., Ginebreda A., Horvat A. J. M., Kaštelan-Macan M., Klobučar G., Macan J., Mutavdžić Pavlović, Petrović M., Sauerbon Klobučar S., Štambuk A., Tomašić V. i Ukić Š. HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013. Analitika okoliša : Biološke analize utjecaja onečišćenja na okoliš 305-336

Banni M., Sforzini S., Frazellitti S., Oliveri C., Viarengo A. i Fabbri E. 2015. Molecular and Cellular Effects Induced in Mytilus galloprovincialis Treated with Oxytetracycline at Different Temperatures. Plos One, doi: 10.1371/journal.pone.0128468

Banni M., Negri A., Mignone F., Boussetta H., Viarengo A. i Dondero F. 2011. Gene Expression Rhythms in the Mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an Annual Cycle. Plos One, doi: 10.1371/journal.pone.0018904

Gupta S.C., Sharma A., Mishra M., Mishra R.K. i Chowdhuri D.K. 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far. Life scienc 86, 377-384

Liu H., He J., Chi C. i Shao J. 2014. Differential HSP70 expression in *Mytilus coruscus* under various stressors. Gene 543, 166-173

Messina C.M., Faggio C. i Laudicella V.A. 2014. Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on stress response in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*): Regulatory volume decrease (Rvd) and modulation of biochemical markers related to oxidative stress. Aquatic Toxicology 157, 94-100

Morris J.P., Thatje S. i Hauton C. 2013. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. Molecular Ecology Volume 22, Issue 6, 1494–1502

Richter K., Haslbeck M. i Buchner J. 2010. The heat shock response : life on the verge of death. Molecular Cell 40, 253-262